

No. 11-179041-00000-0000

Fecha: 2011-12-27 11:13:17

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 148

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 150



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ METODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACION ALTAMENTE

CONCENTRADA DE INMUNOGLOBULINA DE USO SUBCUTANEO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIO _____ ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA Y OPFIKON SUIZA

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

74. APODERADO _____

22. BOGOTÁ, D. C., _____



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-179041- -00000-0000

Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BAXTER INTERNATIONAL INC.**
y **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

Sociedades constituidas y existentes bajo
las leyes del Estado de Delaware, Estados
Unidos de América y Suiza
respectivamente.

Dirección: One Baxter Parkway,
Deerfield, Illinois 60015,
Estados Unidos de America

y

Thurgauerstrasse 130,
Suiza-8152 Glattpark,
Opfikon,
Suiza

Domicilio: Deerfield,
Illinois,
Estados Unidos de America

y

Opfikon,
Suiza

Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@cavelier.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 35.456.344

T.P 23.555

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Wolfgang TESCHNER**
Gestetengasse 19/14,
A-1030 Viena,
Austria

3. **Azra PLJEVLJAKOVIC**
Ottakringerstr 94/22,
A-1170 Viena,
Austria

5. **Bernhard KOELBL**
Hintausstrasse 20/5,
A-2481 Achau,
Austria

2. **Harald Arno BUTTERWECK**
Telefonweg 3/4/1,
A-1220 Viena,
Austria

4. **Theresa Friederike BAUER**
Rotensterngasse 15B/13,
A-1020 Viena,
Austria

6. **Hans-Peter SCHWARZ**
Weimarer Strasse 76,
A-1180 Viena
Austria

	7. Nebojsa NIKOLIC Prechtlgasse 2A/8, A-1090 Viena, Austria 9.Johanna KINDERMANN Dobrastr 8, A-2344, Maria Enzersdorf, Austria	8. Gerhard POELSLE Nordwestbahnstrasse 101/1/39, A-1200 Wien, Austria		
5	PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/US2010/036430</u> Fecha: <u>27 de mayo de 2010</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2010/138736 A3</u> Fecha: <u>02 de diciembre de 2010</u>			
6	Título (54) <u>MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACIÓN ALTAMENTE CONCENTRADA DE INMUNOGLOBULINA DE USO SUBCUTÁNEO</u>			
7	Clasificación Internacional (51) <u>C07K 016/006</u>			
8	Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>US</u>	(32) Fecha <u>27 de mayo de 2009</u>	(31) Número de Solicitud <u>61/181.606</u>
9	Comprobante de pago No.: <u>11-117785</u> Fecha: <u>05 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-117786</u> Fecha: <u>05 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-117638</u> Fecha: <u>05 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-117656</u> Fecha: <u>05 de diciembre de 2011</u> Comprobante de pago No.: <u>11-122646</u> Fecha: <u>16 de diciembre de 2011</u>			

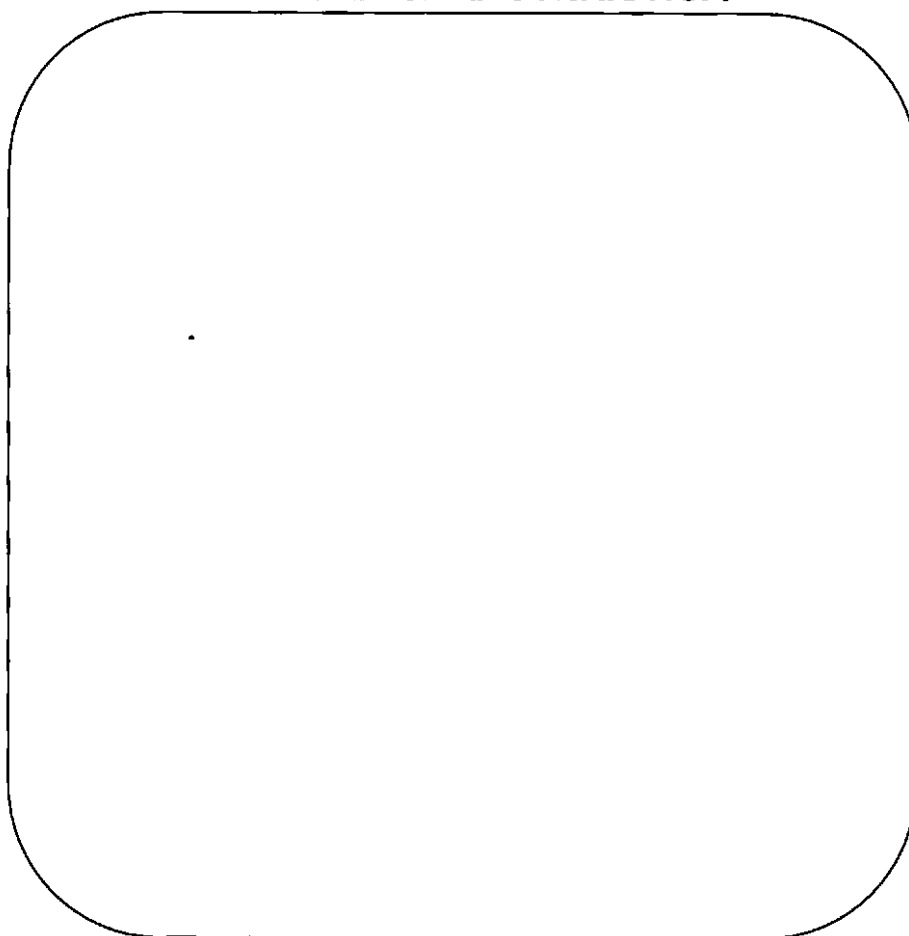
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 571.000.00.
- ☒ Comprobante de pago por 9 reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por \$243.000.00.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes de BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia de la carátula de la Publicación Internacional WO 2010/138736 A3.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA :

Luz Clemencia de Paez

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

SCI

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2010/138736 A3

Descripción:

Páginas 97 en español

Reivindicaciones: 19

Dibujos: 3

2. ☒ Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE PRESENTARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 10

DE LA ESCRITURA NUMERO: 1149
FECHA: 04/Marzo/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ



CERTIFICADO SC 3580-1
PRESTACION DEL
SERVICIO PUBLICO
NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notaria6debgta@etb.net.co



ESCRITURA PUBLICA NUMERO: -- 1149 --
-- MIL CIENTO CUARENTA Y NUEVE --
FECHA: MARZO CUATRO (4) --
DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2010) -----
NOTARIA SEXTA (6ª) DE BOGOTA D.C.-----

CLASE DE ACTO: PODER ESPECIAL

RAZON SOCIAL : CAVELIER ABOGADOS NIT : 860.041.367-3

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO

----- Notario Sexto (6º) ----- de éste
Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los
siguientes términos: -----

**CONSTANCIA SOBRE COMPARECENCIA Y DECLARACIONES ANTE EL
NOTARIO :** -----

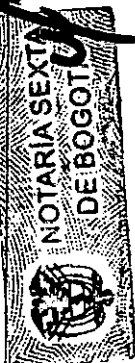
COMPARECIO : Con minuta (correo electrónico) compareció el señor
CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO, mayor de edad, vecino de esta
ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía No. 19.066.425 de
Bogotá, y dijo: -----

ESTIPULACIONES:

PRIMERA. Que obra en su calidad de representante legal de la sociedad
denominada **CAVELIER ABOGADOS**, NIT : 860.041.367-3 domiciliada en
la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. -----

SEGUNDA: Que **BAXTER INTERNATIONAL INC.**, sociedad constituida y
existente bajo las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de
América, domiciliada en One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois, Estados
Unidos de América, designó a **CAVELIER ABOGADOS** como su
representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de
nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento
de representación que se protocoliza. -----

TERCERA.- Que en su carácter de representante legal de **CAVELIER
ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **BAXTER
INTERNATIONAL INC.**, confiere poder a los abogados **LUZ CLEMENCIA
DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número
35.456.344 de Usaquén, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366,



identificada con cédula de ciudadanía número 39.787.682 de Bogotá, **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027 identificado con cédula de ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **EDNA DARMELY SARMIENTO CHARRY**, T.P.A. 65.794 identificada con cédula de ciudadanía número 52.006.265 de Bogotá y **JORGE CHAVARRO ARIZTIZABAL**, T.P.A. No. 40.119, identificado con cédula de ciudadanía número 16.209.380 de Cartago (Valle), mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, acción por infracción, concesión de licencias, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; acciones populares, de tutela y de cumplimiento; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. **CUARTA.-**

Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos. **QUINTA-** Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del



5873

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE
APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by MARCIA L. HARDING
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, MCHENRY COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Chicago, Illinois
6. DECEMBER 14, 2009
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. C09SPR26267
9. Seal/Stamp:
10. Signature:

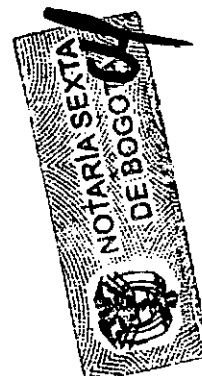
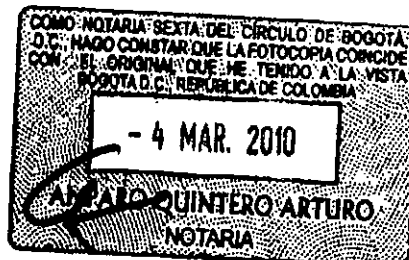


Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



Printed on recycled paper. Printed by authority of the State of Illinois. August 2009 — 55M — I 168.2



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BAXTER INTERNATIONAL INC.

domiciliado (s) One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois, USA
en/of

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

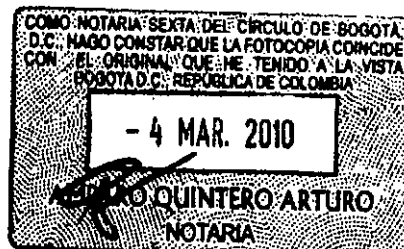
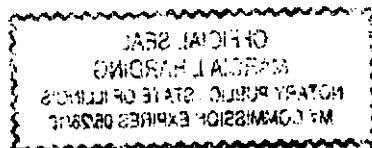
La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar,

© CAVELIER ABOGADOS

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the



admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

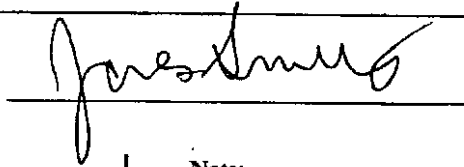
case, desist, cancel, receive, resign and substitute the power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 11th day of November 2009

En/in Deerfield, Illinois, USA

Por/by James Smith

Firma/Signature



Nota:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía. Deberá ser presentado ante Notario Público para que certifique que la persona que firma es quien dice ser. La firma del señor Notario deberá ser legalizada.*

Adicionalmente deberá anexarse copia legalizada* del documento que pruebe la existencia y representación legal de la sociedad.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario. Una sola legalización que incluya ambos documentos sería suficiente.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante: El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document should be signed by the Legal Representative of the company. It should be produced before a Notary Public, who should certify that the person signing the same is in fact who he/she purports to be. The Notary's signature should then be legalized.*

In addition a legalized copy* of the document proving the existence and legal representation of the company should also be attached.

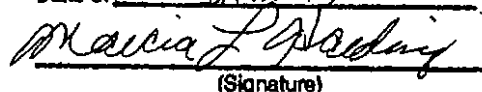
*Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise. A single legalization that would include both documents would be sufficient.

FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

Subscribed and sworn before me, this 11th
day of November, 2009, a Notary Public
in and for Lake County,
State of Illinois

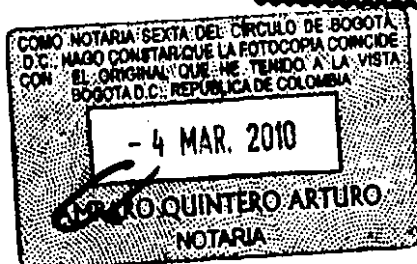
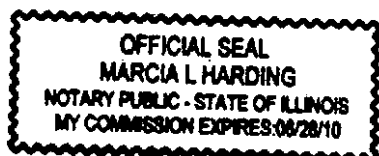


(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires Jan 28, 2010

© CAVELIER ABOGADOS



CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que aparece a continuación del señor

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

El

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the following signature of Mr. James Smith

is authentic that the signatory currently acts in the position of Associate General Counsel & Chief IP Counsel

of the company BAXTER INTERNATIONAL INC.

a company currently existing and organized under the laws of Delaware

that the address is

One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois, United States of America,

and that the signatory has the power to grant this document

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in Deerfield, IL USA

On February 8, 2010

OFFICIAL SEAL
MARCIA L. HARDING
NOTARY PUBLIC - STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES: 06/28/10

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

- Country:
This public document
- has been signed by
- acting in the capacity of
- bears the seal/stamp of

Certified

- at
- by
- No.
- Seal/stamp
- the
- Signature

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 4 MAR. 2010
ARTURO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA
DE BOGOTA

Subscribed and sworn before me, this 8 day of February, 2010, a Notary Public in and for McHenry County, State of Illinois

Marcia L. Harding
(Signature)
NOTARY PUBLIC
My Commission expires June 28, 2010

TRADUCCIÓN OFICIAL 061/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
 REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
 APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
 EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
 DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **BAXTER INTERNATIONAL INC.**
 DOMICILIADA EN ONE BAXTER PARKWAY, DEERFIELD, ILLINOIS,
 ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS
 RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS.**

DADO Y FIRMADO HOY 11 DE NOVIEMBRE DE 2009 EN DEERFIELD,
 ILLIONIS, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA, POR JAMES SMITH. FIRMADO
 ILEGIBLE.

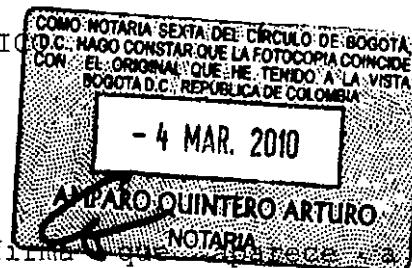
FIRMADO Y JURAMENTADO ANTE MI, HOY 11 DE NOVIEMBRE DE 2009,
 NOTARIO PÚBLICO PARA EL CONDADO DE LAKE, ESTADO DE ILLINOIS.

FIRMADO MARCIA L. HARDING, NOTARIO PÚBLICO

MI CARGO VENCE EL 28 DE JUNIO DE 2010.

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito certifica que la firma que aparece en la
 continuación del señor J SMITH es auténtica; que el
 signatario desempeña actualmente el cargo de abogado general
 asociado y abogado principal de propiedad industrial de la
 compañía BAXTER INTERNATIONAL INC., una compañía que
 actualmente existe y está organizada de acuerdo con las leyes
 de Delaware. Que la dirección de dicha compañía es ONE BAXTER
 PARKWAY, DEERFIELD, ILLINOIS, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA y que
 el signatario tiene facultad para otorgar este documento.



Eduardo Calado N.
 Traductor Oficial
 Registrado en el
 Ministerio de Justicia
 Resolución 541 de 1976

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Deerfield, IL, Estados Unidos de América, el 9 de febrero de 2010. SELLO: SELLO OFICIAL, MARCIA L. HARDING, NOTARIO PÚBLICO, ESTADO DE ILLINOIS, MI CARGO VENCE EL 28 DE JUNIO DE 2010.

ESTADO DE ILLINOIS SECRETARIA DE ESTADO

SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. Este documento público ha sido firmado por MARCIA L. HARDING
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, CONDADO DE MCHENRY
4. lleva el sello/estampilla del ESTADO DE ILLINOIS.

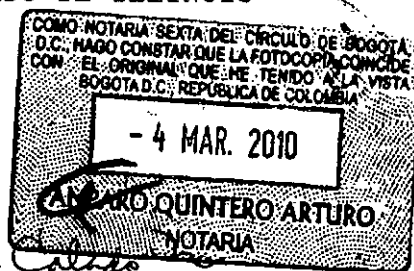
CERTIFICADO

5. En Chicago, Illinois
6. el 14 de diciembre de 2009
7. Por la secretaria de estado del estado de Illinois
8. No. C09SPR26267
9. Sello/estampilla, SELLO REALZADO EN FORMA DE ESTRELLA DE COLOR DORADO CON LA LEYENDA: SELLO DEL ESTADO DE ILLINOIS, 26 DE AGOSTO DE 1818.
10. Firma: JESSE WHITE

JESSE WHITE, SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE ILLINOIS

COLO-13936-841-029-2

ECN\ECN\ID-166803\WPCL002G
Bogotá, 1 de marzo de 2010.



Eduardo Calles
Eduardo Calles - Notario
TITULO NOTARIAL ORIGINAL
Bogotá - D.C.
1 de marzo de 2010



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

010607

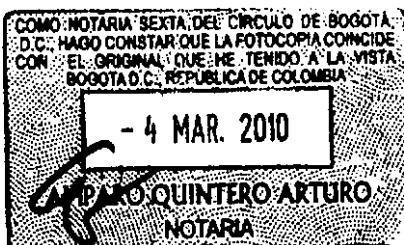
Edwando De la Cruz

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
AS FUNCIONES INDICADAS

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2010 MAR 21 A 8:34

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.





01



* 9 0 2 3 3 4 0 8 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

24 DE FEBRERO DE 2010

HORA 15:29:39

R027619924

PAGINA: 1 de 3

* EN JUNIO DE ESTE AÑO SE ELEGIRAN JUNTA DIRECTIVA Y REVISOR FISCAL *
* DE LA CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA. LAS INSCRIPCIONES DE *
* CANDIDATOS DEBEN HACERSE EN LA PRIMERA QUINCENA DE MAYO. *
* PARA INFORMACION DETALLADA DIRIGIRSE A LA SEDE PRINCIPAL, QUINTO *
* PISO, O COMUNICARSE AL SIGUIENTE TELEFONO: 5941000 EXTENSION 2899. *

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS

N.I.T. : 860041367-3

DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

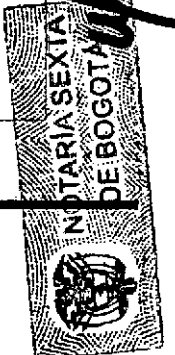
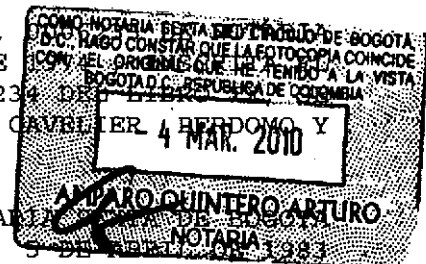
CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTAFE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTAFE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA) . - .

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU



NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.	FECHA	NOTARIA	INSCRIPCION
842	10-V-1.977	18. BTA.	27-V-1.977-NO. 46.204
3.430	1-VII-1.980	6A. BTA.	3-IX-1.980-NO. 89.582
4.844	10-IX-1.980	6A. BTA.	8-X-1.980-NO. 91.261
432	10-II-1.983	6A. BTA.	1-III-1.983-NO.129.337
7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO. 1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO. 1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO. 2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO. 2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO. 3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO. 3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO. 3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO. 3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO. 4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO. 4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO. 4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO. 4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO. 4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO. 4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO. 5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO. 5.077
ACTA NO.71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO. 5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO. 5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO. 6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO. 6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO. 6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
54	2005/08/26	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
54	2007/07/24	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
54	2009/10/21	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

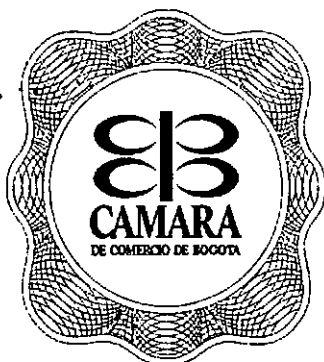
CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE FEBRERO DE 2024 .

ARTURO QUINTERO ARTURO

CERTIFICA:

LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN



01



* 9 0 2 3 3 4 0 9 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

24 DE FEBRERO DE 2010 HORA 15:29:39

R027619924

PAGINA: 2 de 3

INTERES, MANDATO CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO PARTICIPAR EN ASOCIACIONES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR NOMINAL DE \$1.00 CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

- SOCIO CAPITALISTA (S)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

N.I.T. 000008001722568

NO. CUOTAS: 8,800.00

VALOR: \$8,800.00

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 000000000131100

NO. CUOTAS: 1,200.00

VALOR: \$1,200.00

- SOCIO INDUSTRIAL (S)

CHAVARRO JORGE

C.C. 000000016209380

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA

C.C. 000000035456344

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

PEÑA VALENZUELA DANIEL

C.C. 000000079518915

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO

C.C. 000000079155665

NO. CUOTAS: 0.00

VALOR: \$0.00

TOTALES

NO. CUOTAS: 10,000.00

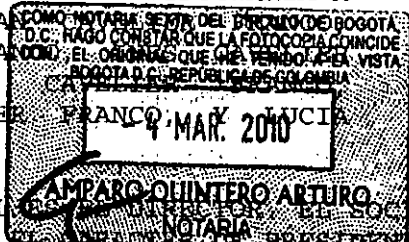
VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES



ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009, INSCRITA EL 24 DE SEPTIEMBRE DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO) GALLON GIRALDO CARLOS	C.C. 000000019066425

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0004818 DE NOTARIA 6 DE BOGOTA D.C. DEL 22 DE AGOSTO DE 2005, INSCRITA EL 26 DE AGOSTO DE 2005 BAJO EL NUMERO 00010008 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO CAVELIER GAVIRIA GERMAN	C.C. 000000002877924
SUPLENTE DEL PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

** REVISOR FISCAL **

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
REVISOR FISCAL RINCON MARTIN FERNANDO	C.C. 000000002877024

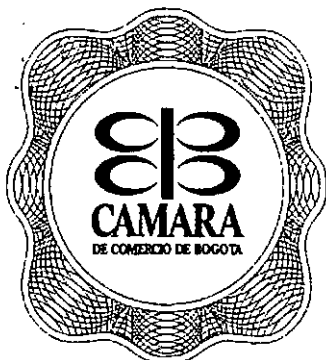
CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO QUE SEAN CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES DE LA FIRMA DEL REGISTRAR, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSOS EN LA NOTARIA SUBORDINADA.

* * * EL PRESENTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE * * *
* * * FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO * * *

SEÑOR EMPRESARIO, SI SU EMPRESA TIENE ACTIVOS INFERIORES A 30.000 SMLMV Y UNA PLANTA DE PERSONAL DE MENOS DE 200 TRABAJADORES, USTED TIENE DERECHO A RECIBIR UN DESCUENTO EN EL PAGO DE LOS PARAFISCALES DE

1473



01



* 9 0 2 3 3 4 1 0 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

24 DE FEBRERO DE 2010

HORA 15:29:39

R027619924

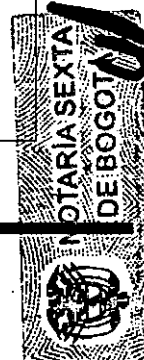
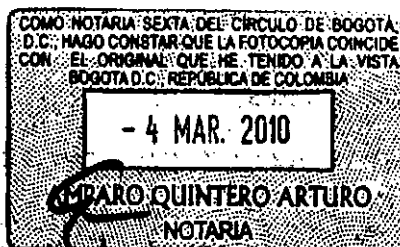
PAGINA: 3 de 3

75% EN EL PRIMER AÑO DE CONSTITUCION DE SU EMPRESA, DE 50% EN EL SEGUNDO AÑO Y DE 25% EN EL TERCER AÑO. LEY 590 DE 2000 Y DECRETO 525 DE 2009.

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
VALOR : \$ 3,600

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban D.



7 700004 347332



documento de representación otorgado el día **once**
(11) de **noviembre** de **2009** -----
por **J. SMITH** Abogado General de la Compañía
BAXTER INTERNATIONAL INC -----
documento que está debidamente legalizado por -----

Apostille. -----
Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura pública. -----

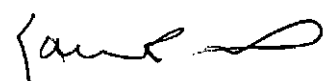
HASTA AQUI LA MINUTA

OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION : Leída la presente escritura pública por el Compareciente y habiéndosele hecho las advertencias sobre los trámites y formalidades de rigor le impartió su aprobación y en constancia la firma por ante mí el Notario que **AUTORIZA.** -----

DERECHOS NOTARIALES : RESOLUCION 10301 del 17 de diciembre año 2009, \$ 42.860.00 / ----- IVA \$ 16.497.00 / -----

PAPEL NOTARIAL : Esta escritura se extendió en las hojas de papel sellado números : . 7-700004-347349 / 7-700004-347332 / -----

EN BLANCO... EN BLANCO


CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO
CC.No. **19.066.425** *RW*
Representante legal **CAVELIER ABOGADOS**



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIO SEXTO (6°) DE BOGOTÁ D.C.



ES FIEL EL Y DECIMA COPIA (FOTOCOPIA) TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA
NUMERO 1149 DE FECHA 04 DE MARZO DE 2010. COPIA QUE EXPIDO CON
DESTINO AL INTERESADO EN 09 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA
CUAL CARECE DE NOTA DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR
TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA D.C. MARZO 29 DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2009

POR LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



MABEL ANDREA RODRIGUEZ DIAZ
NOTARIA ENCARGADA

Notaría
Sexta

6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 33

DE LA ESCRITURA NUMERO: 140
FECHA: 18/Enero/2010

ACTO O CONTRATO:
PODER ESPECIAL
OTORGANTES:
CAVELIER ABOGADOS
ROSA MARGARITA SANTA CRUZ



AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

CARRERA 9 No. 69-31 - PBX: 317 01 00 - FAX: 314 56 41
Correo Electrónico: notariasexta@etb.net.co



ESCRITURA PÚBLICA NÚMERO: 140 - - - - -
CIENTO CUARENTA - - - - -
DE FECHA: ENERO DIECIOCHO (18) - - - - -
DEL AÑO DOS MIL DIEZ (2.010). - - - - -
OTORGADA EN LA NOTARÍA SEXTA (6ª.)

DEL CÍRCULO NOTARIAL DE BOGOTÁ, D.C. - - - - -

ACTO: PODER ESPECIAL. - - - - -

ACTO SIN CUANTÍA: \$ - 0 - - - - -

En la ciudad de Bogotá, Distrito Capital, Departamento de Cundinamarca, República de Colombia, ante mí - - - - AMPARO QUINTERO - -
ARUTO - - - - - Notaria Sexta (6ª.) - - - - -

de este Círculo Notarial, se otorgó la escritura pública que se consigna en los siguientes términos: - - - - -

COMPARECENCIA: Con minuta enviada por correo electrónico, compareció el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, mayor de edad, vecino de esta ciudad, casado, identificado con la cédula de ciudadanía número 19.066.425 de Bogotá, y dijo: - - - - -

ESTIPULACIONES: - - - - -

PRIMERA.- Que obra en su calidad de Representante Legal de la sociedad denominada **CAVELIER ABOGADOS** domiciliada en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia. - - - - -

SEGUNDA: Que **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, sociedad constituida y existente bajo las leyes de Suiza, domiciliada en Thurgauerstrasse 130 8152, Glattpark (Opfikon), Suiza, designó a **CAVELIER ABOGADOS**, como su representante para la Propiedad Industrial en Colombia con facultades de nombrar apoderados tal como consta en la copia auténtica del documento de representación que se protocoliza. - - - - -

TERCERA.- Que en su carácter de Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**, y en desarrollo de la facultad otorgada por **BAXTER HEALTHCARE S.A.**, confiere poder a los abogados **OSCAR FERNANDO CORREA BARBOSA**, T.P.A. No. 71.027, identificado con cédula de



ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **ROSA MARGARITA SANTACRUZ**, T.P.A. No. 49.434, identificada con cédula de ciudadanía número 35.501.911 de Suba (Bogotá, D.E.), , **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**, T.P.A. No. 23.555, identificada con cédula de ciudadanía número 35.456.344 de Usaquen y **GERMAN HUMBERTO MARIN RUALES**, T.P.A. No. 64.239, identificado con cédula de ciudadanía número 79.155.665 de Bogotá, mayores de edad, vecinos de Bogotá, para que representen a la sociedad a cuyo nombre actúa, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, incluyendo las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, trazado de circuitos integrados, secretos industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales, denominaciones de origen e indicaciones de procedencia, su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones, cancelación administrativa o judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales y de nombres de dominio junto con su administración y pago; y en general los procesos civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos, de conciliación, arbitramento, tutela relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.-----

CUARTO.- Que los apoderados designados están facultados en todos los asuntos arriba determinados para sustituir este mandato, transigir, conciliar, arbitrar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.-----

QUINTO.- Que protocoliza con la presente escritura, un certificado expedido por la Cámara de Comercio de Bogotá, que acredita la constitución y personería de la sociedad **CAVELIER ABOGADOS**, igualmente protocoliza copia autenticada del documento de representación otorgado el día once (11) de Noviembre de dos mil nueve (2.009), por **BAXTER HEALTHCARE S.A.**,

1978



01



* 8 8 2 2 6 8 8 5 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

R027136832

PAGINA: 1 de 3

CERTIFICADO DE EXISTENCIA Y REPRESENTACION LEGAL O INSCRIPCION DE DOCUMENTOS

CERTIFICA:

NOMBRE : CAVELIER ABOGADOS
N.I.T. : 860041367-3
DOMICILIO : BOGOTA D.C.

CERTIFICA:

NO: 00820237

CERTIFICA:

CONSTITUCION : QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0006233 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE SEPTIEMBRE DE 1974 , INSCRITA EL 26 DE SEPTIEMBRE DE 1974 BAJO EL NUMERO 00021234 DEL LIBRO IX, SE CONSTITUYO LA SOCIEDAD CIVIL DENOMINADA: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER.

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL 5 DE ABRIL DE 1983 BAJO EL NUMERO 00130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE : CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER. POR EL DE : CAVELIER ABOGADOS

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NUMERO 1.000 OTORGADA EN LA NOTARIA 6A. DE BOGOTA EL 10 DE MARZO DE 1.983, INSCRITA EN ESTA CAMARA DE COMERCIO EL 5 DE ABRIL DE 1.983 BAJO EL NUMERO 130769 DEL LIBRO IX, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NOMBRE DE: CAVELIER PERDOMO Y CAVELIER, POR EL DE: CAVELIER ABOGADOS, E INTRODUJO OTRAS REFORMAS.

CERTIFICA:

CERTIFICA

QUE POR E.P.NO. 2.034 DE LA NOTARIA 6 DE SANTA FE DE BOGOTA DEL 18 DE ABRIL DE 1.995, INSCRITA EL 27 DE ABRIL DE 1.995 BAJO EL NO. 5.937 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD TRASLADO SU DOMICILIO DE LA CIUDAD DE SANTA FE DE BOGOTA D.C. AL MUNICIPIO DE TABIO (CUNDINAMARCA)..

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 7710 DE LA NOTARIA DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE 1984 BAJO EL NO. 1559 DEL LIBRO XIII, LA SOCIEDAD CAMBIO SU NATURALEZA JURIDICA DE SOCIEDAD COMERCIAL A SOCIEDAD CIVIL.

CERTIFICA:

REFORMAS:

ESCRITURAS NO.

FECHA

NOTARIA

842

10-V-1.977

18. BTA.

27-V-1.977-NO. 46.204

3.430

1-VII-1.980

6A. BTA.

3-IX-1.980-NO. 89.582

4.844

10-IX-1.980

6A. BTA.

8-X-1.980-NO. 91.261

432

10-II-1.983

6A. BTA.

1-III-1.983-NO.129.337

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.E.H.A.O. CONSTA QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

18 ENE. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIO



7.710	10-X-1.984	6A. BTA.	15-XI-1.984-NO.	1.559
7.305	21-X-1.985	6A. BTA.	18-XI-1.985-NO.	1.906
2.567	29-IV-1.987	6A. BTA.	7-V- 1.987-NO.	2.386
4.278	3-VII-1.987	6A. BTA.	23-VII-1987 NO.	215.652
2.657	25- IV-1.988	6A. BTA.	19- V -1988-NO.	2,740
9.033	21-XII-1.990	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.786
25	3- I -1.991	6A. BTA.	10- I - 1991-NO.	3.787
1.608	8-III-1.991	6A. BTA.	14-III- 1991-NO.	3.841
2.155	2-IV- 1.991	6A. BTA.	8-IV - 1991-NO.	3.862
797	7-II -1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.882
1.739	14-III-1.991	6A. BTA.	7- V -1991-NO.	3.881
5.886	21-VIII-1.991	6A. BTA.	27-VIII-1991 NO.	4.019
8.596	4-XII -1.991	6A. BTA.	16-III -1992 NO.	4.430
1.494	10-III -1.992	6A. BTA.	19-III -1992 NO.	4.436
4.205	8 -VII -1.992	6A. BTA.	15-VII -1992 NO.	4.554
8.829	16-XII -1.992	6A. BTA.	24-XII -1992 NO.	4.819
12	5-I -1.993	6 STAFE BTA	13-I -1993 NO.	4.850
4.877	29-VI -1.993	6 STAFE BTA	7-VII -1993 NO.	5.065
5.216	12-VII -1.993	6 STAFE BTA	16-VII -1993 NO.	5.077
ACTA NO. 71	2-IX- 1.993	JUNTA DE SOCIOS	29-IX- 1993 NO.	5.174
2.034	18-IV- 1.995	6 STAFE BTA	27- IV -1995 NO.	5.937
2.227	25-IV-1.995	6 STAFE BTA	18-VIII-1.995 NO.	6.092
7.594	12-XII-1.995	6 STAFE BTA	19- XII-1.995 NO.	6.294
676	11- II-1.997	6 STAFE BTA	14- II -1.997 NO.	6.873

CERTIFICA:

REFORMAS:

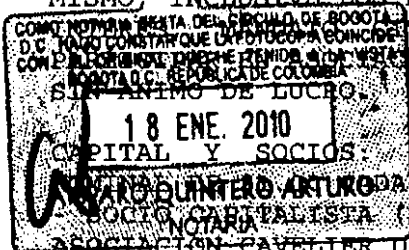
E.P. NO.	FECHA	NOTARIA	CIUDAD	FECHA	NO. INSC.
0004506	1997/07/28	0006	BOGOTA D.C.	1997/09/02	00007115
0002103	1998/04/08	0006	BOGOTA D.C.	1998/04/21	00007426
0005326	1998/08/06	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/13	00007544
0005538	1998/08/14	0006	BOGOTA D.C.	1998/08/27	00007564
0007760	1998/11/10	0006	BOGOTA D.C.	1998/11/12	00007644
0006709	1997/11/04	0006	BOGOTA D.C.	2000/12/04	00008481
0003034	2003/05/30	0006	BOGOTA D.C.	2003/06/04	00882729
0003786	2004/07/16	0006	BOGOTA D.C.	2004/07/28	00009703
0001432	2005/03/18	0006	BOGOTA D.C.	2005/04/07	00009917
0004818	2005/08/22	0006	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
0005506	2007/07/17	0006	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
5453	2009/10/19	0006	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL 10 DE SEPTIEMBRE DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO SOCIAL: LA SOCIEDAD TENDRA POR OBJETO : EL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD PROFESIONAL DE ABOGADOS. EN DESARROLLO DE ESTE OBJETO LA SOCIEDAD PODRA ADQUIRIR, CONTRAER OBLIGACIONES Y CELEBRAR TODA CLASE DE CONTRATOS DIRECTAMENTE RELACIONADOS Y SUBORDINADOS AL MISMO, INCLUSIVE LOS DE ARRENDAMIENTO, HIPOTECA, MUTUO CON O SIN



CERTIFICA:
CAPITAL Y SOCIOS: \$10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR UNA, DISTRIBUIDO ASI :
SOCIOS CAPITALISTA (\$)
ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO

N.I.T. 000008001722568



01



* 8 8 2 2 6 8 8 6 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

R027136832

PAGINA: 2 de 3

NO. CUOTAS: 8,800.00	VALOR: \$8,800.00
GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE	C.E. 000000000131100
NO. CUOTAS: 1,200.00	VALOR: \$1,200.00
- SOCIO INDUSTRIAL (S)	
CHAVARRO JORGE	C.C. 000000016209380
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
SUAREZ DE PAEZ LUZ CLEMENCIA	C.C. 000000035456344
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
PEÑA VALENZUELA DANIEL	C.C. 000000079518915
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
MARIN RUALES GERMAN HUMBERTO	C.C. 000000079155665
NO. CUOTAS: 0.00	VALOR: \$0.00
TOTALES	
NO. CUOTAS: 10,000.00	VALOR: \$10,000.00

CERTIFICA:

QUE POR ESCRITURAS PUBLICAS NO. 001431 Y 001432 DEL 18 DE MARZO DE 2005 DE LA NOTARIA 06 DE BOGOTA D.C., INSCRITA EL 07 DE ABRIL DE 2005 BAJO EL NO. 0009918 Y 0009917, RESPECTIVAMENTE DEL LIBRO XIII, DE LAS MIL DOSCIENTAS (1200) PARTES DE INTERES SOCIAL RADICADAS EN CABEZA DE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER, SEISCIENTAS (600) PARTES ESTAN GRAVADAS O AFECTADAS EN PROPIEDAD FIDUCIARIA A FAVOR DE LAS SIGUIENTES PERSONAS : GERMAN CAVELIER FRANCO, ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRANCO, INES CAVELIER FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA CAVELIER FRANCO, ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIER FRANCO, Y LUCIA CAVELIER FRANCO.

CERTIFICA:

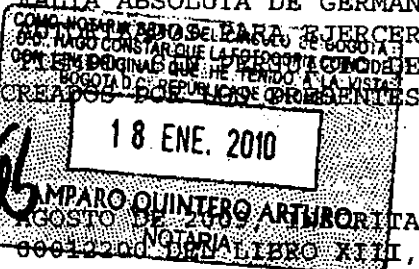
REPRESENTACION LEGAL: EL REPRESENTANTE LEGAL ES EL DIRECTOR. EL SOCIO FUNDADOR GERMAN CAVELIER GAVIRIA TENDRA EL CARACTER DE PRESIDENTE DIRECTOR VITALICIO, PARTICIPARA POR DERECHO PROPIO EN EL CONSEJO SUPERIOR Y EN EL CONSEJO DIRECTIVO Y LLEVARA LA REPRESENTACION LEGAL DE LA SOCIEDAD CUANDO LO ESTIME PERTINENTE SIN LIMITACION ALGUNA. IGUAL PARTICIPACION Y ATRIBUCIONES TENDRA SU SUPLENTE AGNES GAUDEBERT DE CAVELIER CUANDO OCUPE EL CARGO, EN CASO DE FALTA ABSOLUTA DE GERMAN CAVELIER GAVIRIA. LOS SOCIOS COLECTIVOS ESTAN EN LA REPRESENTACION DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER LAS DELEGACIONES CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES ESTATUTOS

CERTIFICA:

** NOMBRAMIENTOS **

QUE POR NO. 12 DE JUNTA DE SOCIOS DEL 14 DE AGOSTO DE 2009 BAJO EL NUMERO 00012200 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE	IDENTIFICACION
DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)	



C.C. 000000019066425

NOMBRE

IDENTIFICACION

CAVELIER GAVIRIA GERMAN

C.C. 000000002877924

GAUDEBERT DE CAVELIER AGNES JEANNE

C.E. 0000000000131100

CERTIFICA:

FACULTADES DEL REPRESENTANTE LEGAL: APARTE DE LAS FACULTADES Y DEBERES QUE DE TIEMPO EN TIEMPO SE LE ASIGNEN POR EL CONSEJO SUPERIOR, EL DIRECTOR TENDRA LAS SIGUIENTES FUNCIONES : A) LA DE REPRESENTAR LEGALMENTE A LA SOCIEDAD ANTE LAS AUTORIDADES DE CUALQUIER ORDEN O NATURALEZA Y ANTE OTRAS PERSONAS NATURALES O JURIDICAS, CON FACULTADES PARA NOVAR, TRANSIGIR, COMPROMETER Y DESISTIR Y PARA COMPARECER EN JUICIOS INCLUSIVE EN AQUELLOS EN DONDE SE DISPUTE LA PROPIEDAD DE BIENES INMUEBLES; B) CUMPLIR Y HACER CUMPLIR LOS ESTATUTOS Y REGLAMENTOS DE LA SOCIEDAD; Y C) CREAR O SUPRIMIR TODOS LOS EMPLEOS QUE SEAN NECESARIOS DE ACUERDO CON EL CONSEJO SUPERIOR PARA EL BUEN FUNCIONAMIENTO DE LA SOCIEDAD, ASIGNARLES FUNCIONES, FIJAR SUS SALARIOS Y NOMBRAR LAS PERSONAS QUE DEBAN DESEMPEÑARLOS, ASI COMO RETIRARLOS Y REEMPLAZARLOS CUANDO HAYA LUGAR. CUANDO CUALQUIERA DE LOS ACTOS INDICADOS EN LA CLAUSULA ANTERIOR SE REFIERA A OPERACIONES CUYO MONTO EXCEDA DE LA SUMA EQUIVALENTE A CIENTO OCHENTA (180) SALARIOS MINIMOS MENSUALES, SU CELEBRACION REQUERIRA LA APROBACION PREVIA DEL CONSEJO SUPERIOR.

CERTIFICA:

**** REVISOR FISCAL ****

QUE POR ACTA NO. 0000071 DEL 2 DE SEPTIEMBRE DE 1993, INSCRITA EL 29 DE SEPTIEMBRE DE 1993 BAJO EL NUMERO 00005175 DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE

IDENTIFICACION

REVISOR FISCAL

RINCON FANDIÑO MIGUEL ALFONSO

C.C. 000000002877024

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO AQUI CERTIFICADOS QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE REPOSICION DE LA FOTOCOPIA CONFORME A LA LEY 962 DE 2005.

COMO NOTAR EN OTRA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAYO COMETA QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE ME TRINDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

* 18 ENE. 2010

ESTE CERTIFICADO NO CONSTITUYE PERMISO DE
FUNCIONAMIENTO EN NINGUN CASO

★ ★ ★
★ ★ ★

EMPARGO QUINTERO ARTURO
EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,
NOTARIA

NOTARIA



01



* 8 8 2 2 6 8 8 7 *

CAMARA DE COMERCIO DE BOGOTA

SEDE CHAPINERO

17 DE DICIEMBRE DE 2009 HORA 11:11:00

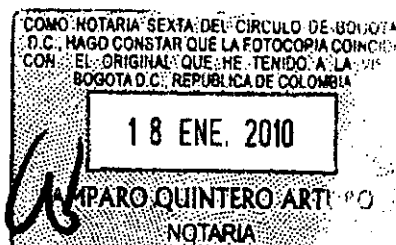
R027136832

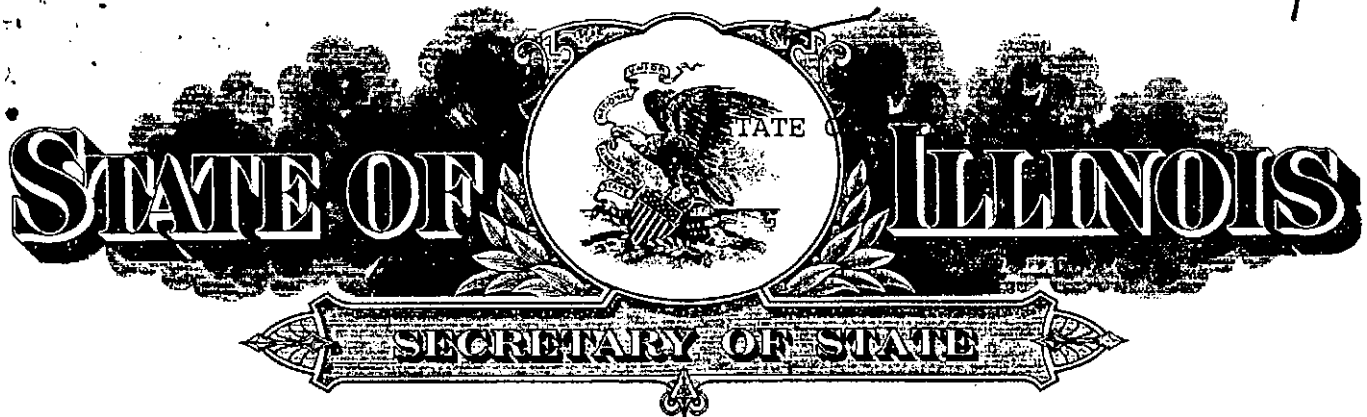
PAGINA: 3 de 3

VALOR : \$ 3,500

DE CONFORMIDAD CON EL DECRETO 2150 DE 1995 Y LA AUTORIZACION IMPARTIDA POR LA SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO, MEDIANTE EL OFICIO DEL 18 DE NOVIEMBRE DE 1996, LA FIRMA MECANICA QUE APARECE A CONTINUACION TIENE PLENA VALIDEZ PARA TODOS LOS EFECTOS LEGALES

Esteban Q





SPRINGFIELD, ILLINOIS
APOSTILLE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by AIDA BLEKHMAN
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, COOK COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

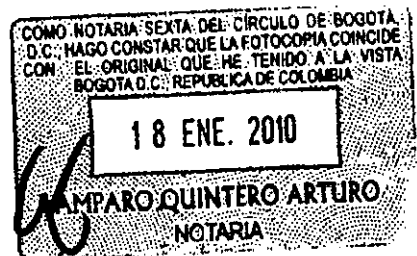
Certified

5. Chicago, Illinois
6. NOVEMBER 16, 2009
- 7.
8. by the Secretary of State, State of Illinois
9. No. C09TJ20887
10. Seal/Stamp:

10. Signature:

Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS



CAVELIER

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, B - COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

BAXTER HEALTHCARE S.A.

domiciliado (s)
en/of Thurgauerstrasse 130 8152, Glattpark (Opfikon), Switzerland

Por el presente nombramos a CAVELIER ABOGADOS, sociedad colectiva constituida de conformidad con las leyes de la República de Colombia, mediante Escritura Pública No. 6233 del 10 de septiembre de 1974, otorgada en la Notaría Sexta del Circuito de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a N° 72-35, Bogotá, Colombia, como nuestra representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

CAVELIER ABOGADOS también podrá representarnos, con las mismas facultades arriba indicadas, ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, autoridades administrativas o jurisdiccionales, tribunales de arbitramento, en asuntos de naturaleza civil, comercial, penal, constitucional, competencia, competencia desleal, administrativa, contencioso administrativa, protección del consumidor, variedades vegetales, nombres de dominio, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, acciones de tutela, la protección de secretos industriales, derecho regulatorio y en general para que nos represente en cualesquiera acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan.

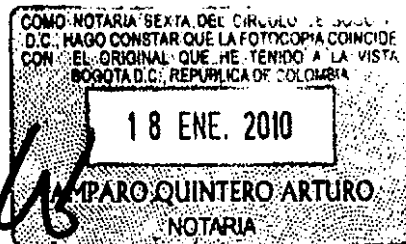
La representante podrá, en nuestro nombre, designar apoderados para actuar ante autoridades administrativas y judiciales, por vía extrajudicial y también procesalmente en nuestro nombre, como demandantes, como demandados, como litisconsortes, como agentes oficiosos, como terceros, por llamamiento en garantía o como intervinientes ad excludendum. Dentro de esta autorización, la representante podrá facultar a los apoderados que ella designe para transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir,

○ CAVELIER ABOGADOS

Do hereby appoint CAVELIER ABOGADOS, a general partnership organized under the laws of the Republic of Colombia by means of Public Deed No. 6233 of September 10, 1974, granted at Notary Sixth of the Bogota Circuit, domiciled in Bogota D.C., with Mercantile Registration No. 00820237 and Taxpayer Identification Number 860041367-3, domiciled at Carrera 4a N° 72-35, Bogota, Colombia, as our representative for all Industrial Property matters with faculty to receive notifications and appoint attorneys in and out of Court.

CAVELIER ABOGADOS may also represent us, with the same faculties stated above, before any entities or persons, with or without jurisdiction, administrative or jurisdictional authorities, courts of arbitration, in civil, commercial, criminal, constitutional, competition, unfair competition, administrative, administrative contentious, consumer protection, plant varieties, domain names, opposition or observation matters, administrative and Court cancellation, nullity, precautionary measures, licensing, action for writ mandamus, protection of trade secrets, regulatory law and in general represent us in any actions and suits instituted by us or against us.

The representative may, in our name, designate attorneys to act before administrative and judicial authorities, through out-of-court channels, and also procedurally in our name as plaintiff, defendant, joint litigant, representative without power of attorney, third party, when summoned to appear in court or as intervener ad excludendum. Under this authorization, the representative may empower the attorneys appointed thereby to compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign and substitute the



renunciar y sustituir el poder que se le otorgue. Así mismo, la representante tendrá la facultad para revocar el poder así otorgado en el momento que considere pertinente. La representante en todo caso podrá ratificar los actos de agentes oficiosos.

power of attorney granted thereto. Likewise, the representative shall have the faculty of revoking the power of attorney thus granted at any time it may deem convenient. The representative may in any case ratify the acts of representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____

En/in Deerfield, Illinois

Por/by John W. Cornell

Firma/Signature

John W. Cornell

Note:

PARA SOCIEDADES

El documento de Representación deberá ser firmado por el representante legal de la compañía, autenticado ante Notario Público y legalizado*.

El Notario deberá certificar: i) que la compañía existe; ii) que ejerce su objeto social; y iii) que la persona que firma está autorizada para otorgar este documento.

*La legalización podrá ser por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

PARA PERSONAS NATURALES

El documento de Representación deberá ser firmado por el otorgante. El Notario Público deberá certificar que la persona que firma es quien dice ser.

Posteriormente el documento de Representación deberá ser legalizado por Apostilla si el país del otorgante hace parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961 o ante el Cónsul de Colombia en caso contrario.

Note:

FOR CORPORATIONS

The Representation document ought to be signed by the legal representative of the company, notarized and legalized*.

The Notary Public must certify: i) that the company legally exists; ii) that it is in exercise of its corporate purposes; and iii) that the person who signs the Representation document is authorized to do so.

* Legalization may be made by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961, or before the Colombian Consulate if otherwise.

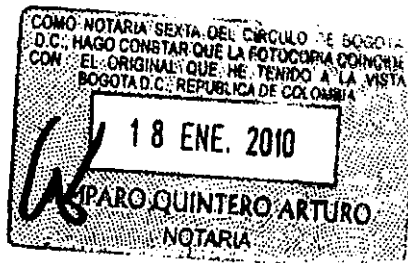
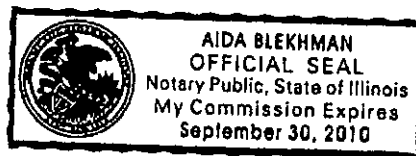
FOR INDIVIDUALS

The Representation should be signed by the grantor. The Notary Public should certify that the person signing is who he/she purports to be.

Subsequently, the Representation document should be legalized by Apostille if the issuing country is a member of the The Hague Convention of October 5, 1961 or before the Colombian Consulate if otherwise.

Signed to before me on this 11th day of November, 2009.

Aida Blekman Notary Public



Baxter

Opfikon, December 3, 2009

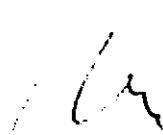
To Whom It May Concern,

John W. Cornell is Assistant General Counsel - Intellectual Property for Baxter Healthcare Corporation and as such a portion of his responsibilities are to represent all Baxter entities worldwide regarding IP matters.

It is in this capacity that John W. Cornell was given authority, via Power of Attorney, to sign any and all pertinent documents for the business.

Thank you.

Sincerely,

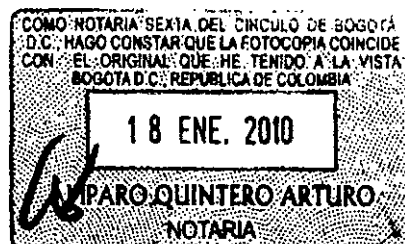

Ignacio Martínez de Lecea
Sr. Counsel



Mwanajuma P. Lugogo
Corporate Counsel



Baxter Healthcare SA
P.O. Box / 8010 Zurich / Switzerland
T +41 44 878 60 00 F +41 44 878 63 50
www.baxter.com



Official Certification

Seen for authentication of reverse side signatures of

Mr. Ignacio MARTINEZ DE LECEA NOAIN, Nationality: Spain, in Zurich,
personally known to us,

Ms. Mwanajuma Pietrina LUGOGO, Nationality: Great Britain, in Seuzach,
identified by passport,

who are entered in the Register of Commerce of the Canton of Zurich as person with the right to
sign jointly by two (Ignacio Martinez de Lecea Noain) resp. as person with the right to sign jointly
by two (Mwanajuma Pietrina Lugogo) for the

Baxter Healthcare SA, corporation with registered head office in Opfikon.

The signature was acknowledged before us by an authorized third party.

The inspection of the commercial register has taken place directly before the official certification by
internet inquiry.

Wallisellen, 15th December 2009
BK no. 20792, 20793
Fee CHF 60.00



NOTARIAT WALLISELLEN

Roland Furrer, Deputy Notary Public



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Confederación Suiza, Cantón de Zurich
Confederação Suíça, Cantão de Zurique
El presente documento público / Este documento público

2. Ha sido firmado por Roland Furrer
foi assinado por

3. Actuando en calidad de Deputy Notary Public
na sua qualidade de

4. Se halla sellado/timbrado con/está previsto do selo/carimbo do (da)
Notariat wallisellen

Certificado

5. En/em 8030 Zurich/Zurique 6. El/no día 18. Dez. 2009

7. Por la Gobernación de El Cantón de Zurich
pela Gobernación do Estado do Cantão de Zurique

Con el número de folio 20075/2009

10. Firma/Assinatura

CHF 30

D. Brennwald

TRADUCCIÓN OFICIAL 010/2010 DE UN DOCUMENTO EN IDIOMA INGLÉS
REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL
APROBADO POR RESOLUCION 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976
EXPEDIDA POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA Y
DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES DE COLOMBIA, POR EL CUAL **BAXTER HEALTHCARE S.A.**
DOMICILIADA EN THURGAUERSTRASSE 130 8152, GLATTPARK
(OPFIKON), SUIZA, OTORGA REPRESENTACIÓN EN ASUNTOS
RELACIONADOS CON PROPIEDAD INDUSTRIAL A **CAVELIER ABOGADOS.**
DADO Y FIRMADO EN DEERFIELD, ILLINOIS, POR JOHN W. CORNELL.
FIRMADO ANTE MÍ HOY 11 DE NOVIEMBRE DE 2009.

AIDA BLEKHMEN, notario público

SELLO: AIDA BLEKHMEN, sello oficial, notario público, estado
de Illinois. Mi cargo vence el 30 de septiembre de 2010

ESTADO DE ILLINOIS
SECRETARIA DE ESTADO
SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. Este documento público ha sido firmado por AIDA BLEKHMEN
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, CONDOMINIO COOK
4. lleva el sello/estampilla del estado de ILLINOIS

CERTIFICADO

5. Chicago, Illinois
6. el 16 de noviembre de 2009
- 7.
8. por el secretario de estado, estado de Illinois
9. No. C09TJ20887

152198
Eduardo Calado
SECRETARIO DE ESTADO
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
NOTARIO PUBLICO

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

2010 JAN 14 4 48
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.
NO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA
D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE
CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
18 ENE. 2010
PARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Eduardo Calado

10. SELLO DEL ESTADO DE ILLINOIS, 26 DE AGOSTO DE 1818

10. FIRMA: JESSE WHITE, SECRETARIO DE ESTADO, ESTADO DE ILLINOIS.

MEMBRETE: BAXTER

BAXTER HEALTHCARE SA

P.O. BOX/8010 ZURICH, SUIZA

www.baxter.com

Opfikon, 3 de diciembre de 2009

A quien corresponda:

John W. Cornell es el abogado asistente general para propiedad intelectual para BAXTER HEALTHCARE CORPORATION y en su calidad de tal, parte de sus responsabilidades consisten en representar todas las entidades de BAXER en todo el mundo en asuntos relacionados con propiedad intelectual.

En esta calidad a JOHN W. CORNELL se le ha conferido autoridad, mediante un poder, para firmar todos los documentos relacionados con este negocio.

Gracias

Atentamente,

FIRMADO: IGNACIO MARTINEZ DE LECEA

ABOGADO PRINCIPAL

FIRMADO: MWANAJUMA P. LUGOGO, ABOGADO EMPRESARIAL

CERTIFICACIÓN OFICIAL

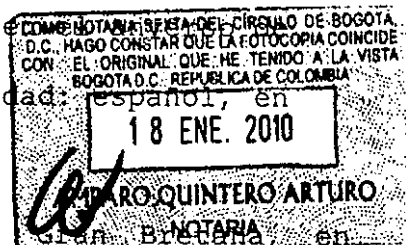
Vista para la autenticación de las firmas

IGNACIO MARTINEZ DE LECEA NOAIN, nacionalidad:

Zurich, conocido mío personalmente

MWANAJUMA PIETRINA LUGOGO, nacionalidad:

Seuzach, identificado con su pasaporte



Eduardo Calado N.

Quienes aparecen en el registro de comercio del cantón de Zurich como las persona que tienen derecho a firmar conjuntamente (dos) IGNACIO MARTINEZ DE LECEA NOAIN, como la persona con el derecho a firmar conjuntamente MWANAJUMA PIETRINA LUGOGO a nombre de BAXTER HEALTHCARE SA, sociedad cuyo domicilio registrado está en OPFIKON

La firma fue reconocida ante nosotros por un tercero autorizado.

La inspección del registro comercial ha sido realizada directamente ante la certificación oficial mediante una consulta por internet.

Wallisellen, 15 de diciembre de 2009

BK no. 20792, 20793

Honorarios. 60 francos suizos.

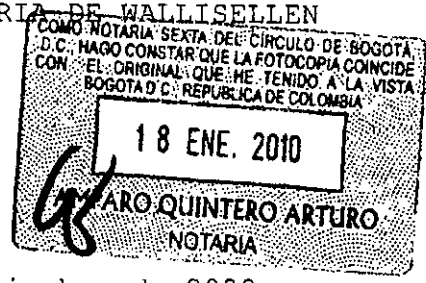
NOTARIA DE WALLISELLEN

FIRMADO: ROLAND FURRER, NOTARIO PÚBLICO SUPLENTE

APOSTILLA

(CONVENCION DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAIS: CONFEDERACIÓN SUIZA, CANTÓN DE ZURICH
2. Este documento público ha sido firmado por ROLAND FURRER
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO SUPLENTE
4. lleva el sello/estampilla de LA NOTARIA DE WALLISELLEN



CERTIFICADO

5. En 8090, ZURICH.
6. el 16 de diciembre de 2009
7. Por la Cancillería de Estado del Cantón de Zurich

Edmundo C. ...
TRAC ...

8. Con el número 28875/2009

9. Sello/estampilla: chf 30

10. Firma: D. BRENNWALD

COLO-13936-841-030-0

ECN\ECN\ID-163938\WPCL002G

Bogotá, 13 de enero de 2010.

Eduardo Calado

152191
Eduardo Calado
COLOMBIA
GOBIERNO NACIONAL
SECRETARÍA DE
RELACIONES EXTERIORES

MINISTERIO DE
RELACIONES
EXTERIORES

2010 JAN 14 A 9:49
[Signature]
JEF. DE LEVANTACIONES
BOGOTÁ D.C.

HO ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
BOGOTÁ D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA
18 ENE. 2010
[Signature]
CARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

26
27

AA 42874276



documento que está debidamente legalizado por el Notario Público del Estado de Illinois.-----

Presente el señor **CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO**, domiciliado en Bogotá, identificado como aparece al pie de su firma y manifestó que está conforme con el contenido de esta escritura

pública.-----

- HASTA AQUI LAS DECLARACIONES DEL INTERESADO -

"Se advirtió al otorgante de esta escritura de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total; en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma del otorgante y de la Notaria. En tal caso, estos deben ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial o por el actual titular del derecho y sufragados los gastos por los mismos (ARTICULO 35, DECRETO LEY 960 DE 1.970)".-----

LEIDO, el presente instrumento público por el otorgante y advertido de su Registro dentro del término legal, dio su asentimiento y en prueba de ello lo firma junto con la suscrita Notaria quien en esta forma lo autoriza.-----

DERECHOS \$ 42.860.00 -----

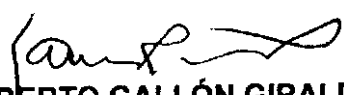
IVA 16% \$ 20.133.00 -----

El presente instrumento público se extendió y firmó en las hojas de papel notarial números: **AA / 42874273 - 42874276** -----

ENMENDADO: "140" SI VALE.






CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO
C.C. 19.066.428 BLI
TEL. 2116402



Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**



AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA (6ª.) DE BOGOTÁ, D.C.

BRL. POD GEN. CAVELIER BAXTER/10.-



ES FIEL Y TREINTA Y TRES COPIA (FOTOCOPIA), TOMADA DE LA ESCRITURA PUBLICA NUMERO 140 DE FECHA 18 DE ENERO DE 2010.

COPIA QUE EXPIDO CON DESTINO AL INTERESADO EN 11 HOJAS RUBRICADAS EN SUS MARGENES, LA CUAL CARECE DE NOTAS DE REVOCATORIA, MODIFICACION O SUSTITUCION, POR TANTO SE PRESUME VIGENTE EL PODER EN ELLA CONTENIDO.

BOGOTA, D.C. 21 DE DICIEMBRE DE 2011

RESOLUCION 01 DE 2008

POR LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.



AMPARO QUINTERO ARTURO.
NOTARIA SEXTA (6ta). DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 December 2010 (02.12.2010)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2010/138736 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/06 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/036430

(22) International Filing Date:
27 May 2010 (27.05.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/181,606 27 May 2009 (27.05.2009) US

(71) Applicants (for all designated States except US): **BAXTER INTERNATIONAL INC.** [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015 (US). **BAXTER HEALTHCARE S.A.** [CH/CH]; Thurgauerstrasse 130, CH-8152 Glattpark (Opfikon) (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **TESCHNER, Wolfgang** [DE/AT]; Gestettengasse 19/14, A-1030 Wien (AT). **BUTTERWECK, Harald Arno** [AT/AT]; Telefonweg 3/4/1, A-1220 Wien (AT). **PLJEVLJAKOVIC, Azra** [AT/AT]; Ottakringerstr. 94/22, A-1170 Wien (AT). **BAUER, Theresa Friederike** [AT/AT]; Rotensterngasse 15B/13, A-1020 Wien (AT). **KOELBL, Bernhard** [AT/AT]; Hintausstrasse 20/5, A-2481 Achau (AT). **SCHWARZ, Hans-Peter** [AT/AT]; Weimarer Strasse 76, A-1180 Vienna (AT). **NIKOLIC, Nebojsa** [AT/AT]; Prechtlgasse 2A/8, A-1090 Wien (AT). **POLSLER, Gerhard** [AT/AT]; Nordwestbahnstrasse 101/1/39, A-1200 Wien (AT). **KINDERMANN, Johanna** [AT/AT]; Doobrastr. 8, A-2344 Maria Enzersdorf (AT).

(74) Agents: **PARENT, Annette, S. et al.**; Townsend and Townsend and Crew LLP, Two Embarcadero Center, Eighth Floor, San Francisco, California 94111-3834 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

(88) Date of publication of the international search report:
17 March 2011



WO 2010/138736 A3

(54) Title: A METHOD TO PRODUCE A HIGHLY CONCENTRATED IMMUNOGLOBULIN PREPARATION FOR SUBCUTANEOUS USE

(57) Abstract: The present invention relates to a new and improved method for preparing a highly concentrated immunoglobulin composition from pooled plasma for subcutaneous injection. A composition comprising 20% or more immunoglobulin suitable for subcutaneous use is also described.

MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACIÓN ALTAMENTE CONCENTRADA DE INMUNOGLOBULINA DE USO SUBCUTÁNEO

REFERENCIAS A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisoria de los EEUU N° 61/181606, presentada el 27 de Mayo de 2009, que se incorpora expresamente en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Los productos de globulinas inmunes derivados de plasma humano fueron usados por primera vez en 1952 para tratar deficiencias inmunes. Inicialmente, la administración intramuscular o subcutánea de inmunoglobulina del isotipo G (IgG) era el método preferido. Sin embargo, para inyectar mayores cantidades de IgG, necesarias para un tratamiento efectivo de diversas enfermedades, se desarrollaron productos de administración intravenosa con IgG en menores concentraciones (50 mg/ml). Usualmente, la inmunoglobulina intravenosa (IVIG) contiene inmunoglobulinas G (IgG) combinadas del plasma de más de mil donantes de sangre. Típicamente contienen más de 95% de IgG no modificada, que tiene funciones efectoras dependientes de Fc intactas, y solamente cantidades traza de inmunoglobulina A (IgA) o de inmunoglobulina M (IgM). Las IVIG son productos de IgG purificados y estériles que se usan primariamente para tratar tres categorías principales de afecciones médicas: (1) las deficiencias inmunes, tales como la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, la hipogammaglobulinemia (deficiencias inmunes primarias), y las afecciones caracterizadas por una inmunidad comprometida adquirida (deficiencias inmunes secundarias), donde se observan niveles bajos de anticuerpos; (2) las enfermedades inflamatorias y autoinmunes; y (3) las infecciones agudas.

[0003] Varios productores comerciales de IVIG proveen diversos productos de IVIG. En comparación con los productos de IVIG liofilizados más antiguos, que solamente contienen 50 mg/ml de proteínas en solución una vez que se los redisuelve, los productos más recientes contienen 100 mg/ml de anticuerpos IgG

humanos altamente purificados y concentrados, en forma de preparaciones líquidas, estériles y listas para usar. Como los productos de IgG, tales como las IVIG, se manufacturan a partir de plasma humano combinado, la contaminación con patógenos provenientes de la sangre de los donantes (especialmente virus conocidos por provocar diversas enfermedades en el ser humano) es un problema serio en el proceso de producción. Otra consideración importante en los productos de IgG es su estabilidad durante el almacenamiento, especialmente como preparaciones listas para usar. En comparación con las IVIG, las preparaciones de inmunoglobulina de administración subcutánea tienen las ventajas de que es posible aplicarlas en un método de tratamiento en el hogar y que presentan menos efectos colaterales. Para compensar la desventaja del pequeño volumen de inyección por sitio, una IgG más concentrada (por ejemplo, que contuviera 200 mg/ml en lugar de 100 mg/ml) sería una opción clara.

[0004] En la cuarta parte de una serie de trabajos seminales publicados sobre la preparación y las propiedades de las proteínas del suero y el plasma, Cohn *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475) describieron primero métodos para realizar el fraccionamiento con alcohol de las proteínas del plasma (método 6), que permiten aislar una fracción enriquecida en IgG a partir de plasma humano. Varios años después, Oncley *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550) expandieron los métodos de Cohn al publicar un método (método 9) que resultaba en el aislamiento de una preparación de IgG más pura.

[0005] Estos métodos, que constituyen la base de toda la industria de los factores sanguíneos derivados del plasma, no permiten proveer preparaciones de IgG que tengan concentraciones suficientemente elevadas para el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con el sistema inmune, incluyendo el síndrome de Kawasaki, la púrpura trombocitopénica idiopática y las deficiencias inmunes primarias. Por lo tanto, se desarrollaron metodologías adicionales donde se emplean diversas técnicas, tales como la cromatografía de intercambio iónico, para proveer formulaciones de IgG de mayor pureza y con concentraciones más

elevadas. Hoppe *et al.* (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34): 1749-1752), Falksveden (Patente Sueca N° 348942) y Falksveden y Lundblad (*Methods of Plasma Protein Fractionation* 1980) estuvieron entre los primeros que emplearon la cromatografía de intercambio iónico para este propósito.

[0006] En diversos métodos modernos se emplea un paso de precipitación, tal como la precipitación con caprilato (Lebing *et al.*, *Vox Sang* 2003 (84):193-201) y la precipitación de las fracciones de Cohn (I+II+III) con etanol (Tanaka *et al.*, *Braz J Med Biol Res* 2000 (33)37-30), en combinación con una cromatografía en columna. Más recientemente, Teschner *et al.* (*Vox Sang*, 2007 (92):42-55) describieron un método para preparar un producto con 10% de IVIG donde primero se eliminan los crioprecipitados del plasma combinado y luego se lleva a cabo un fraccionamiento de Cohn-Oncley modificado con etanol en frío, seguido por el tratamiento del intermediario con S/D, una cromatografía de intercambio iónico, una nanofiltración, y opcionalmente una ultrafiltración/diafiltración.

[0007] Sin embargo, a pesar de la pureza, la seguridad y el rendimiento mejorados que proveen estos métodos para manufacturar IgG, aún se necesitan preparaciones concentradas de IgG, apropiadas para la administración subcutánea y/o intramuscular. La presente invención satisface estas y otras necesidades, y en ella se describe un método para manufacturar un producto estable, altamente purificado, con los virus inactivados y listo para usar, que tiene una concentración elevada de IgG.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

[0008] En un aspecto, en la presente invención se provee una composición acuosa que comprende más de aproximadamente 180 gramos de proteínas por litro de la composición, y donde al menos 95% de las proteínas son IgG, tal como IgG humana. En algunas formas de realización, la composición se produce con un proceso que da como resultado un producto apropiado para una administración subcutánea e intravenosa, y que puede tratarse a una temperatura elevada en el recipiente final para inactivar los virus, independientemente del ajuste de la

concentración de proteínas en un rango de entre 10 y 22%. En algunos casos, la concentración de proteínas en la composición es de exactamente o aproximadamente 20% (p/v). En otros casos, la composición también puede comprender glicina aproximadamente 0,1-0,3 M. La composición de esta invención puede tener un pH variable, tal como aproximadamente 3-6 o aproximadamente 4-6.

[0009] En otro aspecto, en esta invención se provee un método para preparar una composición de IgG concentrada a partir de plasma, donde la mejora comprende los siguientes pasos: (1) concentrar las proteínas en una preparación de plasma hasta aproximadamente 5% (p/v) por ultrafiltración; y (2) concentrar aun más las proteínas en la preparación, hasta aproximadamente 20% (p/v), por diafiltración. Al menos 95% de las proteínas en la composición mencionada son IgG, tal como IgG humana. En algunas formas de realización, el paso (1) se lleva a cabo usando una membrana de ultrafiltración con un límite nominal de peso molecular (NMWCO) de 100 kDa o menos. En otras formas de realización, el paso (2) se lleva a cabo contra un amortiguador de diafiltración de glicina con un pH de $4,2 \pm 0,1$. En algunos casos, el amortiguador de diafiltración comprende glicina 0,25 M y tiene un pH de 4,0. En algunas formas de realización particulares, la concentración de proteínas después del paso (2) es mayor que 20% (p/v), y subsiguientemente se ajusta en exactamente o aproximadamente 20% (p/v) con un amortiguador de diafiltración.

[0010] En otro aspecto, en la invención se provee un método para preparar una composición de IgG concentrada a partir de plasma, que comprende los siguientes pasos:

- (1) separar el líquido y el precipitado del plasma por centrifugación;
- (2) mezclar etanol enfriado con antelación con el líquido de (1) para formar una mezcla con una concentración de etanol de aproximadamente 8% (v/v);
- (3) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (2) por centrifugación;
- (4) ajustar el pH y la concentración de etanol del líquido de (3) en

aproximadamente 7,0 y 20-25% (v/v), respectivamente, con lo que se forma una mezcla;

- (5) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (4) por centrifugación;
- (6) suspender nuevamente el precipitado de (5) con un amortiguador, en una proporción de aproximadamente 1 a 15 en peso, para formar una suspensión;
- (7) mezclar dióxido de silicio (SiO_2) con la suspensión de (6) y obtener un filtrado por filtración;
- (8) mezclar un detergente y alcohol frío con el filtrado de (7) y obtener un precipitado por centrifugación;
- (9) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un solvente o un detergente, y mantener la solución durante al menos 60 minutos;
- (10) después de (9), hacer pasar la solución a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna, para obtener una fracción eluida;
- (11) hacer pasar la fracción eluida de (10) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente;
- (12) hacer pasar el efluente a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado;
- (13) hacer pasar el nanofiltrado a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado;
- (14) diafiltrar el ultrafiltrado contra un amortiguador de diafiltración para generar una solución con una concentración de proteínas de aproximadamente 20% (p/v);
y
- (15) esterilizar la solución de (14) filtrándola a través de un tamiz de $0,2\ \mu\text{m}$ o menos, de manera de obtener una composición de IgG concentrada.

[0011] En algunas formas de realización, el paso (2) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente entre -2 y 0°C ; o la mezcla del paso (2) se realiza durante al menos 15 minutos y luego se mantiene durante al menos 2 horas a una temperatura de aproximadamente entre -2 y 0°C . En algunas formas

de realización, en el paso (4), la mezcla se realiza durante al menos 15 minutos, y luego se mantiene la mezcla durante al menos 8 horas a una temperatura de exactamente o aproximadamente -7°C . En algunas formas de realización, la suspensión del paso (6) se agita durante aproximadamente 40-160 minutos a una temperatura de aproximadamente entre 2°C y 8°C y un pH de exactamente o aproximadamente 5,0; o el dióxido de silicio en el paso (7) se halla en una concentración de 40 g/kg de la suspensión del paso (6), y la mezcla se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente entre 2 y 8°C durante al menos aproximadamente 50 minutos. En algunas formas de realización, el paso (8) se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente entre -5 y -10°C . En algunas formas de realización, la solución del paso (9) comprende 1,0% (v/v) de Triton X-100, 0,3% (v/v) de Tween-80 y 0,3% (v/v) de fosfato de tri-(n-butilo) (TNBP). En algunas formas de realización, la solución del paso (9) se mantiene a una temperatura de aproximadamente entre 18 y 25°C . En algunas formas de realización, la columna de cromatografía de intercambio catiónico del paso (10) se lava con un amortiguador de acetato 10 mM con un pH de $5,5 \pm 0,1$, y se eluye con un amortiguador de fosfato de sodio monobásico 35 mM, Tris 10 mM, con un pH de $8,5 \pm 0,1$ y una conductividad de $5,0 \pm 0,2$ mS/cm. En algunas formas de realización, el pH de la fracción eluida del paso (10) se ajusta en $6,4 \pm 0,2$, y su conductividad se ajusta en aproximadamente entre 1,5 y 2,5 mS/cm antes del paso (11). En algunas formas de realización, el efluente del paso (11) se hace pasar a través de un filtro con poros de un tamaño de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ o menor antes del paso (12). En algunas formas de realización, el ultrafiltrado del paso (13) tiene una concentración de proteínas de exactamente o aproximadamente $5 \pm 1\%$ (p/v). En otras formas de realización, la membrana de ultrafiltración del paso (13) tiene un límite nominal de peso molecular (NMWCO) de 50 kDa o menos. En algunas formas de realización, el amortiguador de diafiltración del paso (14) es una solución de glicina 0,25 M con un pH de $4,2 \pm 0,1$. En otras formas de realización, la solución del paso (14) tiene una concentración de proteínas mayor que 20%

(p/v), que subsiguientemente se ajusta en exactamente o aproximadamente $20,4 \pm 0,4\%$ (p/v) con el amortiguador de diafiltración. En algunas formas de realización, los pasos (13) y (14) se llevan a cabo a una temperatura de aproximadamente entre 2 y 8°C. En otras formas de realización, el método de preparación también comprende el paso de colocar la solución esterilizada del paso (15) en recipientes bajo condiciones estériles, antes de sellar dichos recipientes.

[0012] En otras formas de realización, el método descrito con anterioridad también puede comprender el paso de almacenar los recipientes sellados a aproximadamente 30-32°C durante aproximadamente 21-22 días, o el método también puede comprender un paso de formulación para tornar el producto con 20% de IgG tan estable como la formulación intravenosa al 10% usada en la actualidad.

[0013] En aun otro aspecto, en esta invención se provee una composición acuosa que se produce con el método de preparación descrito con anterioridad y que comprende al menos 18% (p/v) de inmunoglobulina, por ejemplo, al menos 20% (p/v) de inmunoglobulina.

[0014] En otro aspecto, en la presente invención se provee un método para tratar un paciente que sufre una inmunodeficiencia, una enfermedad autoinmune o una infección aguda, que comprende administrarle al paciente una cantidad eficaz de la composición descrita con anterioridad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0015] La figura 1 es una ilustración gráfica del nuevo sistema de ultrafiltración/diafiltración.

DEFINICIONES

[0016] Un "anticuerpo" hace referencia a un polipéptido que sustancialmente está codificado por un gen de inmunoglobulina o por varios genes de inmunoglobulina, o por fragmentos de éstos, que reconoce específicamente un analito (antígeno) y se une a él. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu, así como

los diversos genes de las regiones variables de las inmunoglobulinas. Las cadenas livianas se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de las inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

[0017] Un ejemplo de una unidad estructural de inmunoglobulina (un anticuerpo) está compuesto por dos pares de cadenas de polipéptidos, donde cada par tiene una cadena "liviana" (de aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente entre 100 y 110 aminoácidos o más, que es la responsable primaria del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena liviana variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) hacen referencia a estas cadenas liviana y pesada, respectivamente.

[0018] El término "ultrafiltración (UF)" abarca una variedad de métodos de filtración por membrana donde se fuerza un líquido a través de una membrana semipermeable con presión hidrostática. Se retienen los sólidos suspendidos y los solutos de mayor peso molecular, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este proceso de separación frecuentemente se usa para purificar y concentrar soluciones macromoleculares (de 10^3 - 10^6 Da), especialmente soluciones de proteínas. Hay diversos tipos de membranas de ultrafiltración disponibles, dependiendo del tamaño de las moléculas que retienen. La ultrafiltración típicamente se caracteriza por membranas con poros con tamaños de entre 1 y 1000 kDa y por presiones de operación de entre 0,01 y 10 bares, y es particularmente útil para separar coloides, por ejemplo, proteínas, de moléculas pequeñas, tales como azúcares y sales.

[0019] La "diafiltración" se lleva a cabo con las mismas membranas que la ultrafiltración, y se trata de una filtración con flujo tangencial. Durante la diafiltración, el amortiguador se introduce en el tanque de reciclado mientras el filtrado se retira de la unidad de operación. En los procesos donde el producto está en la fracción retenida (por ejemplo, la IgG), la diafiltración permite separar los

componentes del producto combinado por lavado, para llevarlos al filtrado, con lo que se intercambian los amortiguadores y se reduce la concentración de especies indeseables.

[0020] Como se lo usa en la presente, el término "aproximadamente" denota un rango aproximado de más o menos 10% respecto de un valor especificado. Por ejemplo, el término "aproximadamente 20%" abarca un rango de 18-22%.

[0021] El término "mezcla" describe la acción de provocar una distribución pareja de dos o más compuestos o sustancias diferentes en una solución o en una suspensión, por medio de cualquier forma de agitación. De la manera que se interpreta el término en esta solicitud, no es necesario que tenga lugar una distribución completamente pareja de todos los ingredientes en una solución o en una suspensión.

[0022] En esta solicitud, el término "solvente" abarca cualquier sustancia líquida capaz de disolver o dispersar una o más sustancias adicionales. Un solvente puede ser de naturaleza inorgánica, tal como el agua, o puede ser un líquido orgánico, tal como el etanol, la acetona, el acetato de metilo, el acetato de etilo, el hexano, el éter de petróleo, etcétera. Como se lo usa en la presente, el término "tratamiento con solvente detergente" hace referencia a un solvente orgánico (por ejemplo, fosfato de tri-N-butilo) que es parte de la mezcla solvente detergente usada para inactivar los virus recubiertos con lípidos en la solución.

[0023] Como se lo usa en la presente, el término "detergente" es sinónimo de los términos "agente tensioactivo" y "agente con actividad en superficie". Los agentes tensioactivos típicamente son compuestos orgánicos anfifílicos, es decir, contienen grupos hidrofóbicos ("colas") y grupos hidrofílicos ("cabezas"), que tornan los agentes tensioactivos solubles en solventes orgánicos y en agua. Un agente tensioactivo puede clasificarse en función de la presencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un agente tensioactivo no iónico no tiene grupos cargados en su cabeza, mientras que un agente tensioactivo iónico tiene una carga neta en su cabeza. Un agente tensioactivo zwitteriónico contiene una

cabeza con grupos con cargas opuestas. Algunos ejemplos de agentes tensioactivos comunes incluyen los agentes tensioactivos aniónicos (basados en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato), por ejemplo, perfluorooctanoato (PFOA o PFO), perfluorooctanosulfonato (PFOS), dodecil sulfato de sodio (SDS), lauril sulfato de sodio y otras sales de alquil sulfatos, lauret sulfato de sodio (también conocido como lauril éter sulfato de sodio o SLES), alquil bencenosulfonato; agentes tensioactivos catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario), por ejemplo, bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), también conocido como bromuro de hexadecil trimetil amonio, y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), seboamina polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de benzetonio (BZT); ácidos grasos de cadena larga y sus sales, incluyendo caprilato, ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico y semejantes; agentes tensioactivos zwitteriónicos (anfotéricos), por ejemplo, dodecil betaína; cocamidopropil betaína; coco anfo glicinato; agentes tensioactivos no iónicos, por ejemplo, alquil poli(óxido de etileno), alquilfenol poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de polipropileno) (conocidos comercialmente como poloxámeros o poloxaminas), alquil poliglucósidos, incluyendo octil glucósido, decil maltósido, alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocoamida MEA, cocoamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etcétera), detergentes Triton y óxido de dodecil dimetilamina.

[0024] Como se lo usa en la presente, el término tratamiento con “IgG intravenosa” o “IVIG” generalmente hace referencia a un método terapéutico que comprende la administración intravenosa, subcutánea o intramuscular de una composición de inmunoglobulinas IgG a un paciente, con el objeto de tratar diversas afecciones, tales como las deficiencias inmunes, las enfermedades inflamatorias y las enfermedades autoinmunes. Las inmunoglobulinas IgG típicamente se combinan y se preparan a partir del plasma. Pueden usarse anticuerpos completos o fragmentos de éstos. Las inmunoglobulinas IgG pueden formularse en mayores

concentraciones (por ejemplo, mayores que 10%) para la administración subcutánea, o pueden formularse para la administración intramuscular. Esto es particularmente común para las preparaciones de IgG especializadas, que se preparan con titulaciones mayores que el promedio para antígenos específicos (por ejemplo, el factor Rho D, la toxina de *Pertussis*, la toxina del tétanos, la toxina del botulismo, la rabia, etcétera). Para simplificar la descripción, estas composiciones de IgG formuladas para una administración subcutánea o intramuscular también se incluyen en el término "IVIG" en esta solicitud.

[0025] Una "cantidad o dosis eficaz para el uso terapéutico" o una "cantidad o dosis suficiente/eficaz" hacen referencia a una dosis que produce los efectos que se buscan con la administración. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y podrá ser determinada por aquellos versados en la técnica, usando procedimientos conocidos (véanse, por ejemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (volúmenes 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, 2003, Gennaro, editor, Lippincott, Williams & Wilkins, cuyas descripciones se incorporan a modo de referencia en la presente, en su totalidad y para todo propósito).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0026] Una práctica usual en la medicina moderna comprende usar preparaciones esterilizadas de inmunoglobulinas concentradas (especialmente IgG) para tratar afecciones médicas que se clasifican dentro de tres categorías principales: las deficiencias inmunes, las enfermedades inflamatorias y autoinmunes y las infecciones agudas. Un producto basado en IgG de uso frecuente, la inmunoglobulina intravenosa o IVIG, se formula para la administración intravenosa, por ejemplo, en una concentración de exactamente o aproximadamente 10%. Las inmunoglobulinas concentradas también pueden formularse para una administración subcutánea o intramuscular, por ejemplo, en una concentración de exactamente o aproximadamente 20%.

[0027] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método novedoso y mejorado para producir composiciones de inmunoglobulina altamente purificadas y concentradas a partir de plasma combinado. En comparación con los métodos de purificación y concentración de IgG usados con anterioridad, los inventores han incorporado pasos de ultrafiltración y formulación que dan como resultado una mayor concentración de IgG, sin una pérdida de IgG significativa, de manera de mantener simultáneamente un pH bajo en la formulación final. Típicamente, los productos tienen una concentración de proteínas de al menos 18% en peso/volumen (p/v), de las cuales la amplia mayoría (típicamente no menos 95%) son IgG, y un pH en el rango de 3-6, que facilita la inactivación de los patógenos, tales como los virus que pudieran estar presentes en el plasma. Debido a su concentración elevada de IgG, y en consecuencia, al volumen reducido necesario para la administración, los productos de esta invención son apropiados para la administración subcutánea y/o intramuscular. En algunas formas de realización, los productos de IgG tienen una viscosidad no mayor que 18 mPascal/segundo, por lo que también pueden ser apropiados para la administración intravenosa. Debido a la posibilidad de combinar los atributos de calidad para los productos de administración intravenosa con la concentración elevada necesaria para los productos de administración subcutánea e intramuscular, es posible efectuar una administración intravenosa por medio de una dilución simple también. Otra ventaja de la composición de IgG de esta invención es que posee una estabilidad excelente durante el almacenamiento.

[0028] En determinados aspectos, en la presente invención se proveen métodos para preparar una preparación de IgG altamente concentrada, con concentraciones finales de proteínas mayores que aproximadamente 17%, y con una IgG con una pureza de al menos aproximadamente 95%. En determinadas formas de realización, la preparación presenta una estabilidad extendida y se formula para una administración intravenosa, subcutánea y/o intramuscular.

[0029] En otro aspecto, en la presente invención se proveen composiciones y

formulaciones farmacéuticas de composiciones de IgG preparadas de acuerdo con las metodologías de manufactura mejoradas que se proveen en la presente. En determinadas formas de realización, estas composiciones y formulaciones proveen propiedades mejoradas en comparación con las de otras composiciones de IVIG disponibles actualmente en el mercado. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, las composiciones y las formulaciones que se proveen en la presente son estables durante un período de tiempo extendido. En otra forma de realización, las composiciones y las formulaciones que se proveen en la presente tienen una mayor concentración de IgG que las otras composiciones de IVIG disponibles actualmente en el mercado. En aun otras formas de realización, las composiciones y las formulaciones que se proveen en la presente pueden tener una mayor concentración de IgG y pueden ser estables durante un período de tiempo extendido.

[0030] En aun otro aspecto, en la presente invención se provee un método para tratar las deficiencias inmunes, las enfermedades inflamatorias y autoinmunes y las infecciones agudas que comprende la administración de una composición de IgG preparada usando los métodos mejorados que se proveen en la presente.

I. Producción de una preparación de IgG purificada y concentrada

[0031] Se han descripto composiciones de IVIG que comprenden anticuerpos completos para el tratamiento de determinadas afecciones autoinmunes (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes de los EEUU N° US 2002/0114802, US 2003/0099635 y US 2002/0098182). Las composiciones de IVIG que se describen en estas referencias incluyen anticuerpos policlonales.

[0032] En general, las preparaciones de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención pueden prepararse a partir de cualquier material de partida apropiado, por ejemplo, plasma recuperado o plasma en la fuente. En un ejemplo típico, se recolecta sangre o plasma de donantes saludables. Usualmente, la sangre se recolecta de una especie animal que es igual a la del sujeto al que se le administrará la preparación de inmunoglobulina (lo que típicamente se conoce

como inmunoglobulinas "homólogas"). Las inmunoglobulinas se aíslan de la sangre con procedimientos apropiados, tales como, por ejemplo, la precipitación (el fraccionamiento con alcohol o el fraccionamiento con polietilenglicol), los métodos de cromatografía (la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de inunoafinidad), la ultracentrifugación y la preparación por electroforesis, y semejantes (véanse, por ejemplo, Cohn *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Oncley *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Barundern *et al.*, *Vox Sang.* 7:157-74 (1962); Koblet *et al.*, *Vox Sang.* 13:93-102 (1967); las Patentes de los EEUU N° 5122373 y 5177194; cuyas descripciones se incorporan en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito).

[0033] A diferencia de los métodos que se describieron con anterioridad, en un aspecto de la presente invención, se proveen métodos para preparar composiciones de IgG concentradas donde se emplea un material de partida con bajo contenido de crioprecipitados. En general, en los métodos que se proveen en la presente se usan pasos de fraccionamiento con alcohol de Cohn-Oncley modificados y cromatografías de intercambio iónico para proveer rendimientos de IgG superiores, al tiempo que se mantiene una calidad igual o mayor que la de las preparaciones de IVIG disponibles comercialmente en la actualidad.

[0034] En muchos casos, la inmunoglobulina se prepara a partir de productos que contienen gammaglobulina producidos con métodos de fraccionamiento con alcohol y/o de cromatografía de intercambio iónico y de afinidad bien conocidos por aquellos versados en la técnica. El material de partida, la pasta de la fracción II de Cohn, típicamente comprende exactamente o aproximadamente 95 por ciento de IgG y está compuesta por cuatro subtipos de IgG. Los distintos subtipos están presentes en la fracción II aproximadamente en la misma proporción que en el plasma humano combinado del que se obtiene dicha fracción. La fracción II se somete a una purificación adicional antes de formular un producto para la administración. Por ejemplo, la pasta de la fracción II puede disolverse en una

solución alcohólica acuosa purificada y fría, para luego eliminar las impurezas por precipitación y filtración. Después de la filtración final, la suspensión de inmunoglobulina puede someterse a una diálisis o a una diafiltración (por ejemplo, usando membranas de ultrafiltración con un límite de peso molecular nominal menor o igual que 100000 daltons) para eliminar el alcohol. La solución puede concentrarse o diluirse para obtener la concentración deseada de proteínas, y luego puede purificarse una vez más de acuerdo con procedimientos conocidos por aquellos versados en la técnica.

[0035] Pueden usarse pasos de preparación adicionales para enriquecer la mezcla en un isotipo o un subtipo de inmunoglobulina particular. Por ejemplo, puede usarse una cromatografía en sefrosa con la proteína A, con la proteína G o con la proteína H para enriquecer una mezcla de inmunoglobulinas en IgG o en subtipos específicos de IgG (véanse en general Harlow y Lane, *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); y la Patente de los EEUU N° 5180810).

[0036] Como se describirá con mayor detalle más adelante, los productos con concentraciones elevadas de IgG de esta invención se producen con un proceso que tiene muchos de los pasos del proceso para producir IVIG, o que tiene pasos similares. Los pasos adicionales de ultrafiltración/diafiltración, donde se usan membranas con canales abiertos, más un lavado posterior y una formulación diseñados específicamente cerca del final del proceso de producción, le confieren a las composiciones de IgG resultantes una concentración de proteínas que es aproximadamente el doble (200 mg/ml) de la concentración de las IVIG usadas en la actualidad (por ejemplo, GAMMAGARD® LIQUID), sin afectar el rendimiento y la estabilidad durante el almacenamiento. Con la mayoría de las membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente, no es posible alcanzar una concentración de 200 mg/ml de IgG sin que haya pérdidas importantes de proteínas. Estas membranas serán bloqueadas rápidamente, por lo que será difícil

realizar un lavado posterior apropiado. Entonces, es necesario usar configuraciones de membranas con canales abiertos. Incluso con las membranas con canales abiertos, es necesario usar un procedimiento de lavado posterior diseñado específicamente para obtener la concentración necesaria, sin una pérdida significativa de proteínas (una pérdida menor que 2%). Resulta aun más sorprendente que la mayor concentración de proteínas, 200 mg/ml, no afecte la capacidad de inactivación de virus del paso de almacenamiento a bajo pH. El proceso general para producir la composición de IgG altamente concentrada incluye los pasos que se describirán a continuación.

A. Separación de los crioprecipitados

[0037] El proceso de purificación típicamente comienza con el descongelamiento del plasma combinado congelado, en el cual ya se ha evaluado la seguridad y los parámetros de calidad. El descongelamiento típicamente se efectúa a una temperatura no mayor que 6°C. Después de descongelar el plasma congelado a baja temperatura, se lleva a cabo una centrifugación en frío para separar el sólido y el líquido del plasma sometido al descongelamiento, usualmente a la misma temperatura reducida que se usa para el descongelamiento. Después, la porción líquida (que también conoce como el "plasma con bajo contenido de crioprecipitados" después de que se eliminan las proteínas insolubles en frío, por medio de una centrifugación a partir de plasma descongelado fresco) se procesa en el siguiente paso. En este momento, pueden llevarse a cabo diversos pasos adicionales para aislar la actividad de pasaje del inhibidor del factor ocho (FEIBA), el complejo del factor IX, el concentrado del factor VII o el complejo de la antitrombina III, que se describen en detalle en el ejemplo 1.

B. Obtención del sobrenadante del fraccionamiento I

[0038] En este paso, típicamente se enfría el plasma con bajo contenido de crioprecipitados a aproximadamente $0 \pm 1^\circ\text{C}$ y se ajusta su pH en exactamente o aproximadamente 7,0. En determinadas formas de realización, el pH se ajusta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5, preferiblemente entre

exactamente o aproximadamente 7,1 y exactamente o aproximadamente 7,3, más preferiblemente en exactamente o aproximadamente 7,2. En una forma de realización, el pH se ajusta en exactamente o aproximadamente 7,0. En otra forma de realización, el pH se ajusta en exactamente o aproximadamente 7,1. En otra forma de realización, el pH se ajusta en exactamente o aproximadamente 7,2. En otra forma de realización, el pH se ajusta en exactamente o aproximadamente 7,3. En otra forma de realización, el pH se ajusta en exactamente o aproximadamente 7,4. En otra forma de realización, el pH se ajusta en exactamente o aproximadamente 7,5. Luego se agrega etanol enfriado con antelación mientras se agita el plasma, con una concentración deseada de etanol de exactamente o aproximadamente 8% v/v. Al mismo tiempo, la temperatura se reduce aún más, hasta entre aproximadamente -4 y aproximadamente 0°C. En una forma de realización preferida, la temperatura se reduce hasta exactamente o aproximadamente -2°C, para precipitar contaminantes como la α_2 -macroglobulina, las globulinas β_{1A} y β_{1C} , el fibrinógeno y el factor VIII. Típicamente, el paso de precipitación incluirá un tiempo de retención de al menos aproximadamente 1 hora, aunque también podrán emplearse tiempos de retención más prolongados o más breves. Después, el sobrenadante (el sobrenadante I), que idealmente contiene la totalidad del contenido de IgG presente en el plasma con bajo contenido de crioprecipitados, se recolecta por centrifugación, por filtración o con otro método apropiado.

C. Precipitado del fraccionamiento II+III

[0039] Para incrementar aun más el contenido de IgG y la pureza del fraccionamiento, el sobrenadante I se somete a un segundo paso de precipitación. En general, el pH de la solución se ajusta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2, preferiblemente en exactamente o aproximadamente 7,0. Luego se agrega alcohol a la solución, preferiblemente etanol, mientras se agita, en una concentración final de entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25% (v/v). En una forma de realización, la concentración final de alcohol es de

exactamente o aproximadamente 20%. En otra forma de realización, la concentración final de alcohol es de exactamente o aproximadamente 21%. En otra forma de realización, la concentración final de alcohol es de exactamente o aproximadamente 22%. En otra forma de realización, la concentración final de alcohol es de exactamente o aproximadamente 23%. En otra forma de realización, la concentración final de alcohol es de exactamente o aproximadamente 24%. En otra forma de realización, la concentración final de alcohol es de exactamente o aproximadamente 25%. La porción líquida, también conocida como el sobrenadante de las fracciones II+III, puede someterse a un procesamiento adicional para extraer el factor V. El precipitado de este paso se somete a un procesamiento adicional en el siguiente paso. En una forma de realización, los pasos B y C también pueden realizarse juntos.

D. Extracción del precipitado del fraccionamiento II y III

[0040] Se usa un amortiguador de extracción en frío para suspender nuevamente el precipitado del fraccionamiento II+III, con una proporción típica de 1 parte del precipitado por cada 15 partes del amortiguador de extracción. Un ejemplo de un amortiguador de extracción contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM y acetato 5 mM, tiene un pH de exactamente o aproximadamente $4,5 \pm 0,2$ y una conductividad de exactamente o aproximadamente entre 0,7 y 0,9 mS/cm. En una forma de realización, la conductividad del amortiguador de extracción es de exactamente o aproximadamente 0,7 mS/cm. En otra forma de realización, la conductividad del amortiguador de extracción es de exactamente o aproximadamente 0,8 mS/cm. En aun otra forma de realización, la conductividad del amortiguador de extracción es de exactamente o aproximadamente 0,9 mS/cm. El proceso de extracción se lleva a cabo a una temperatura de exactamente o aproximadamente entre 2 y 8°C.

[0041] Pueden usarse otras proporciones apropiadas para la resuspensión, por ejemplo, entre aproximadamente 1:8 y aproximadamente 1:30, o entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:20, o entre aproximadamente 1:12 y

aproximadamente 1:18, o entre aproximadamente 1:13 y aproximadamente 1:17, o entre aproximadamente 1:14 y aproximadamente 1:16. En determinadas formas de realización, la proporción de resuspensión puede ser de aproximadamente 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, o más.

[0042] Las soluciones apropiadas para la extracción del precipitado II+III generalmente tendrán un pH de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,5. En determinadas formas de realización, la solución tendrá un pH de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0. En otra forma de realización, la solución tendrá un pH de entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0. En otras formas de realización, la extracción solución tendrá un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 ó 5,5. En una forma de realización, el pH del amortiguador de extracción será de exactamente o aproximadamente 4,5. En otra forma de realización, el pH del amortiguador de extracción será de exactamente o aproximadamente 4,6. En otra forma de realización, el pH del amortiguador de extracción será de exactamente o aproximadamente 4,7. En otra forma de realización, el pH del amortiguador de extracción será de exactamente o aproximadamente 4,8. En otra forma de realización, el pH del amortiguador de extracción será de exactamente o aproximadamente 4,9. En otra forma de realización, el pH del amortiguador de extracción será de exactamente o aproximadamente 5,0.

[0043] El amortiguador de extracción preferiblemente tendrá una conductividad de entre aproximadamente 0,5 mS/cm y aproximadamente 2,0 mS/cm. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, la conductividad del amortiguador de extracción será de aproximadamente 0,5 mS/cm, o de aproximadamente 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o de aproximadamente 2,0 mS/cm. Aquellos versados en la técnica han de saber cómo generar amortiguadores de extracción con conductividades apropiadas.

E. Tratamiento con sílice esfumado y filtración

[0044] En algunas formas de realización, el sílice esfumado (por ejemplo, Aerosil 380 o un equivalente) se agrega a la suspensión del último paso en una concentración de exactamente o aproximadamente 40 g/kg de suspensión, o equivalente a 1,8 g/litro de plasma con bajo contenido de crioprecipitados. La mezcla se realiza a aproximadamente 2-8°C durante al menos 50-70 minutos. En algunos casos, se agrega un coadyuvante de filtrado (por ejemplo, Hyflo-Supercel de World Minerals, usado en una concentración de exactamente o aproximadamente 0,5 kg/kg de suspensión) para facilitar el siguiente paso: la separación del líquido/sólido por filtración. Se usa un amortiguador de extracción para realizar el lavado posterior del filtro prensa. La temperatura del proceso de filtración se mantiene en aproximadamente 2-8°C.

F. Fraccionamiento del precipitado G

[0045] Posteriormente, el filtrado del último paso se mezcla con polisorbato-80 en una concentración de exactamente o aproximadamente 0,2% p/v, con agitación durante al menos 30 minutos, a una temperatura de aproximadamente entre 2°C y 8°C. Luego se mezcla citrato de sodio deshidratado con la solución, en una concentración final de aproximadamente 8 g/l, y la muestra se incuba durante 30 minutos adicionales, con agitación a una temperatura de aproximadamente entre 2 y 8°C. Después, el pH de la solución se ajusta en exactamente o aproximadamente $7,0 \pm 0,1$. En determinadas formas de realización, el pH se ajusta con hidróxido de sodio o con ácido acético. Luego se agrega alcohol a la solución, en una concentración de exactamente o aproximadamente 25% v/v, y se lleva a cabo un paso de precipitación similar al paso II de Cohn.

G. Suspensión del precipitado G

[0046] El precipitado del último paso se disuelve y se filtra con un filtro de profundidad con poros con un tamaño nominal de 0,2 μm (por ejemplo, un filtro Cuno VR06 o un equivalente), con lo cual puede obtenerse un filtrado clarificado. En otra forma de realización, el precipitado se disuelve y luego se centrifuga para recuperar un sobrenadante clarificado.

H. Tratamiento con solvente y detergente

[0047] El filtrado del último paso se usa para realizar un tratamiento con solvente/detergente. Una mezcla típica para el tratamiento con solvente/detergente comprende 1,0% (v/v) de Triton X-100, 0,3% (v/v) de Tween-80 y 0,3% (v/v) de TNBP, y la mezcla típicamente se mantiene a una temperatura de aproximadamente entre 18°C y 25°C durante al menos 60 minutos. Los métodos para tratar fracciones derivadas del plasma con detergentes son conocidos en la técnica. En general, podrá usarse cualquier tratamiento con un no iónico convencional en combinación con los métodos que se proveen en la presente.

I. Cromatografía de intercambio catiónico

[0048] Con el fin de purificar y concentrar aun más la IgG del filtrado del PptG tratado con el S/D, puede emplearse una cromatografía de intercambio catiónico y/o de intercambio aniónico. Los métodos para purificar y concentrar la IgG usando una cromatografía de intercambio iónico son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la Patente de los EEUU N° 5886154 se describe un método donde se extrae el precipitado de las fracciones II+III a un pH bajo (de entre aproximadamente 3,8 y 4,5), a lo que sigue la precipitación de la IgG usando ácido caprílico, y finalmente la implementación de dos pasos de cromatografía de intercambio aniónico. En la Patente de los EEUU N° 6069236 se describe un esquema de purificación de la IgG por cromatografía que no se basa en lo absoluto en la precipitación con alcohol. En la Publicación PCT N° WO 2005/073252 se describe un método para purificar IgG, que comprende la extracción del precipitado de las fracciones II+III, un tratamiento con ácido caprílico, un tratamiento con PEG y un solo paso de cromatografía de intercambio aniónico. En la Patente de los EEUU N° 7186410 se describe un método para purificar IgG, que comprende la extracción de un precipitado de las fracciones I+II+III o de la fracción II, a lo que sigue un solo paso de intercambio aniónico, que se lleva a cabo a pH alcalino. En la Patente de los EEUU N° 7553938 se describe

un método que comprende la extracción de un precipitado de las fracciones I+II+III o de las fracciones II+III, un tratamiento con caprilato y uno o dos pasos de cromatografía de intercambio aniónico. En la Patente de los EEUU N° 6093324 se describe un método de purificación que comprende el uso de una resina macroporosa de intercambio aniónico operada a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,6. En la Patente de los EEUU N° 6835379 se describe un método de purificación que se basa en la cromatografía de intercambio catiónico, en ausencia de un fraccionamiento con alcohol.

[0049] En una forma de realización, la solución de proteínas que contiene el solvente/detergente del último paso se hace pasar a través de una columna de intercambio catiónico para eliminar el solvente y el detergente. Después de eliminar los reactivos de S/D por lavado, se eluyen las proteínas absorbidas con un amortiguación de elución con un pH elevado. En una forma de realización, el amortiguador de elución tendrá un pH de entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 9,5. En otra forma de realización, el amortiguador de elución tendrá un pH de entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 9,0. En una forma de realización preferida, el amortiguador de elución tendrá un pH de exactamente o aproximadamente $8,5 \pm 0,1$.

J. Cromatografía de intercambio aniónico

[0050] El pH de la fracción eluida del último paso se ajusta en 6, y dicha fracción se diluye hasta obtener la conductividad apropiada para la siguiente columna de intercambio aniónico equilibrada. La porción que fluye a través de la columna durante la carga y el lavado se recolecta para continuar con su procesamiento.

K. Nanofiltración

[0051] Con el fin de reducir aun más la carga viral de la composición de IgG que se provee en la presente, el efluente de la columna de intercambio aniónico puede someterse a una nanofiltración usando un dispositivo de nanofiltración apropiado. En determinadas formas de realización, el dispositivo de nanofiltración tendrá poros con un tamaño promedio de entre aproximadamente 15 nm y

aproximadamente 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros apropiados para este uso incluyen, sin limitaciones, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N y 75N (Planova). En una forma de realización específica, el nanofiltro puede tener poros con un tamaño promedio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 72 nm, o de entre aproximadamente 19 nm y aproximadamente 35 nm, o de aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm o 72 nm. En una forma de realización preferida, el nanofiltro tendrá poros con un tamaño promedio de aproximadamente 35 nm, por ejemplo, será un filtro Asahi PLANOVA 35N o un equivalente de éste.

L. Ultrafiltración y diafiltración

[0052] Después de la nanofiltración, el filtrado se concentra aun más hasta alcanzar una concentración de proteínas de $5 \pm 1\%$ p/v por ultrafiltración. En algunos ejemplos, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla con canales abiertos, y la membrana de ultrafiltración tiene un límite nominal de peso molecular (NMWCO) de 50 kDa o menos.

[0053] En una forma de realización, el nanofiltrado puede concentrarse por ultrafiltración hasta obtener una concentración de proteínas de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 10% (p/v). En determinadas formas de realización, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla con canales abiertos, y la membrana de ultrafiltración tiene un límite nominal de peso molecular (NMWCO) menor que aproximadamente 100 kDa, o menor que aproximadamente 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 kDa, o incluso menor. En una forma de realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO no mayor que 50 kDa.

[0054] Una vez completo el paso de ultrafiltración, el concentrado puede concentrarse aun más por diafiltración contra una solución apropiada para una administración intravenosa o intramuscular. En determinadas formas de realización, la solución de diafiltración puede comprender un estabilizador y/o un agente amortiguador. En una forma de realización preferida, el estabilizador y el

agente amortiguador son glicina en una concentración apropiada, por ejemplo, de entre aproximadamente 0,20 M y aproximadamente 0,30 M, o de entre aproximadamente 0,22 M y aproximadamente 0,28 M, o de entre aproximadamente 0,24 M y aproximadamente 0,26 mM, o en una concentración de aproximadamente 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 ó 3,0. En una forma de realización preferida, el amortiguador de diafiltración contiene glicina exactamente o aproximadamente 0,25 M.

[0055] En una forma de realización preferida, una vez completo el paso de ultrafiltración, el concentrado se somete a una diafiltración contra una solución de glicina 0,25 M con un pH bajo. Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 6 veces el volumen del concentrado original, y la solución se concentra hasta alcanzar una concentración de proteínas mayor que 20% p/v. Al final del proceso de diafiltración y concentración, el pH de la solución típicamente es de entre 4,4 y 4,9.

[0056] Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 3 veces el volumen del concentrado original, o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más veces el volumen del concentrado original. La solución de IgG puede concentrarse hasta obtener una concentración final de proteínas de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 22% (p/v), o de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 22% (p/v), o de entre aproximadamente 15% y aproximadamente 22% (p/v), o de entre aproximadamente 18% y aproximadamente 22% (p/v), o de entre aproximadamente 20% y aproximadamente 22%, o hasta alcanzar una concentración final de exactamente o aproximadamente 5%, o de 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, o más. En una forma de realización preferida, la solución IgG será concentrada hasta obtener una concentración final de proteínas de exactamente o aproximadamente 20%-22%. Típicamente, al final del proceso de concentración, el pH de la solución será de aproximadamente entre 4,6 y 5,1.

M. Formulación

[0057] Una vez completo el paso de diafiltración, la concentración de proteínas de la solución se ajusta con el amortiguador de diafiltración hasta obtener una concentración final de entre aproximadamente 5% y aproximadamente 20% (p/v), o de entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20% (p/v), o de entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20% (p/v), o de entre aproximadamente 18% y aproximadamente 20% (p/v), o hasta alcanzar una concentración final de aproximadamente 5%, o de 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20%. En una forma de realización preferida, la concentración final de proteínas de la solución es de entre exactamente o aproximadamente 19% y exactamente o aproximadamente 21%. En una forma de realización preferida, una vez completa la diafiltración, la concentración de proteínas de la solución se ajusta en apenas más de 20% p/v, por ejemplo, en exactamente o aproximadamente $20,4 \pm 0,4\%$ p/v, con el amortiguador de diafiltración.

N. Esterilización adicional

[0058] La solución formulada en bruto se somete a una esterilización adicional, que comprende primero filtrarla a través de una membrana de filtro con poros con un tamaño absoluto de 0,2 micrones o menos. Después, la solución se coloca de manera aséptica en los recipientes finales para sellarla de manera apropiada, y se toman muestras para evaluarlas. El paso final consiste en almacenar los recipientes sellados a 30-32°C durante un período de tiempo extendido, por ejemplo, entre 21 y 22 días.

II. Composiciones concentradas de IgG

[0059] En un aspecto, la presente invención se relaciona con composiciones acuosas de IgG preparadas con los métodos que se proveen en la presente. En general, las composiciones de IgG preparadas con los métodos novedosos que se describen en la presente tendrán un alto contenido de IgG y una gran pureza. Por ejemplo, las composiciones de IgG que se proveen en la presente pueden tener

una concentración de proteínas de al menos aproximadamente 15% (p/v) y un contenido de IgG mayor que aproximadamente 90%, en términos de pureza. Estas composiciones de IgG de gran pureza son apropiadas para administraciones terapéuticas, por ejemplo, por medio de una administración subcutánea y/o intramuscular. En una forma de realización, las composiciones de IgG que se proveen en la presente son apropiadas para una administración intravenosa, por ejemplo, si se las diluye antes de administrarlas. En una forma de realización, la concentración de IgG es de exactamente o aproximadamente 20%, y se la usa para una administración subcutánea o intramuscular.

[0060] En una forma de realización, en la presente invención se provee una composición acuosa de IgG preparada con un método que comprende los siguientes pasos:

- (1) separar el líquido y el precipitado del plasma por centrifugación;
- (2) mezclar etanol enfriado con antelación con el líquido de (1) para formar una mezcla con una concentración de etanol de aproximadamente 8% (v/v);
- (3) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (2) por centrifugación;
- (4) ajustar el pH y la concentración de etanol del líquido de (3) en aproximadamente 7,0 y 20-25% (v/v), respectivamente, con lo que se forma una mezcla;
- (5) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (4) por centrifugación;
- (6) suspender nuevamente el precipitado de (5) con un amortiguador, en una proporción de aproximadamente 1 a 15 en peso, para formar una suspensión;
- (7) mezclar dióxido de silicio (SiO_2) con la suspensión de (6) y obtener un filtrado por filtración;
- (8) mezclar un detergente y alcohol frío con el filtrado de (7) y obtener un precipitado por centrifugación;
- (9) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un solvente o un detergente, y mantener la solución durante al menos 60 minutos;
- (10) después de (9), hacer pasar la solución a través de una columna de

cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna, para obtener una fracción eluida;

(11) hacer pasar la fracción eluida de (10) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente;

(12) hacer pasar el efluente a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado;

(13) hacer pasar el nanofiltrado a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado;

(14) diafiltrar el ultrafiltrado contra un amortiguador de diafiltración para generar una solución con una concentración de proteínas de aproximadamente 20% (p/v);
y

(15) esterilizar la solución de (14) filtrándola a través de un tamiz de 0,2 μm o menos, de manera de obtener una composición de IgG concentrada.

[0061] En una forma de realización, en la presente invención se proveen composiciones acuosas de IgG que comprenden una concentración de proteínas de entre aproximadamente 150 g/l y aproximadamente 250 g/l. En determinadas formas de realización, la concentración de proteínas de la composición de IgG es de entre aproximadamente 175 g/l y aproximadamente 225 g/l, o de entre aproximadamente 200 g/l y aproximadamente 225 g/l, o cualquier concentración apropiada dentro de estos rangos, por ejemplo, exactamente o aproximadamente 150 g/l, 155 g/l, 160 g/l, 165 g/l, 170 g/l, 175 g/l, 180 g/l, 185 g/l, 190 g/l, 195 g/l, 200 g/l, 205 g/l, 210 g/l, 215 g/l, 220 g/l, 225 g/l, 230 g/l, 235 g/l, 240 g/l, 245 g/l, 250 g/l, o más. En una forma de realización preferida, la composición acuosa de IgG comprende una concentración de proteínas de exactamente o aproximadamente 200 g/l. En una forma de realización particularmente preferida, la composición acuosa de IgG comprende una concentración de proteínas de exactamente o aproximadamente 204 g/l.

[0062] Los métodos que se proveen en la presente permiten preparar composiciones de IgG que tienen niveles de pureza muy altos. Por ejemplo, en

una forma de realización, al menos aproximadamente 95% de las proteínas totales en una composición que se provee en la presente serán IgG. En otras formas de realización, al menos aproximadamente 96% de las proteínas serán IgG, o al menos aproximadamente 97%, 98%, 99%, 99,5% de las proteínas totales de la composición, o más, serán IgG.

[0063] De manera similar, los métodos que se proveen en la presente permiten preparar composiciones de IgG que contienen niveles extremadamente bajos de agentes contaminantes. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, se proveen composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 100 mg/l de IgA. En otras formas de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 50 mg/l de IgA, preferiblemente menos de aproximadamente 35 mg/l de IgA, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 mg/l de IgA.

III. Composiciones farmacéuticas

[0064] En otro aspecto, en la presente invención se proveen composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden IgG purificada preparadas con los métodos que se proveen en la presente. En general, las composiciones y las formulaciones farmacéuticas de IgG preparadas con los métodos novedosos que se describen en la presente tendrán un contenido elevado de IgG y una gran pureza. Por ejemplo, las composiciones y las formulaciones farmacéuticas de IgG que se proveen en la presente pueden tener una concentración de proteínas de al menos aproximadamente 15% (p/v) y un contenido de IgG mayor que 90%, en términos de pureza. Estas composiciones y formulaciones farmacéuticas de IgG de gran pureza son apropiadas para administraciones terapéuticas, por ejemplo, por medio de una administración subcutánea y/o intramuscular. En una forma de realización, las composiciones de IgG que se proveen en la presente son apropiadas para la administración intravenosa, por ejemplo, si se las diluye antes de administrarlas. En una forma de realización, la concentración de IgG es exactamente o aproximadamente 20%, y se la usa para una administración

subcutánea o intramuscular.

[0065] En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas que se proveen en la presente se preparan formulando una composición acuosa de IgG que ha sido aislada usando un método provisto en la presente. En general, la composición formulada habría sido sometida a al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres pasos para inactivar o eliminar los virus. Los ejemplos no limitativos de pasos para inactivar o eliminar los virus que pueden emplearse con los métodos que se proveen en la presente incluyen el tratamiento con solventes detergentes (Horowitz *et al.*, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5, Supl. 3):S21-S28 y Kreil *et al.*, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, ambos incorporados expresamente en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito), la nanofiltración (Hamamoto *et al.*, *Vox Sang* 1989 (56)230-236 y Yuasa *et al.*, *J Gen Virol.* 1991 (72 (parte 8)):2021-2024, ambos incorporados expresamente en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito) y la incubación a bajo pH y alta temperatura (Kempf *et al.*, *Transfusion* 1991 (31)423-427 y Louie *et al.*, *Biologicals* 1994 (22):13-19).

[0066] En determinadas formas de realización, se proveen formulaciones farmacéuticas que tiene un contenido de IgG de entre aproximadamente 175 g/l de IgG y aproximadamente 225 g/l de IgG. En general, estas formulaciones de IVIG se preparan aislando una composición de IgG a partir de plasma usando un método como los que se describen en la presente, concentrando la composición y formulando la composición concentrada en una solución apropiada para la administración intravenosa. Las composiciones de IgG pueden concentrarse usando cualquier método apropiado, conocido por aquellos versados en la técnica. En una forma de realización, la composición se concentra por ultrafiltración/diafiltración. En algunas formas de realización, en el dispositivo de ultrafiltración usado para concentrar la composición se empleará una membrana de ultrafiltración con un límite nominal de peso molecular (NMWCO) menor que aproximadamente 100 kDa o menor que aproximadamente 90, 80, 70, 60, 50, 40,

30 kDa, o incluso menor. En una forma de realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO no mayor que 50 kDa. El intercambio de los amortiguadores puede efectuarse usando cualquier procedimiento apropiado conocido por aquellos versados en la técnica. En una forma de realización específica, el intercambio de los amortiguadores se efectúa por diafiltración.

[0067] En una forma de realización específica, se provee una composición farmacéutica de IgG, donde la composición de IgG ha sido purificada a partir del plasma usando un método que comprende los siguientes pasos:

- (1) separar el líquido y el precipitado del plasma por centrifugación;
- (2) mezclar etanol enfriado con antelación con el líquido de (1) para formar una mezcla con una concentración de etanol de aproximadamente 8% (v/v);
- (3) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (2) por centrifugación;
- (4) ajustar el pH y la concentración de etanol del líquido de (3) en aproximadamente 7,0 y 20-25% (v/v), respectivamente, con lo que se forma una mezcla;
- (5) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (4) por centrifugación;
- (6) suspender nuevamente el precipitado de (5) con un amortiguador, en una proporción de aproximadamente 1 a 15 en peso, para formar una suspensión;
- (7) mezclar dióxido de silicio (SiO_2) con la suspensión de (6) y obtener un filtrado por filtración;
- (8) mezclar un detergente y alcohol frío con el filtrado de (7) y obtener un precipitado por centrifugación;
- (9) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un solvente o un detergente, y mantener la solución durante al menos 60 minutos;
- (10) después de (9), hacer pasar la solución a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna, para obtener una fracción eluida;
- (11) hacer pasar la fracción eluida de (10) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente;

- (12) hacer pasar el efluente a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado;
- (13) hacer pasar el nanofiltrado a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado;
- (14) diafiltrar el ultrafiltrado contra un amortiguador de diafiltración para generar una solución con una concentración de proteínas de aproximadamente 20% (p/v);
y
- (15) esterilizar la solución de (14) filtrándola a través de un tamiz de 0,2 μm o menos, de manera de obtener una composición de IgG concentrada.

[0068] En una forma de realización, en la presente invención se proveen composiciones farmacéuticas de IgG que comprenden una concentración de proteínas de entre aproximadamente 150 g/l y aproximadamente 250 g/l. En determinadas formas de realización, la concentración de proteínas de la composición de IgG es de entre aproximadamente 175 g/l y aproximadamente 225 g/l, o de entre aproximadamente 200 g/l y aproximadamente 225 g/l, o cualquier concentración apropiada dentro de estos rangos, por ejemplo, exactamente o aproximadamente 150 g/l, 155 g/l, 160 g/l, 165 g/l, 170 g/l, 175 g/l, 180 g/l, 185 g/l, 190 g/l, 195 g/l, 200 g/l, 205 g/l, 210 g/l, 215 g/l, 220 g/l, 225 g/l, 230 g/l, 235 g/l, 240 g/l, 245 g/l, 250 g/l, o más. En una forma de realización preferida, la composición acuosa de IgG comprende una concentración de proteínas de exactamente o aproximadamente 200 g/l. En una forma de realización particularmente preferida, la composición acuosa de IgG comprende una concentración de proteínas de exactamente o aproximadamente 204 g/l.

[0069] Los métodos que se proveen en la presente permiten preparar composiciones farmacéuticas de IgG que tienen niveles de pureza muy altos. Por ejemplo, en una forma de realización, al menos aproximadamente 95% de las proteínas totales en una composición que se provee en la presente serán IgG. En otras formas de realización, al menos aproximadamente 96% de las proteínas serán IgG, o al menos aproximadamente 97%, 98%, 99%, 99,5% de las proteínas

totales de la composición, o más, serán IgG.

[0070] De manera similar, los métodos que se proveen en la presente permiten preparar composiciones farmacéuticas de IgG que contienen niveles extremadamente bajos de agentes contaminantes. Por ejemplo, en determinadas formas de realización, se proveen composiciones de IgG que contienen menos de aproximadamente 100 mg/l de IgA. En otras formas de realización, la composición de IgG contendrá menos de aproximadamente 50 mg/l de IgA, preferiblemente menos de aproximadamente 35 mg/l de IgA, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 mg/l de IgA.

[0071] Las composiciones farmacéuticas que se proveen en la presente típicamente comprenderán uno o más agentes amortiguadores o agentes estabilizadores del pH apropiados para una administración intravenosa, subcutánea y/o intramuscular. Los ejemplos no limitativos de agentes amortiguadores apropiados para formular una composición de IgG como las que se proveen en la presente incluyen glicina, citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartrato, benzoato, lactato, histidina u otros aminoácidos, gluconato, malato, succinato, formato, propionato, carbonato, o cualquier combinación de éstos, con el ajuste del pH en un valor apropiado. En general, el agente amortiguador será suficiente para mantener un pH apropiado en la formulación durante un período de tiempo extendido. En una forma de realización preferida, el agente amortiguador es glicina.

[0072] En algunas formas de realización, la concentración del agente amortiguador en la formulación será de entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 400 mM, preferiblemente de entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 350 mM, más preferiblemente de entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 300 mM, más preferiblemente de entre aproximadamente 175 mM y aproximadamente 225 mM. En una forma de realización particularmente preferida, la composición de IgG concentrada comprenderá glicina entre aproximadamente 150 mM y aproximadamente 250 mM, más preferiblemente

glicina aproximadamente. En otra forma de realización preferida, la composición de IgG concentrada contendrá glicina exactamente o aproximadamente 250 mM.

[0073] En determinadas formas de realización, el pH de la formulación será de entre aproximadamente 4,1 y aproximadamente 5,6, preferiblemente de entre aproximadamente 4,4 y aproximadamente 5,3, más preferiblemente de entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 5,1. En formas de realización particulares, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5 ó 5,6.

[0074] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que se proveen en la presente opcionalmente pueden comprender también un agente para ajustar la osmolaridad de la composición. Los ejemplos no limitativos de agentes para ajustar la osmolaridad incluyen manitol, sorbitol, glicerol, sacarosa, glucosa, dextrosa, levulosa, fructosa, lactosa, polietilenglicoles, fosfatos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, gluconoglucoheptonato de calcio, dimetil sulfona, y semejantes.

[0075] Típicamente, las formulaciones que se proveen en la presente tendrán osmolaridades comparables a la osmolaridad fisiológica, de aproximadamente entre 285 y 295 mOsmol/kg (Lacy *et al.*, *Drug Information Handbook – Lexi-Comp* 1999:1254). En determinadas formas de realización, la osmolaridad de la formulación será de entre aproximadamente 200 mOsmol/kg y aproximadamente 350 mOsmol/kg, preferiblemente de entre aproximadamente 240 y aproximadamente 300 mOsmol/kg. En formas de realización particulares, la osmolaridad de la formulación será de aproximadamente 200 mOsmol/kg, o de 210 mOsmol/kg, 220 mOsmol/kg, 230 mOsmol/kg, 240 mOsmol/kg, 245 mOsmol/kg, 250 mOsmol/kg, 255 mOsmol/kg, 260 mOsmol/kg, 265 mOsmol/kg, 270 mOsmol/kg, 275 mOsmol/kg, 280 mOsmol/kg, 285 mOsmol/kg, 290 mOsmol/kg, 295 mOsmol/kg, 300 mOsmol/kg, 310 mOsmol/kg, 320 mOsmol/kg, 330 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg o 350 mOsmol/kg.

[0076] Las formulaciones de IgG que se proveen en la presente generalmente son

estables en forma líquida durante un período de tiempo extendido. En determinadas formas de realización, las formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 3 meses a temperatura ambiente, o durante al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 meses a temperatura ambiente. La formulación también generalmente será estable durante 6 o al menos aproximadamente 18 meses bajo condiciones refrigeradas (típicamente a una temperatura de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C), o durante al menos aproximadamente 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 ó 45 meses bajo condiciones refrigeradas.

IV. Administración de la preparación de IgG

[0077] De acuerdo con la práctica usual en la medicina moderna, las preparaciones esterilizadas de inmunoglobulinas concentradas (especialmente IgG) se usan para tratar tres categorías principales de afecciones médicas: las deficiencias inmunes, las enfermedades inflamatorias y autoinmunes y las infecciones agudas. Estas preparaciones de IgG también pueden ser útiles para tratar la esclerosis múltiple (especialmente la esclerosis múltiple recurrente-remitente o RRMS), la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. La preparación de IgG purificada de esta invención es apropiada para estos propósitos, así como para otros usos clínicamente aceptados para las preparaciones de IgG.

[0078] La FDA ha aprobado el uso de IVIG para tratar diversas indicaciones, incluyendo el trasplante alogénico de médula ósea, la leucemia linfocítica crónica, la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), el VIH pediátrico, las inmunodeficiencias primarias, la enfermedad de Kawasaki, la polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), el trasplante de riñón a un receptor con un contenido elevado de anticuerpos o desde un donante con una incompatibilidad ABO. En determinadas formas de realización, las composiciones de IVIG que se proveen en la presente son útiles para el tratamiento o la gestión de estas enfermedades y afecciones.

[0079] Además, a los pacientes usualmente se les proveen usos no convencionales de las IVIG, por ejemplo, para el tratamiento o la gestión de las siguientes indicaciones: el síndrome de fatiga crónica, la colitis provocada por *Clostridium difficile*, la dermatomiositis y la polimiositis, la oftalmopatía de Graves, el síndrome de Guillain-Barré, la distrofia muscular, la miositis con cuerpos de inclusión, el síndrome de Lambert-Eaton, el lupus eritematoso, la neuropatía motora multifocal, la esclerosis múltiple (MS), la miastenia grave, la trombocitopenia aloinmune neonatal, las infecciones de parvovirus B19, el pénfigo, la púrpura post-transfusión, el rechazo de transplantes renales, el aborto espontáneo, el síndrome de la persona rígida, el síndrome de opsoclonus-mioclonus, la sepsis severa y el shock séptico en adultos críticamente enfermos, la necrólisis epidérmica tóxica, la leucemia linfocítica crónica, el mieloma múltiple, la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X y la hipogammaglobulinemia. En determinadas formas de realización, las composiciones de IVIG que se proveen en la presente son útiles para el tratamiento o la gestión de estas enfermedades y afecciones.

[0080] Finalmente, se ha propuesto el uso experimental de las IVIG para el tratamiento o la gestión de enfermedades que incluyen la deficiencia inmune primaria, la RRMS, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Publicación de Solicitud de Patente de los EEUU N° U.S. 2009/0148463, que se incorpora en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito). En determinadas formas de realización, las composiciones de IVIG que se proveen en la presente son útiles para el tratamiento o la gestión de la deficiencia inmune primaria, la RRMS, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. En determinadas formas de realización que comprenden la administración diaria, la cantidad eficaz que ha de administrársele al sujeto puede ser determinada por el médico, teniendo en cuenta las diferencias individuales en la edad, en el peso, en la severidad de la enfermedad, en la ruta de administración (por ejemplo, intravenosa o subcutánea) y en la respuesta a la

terapia. En determinadas formas de realización, una preparación de inmunoglobulina de esta invención puede administrársele a un sujeto a razón de entre aproximadamente 5 mg/kilogramo y aproximadamente 2000 mg/kilogramo, por día. En otras formas de realización, la preparación de inmunoglobulina puede administrarse en cantidades de al menos aproximadamente 10 mg/kilogramo, de al menos 15 mg/kilogramo, de al menos 20 mg/kilogramo, de al menos 25 mg/kilogramo, de al menos 30 mg/kilogramo o de al menos 50 mg/kilogramo. En otras formas de realización, la preparación de inmunoglobulina puede administrársele a un sujeto en dosis de hasta aproximadamente 100 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 150 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 200 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 250 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 300 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 400 mg/kilogramo, por día. En otras formas de realización, las dosis de la preparación de inmunoglobulina pueden ser mayores o menores. Adicionalmente, las preparaciones de inmunoglobulina pueden administrarse en una o más dosis por día. Los médicos familiarizados con las enfermedades que pueden ser tratadas con las preparaciones de IgG pueden determinar la dosis apropiada para un paciente de acuerdo con criterios conocidos en la técnica.

[0081] Un producto de IgG usado comúnmente, la inmunoglobulina intravenosa o IVIG, está formulado para la administración intravenosa. Como la preparación de IgG de esta invención tiene una concentración de inmunoglobulina excepcionalmente elevada (de 20% p/v o más), que permite reducir significativamente el volumen para obtener una dosis eficaz para el uso terapéutico, la composición de la presente invención es particularmente ventajosa para la administración subcutánea y/o intramuscular a un paciente, incluso cuando la administración intravenosa sea una opción para la administración.

[0082] El término "cantidad eficaz" hace referencia a una cantidad de una preparación de inmunoglobulina, particularmente de IgG, que da como resultado la mejora o el remedio de una enfermedad o una afección en el sujeto (por ejemplo,

una deficiencia inmune primaria, la RRMS, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, etcétera). La cantidad eficaz que ha de administrársele al sujeto puede ser determinada por el médico, teniendo en cuenta las diferencias individuales en la edad, en el peso, en la severidad de la enfermedad, en la ruta de administración (por ejemplo, intravenosa o subcutánea) y en la respuesta a la terapia. En determinadas formas de realización, una preparación de inmunoglobulina de esta invención puede administrársele a un sujeto a razón de entre aproximadamente 5 mg/kilogramo y aproximadamente 2000 mg/kilogramo, por día. En otras formas de realización, la preparación de inmunoglobulina puede administrarse en cantidades de al menos aproximadamente 10 mg/kilogramo, de al menos 15 mg/kilogramo, de al menos 20 mg/kilogramo, de al menos 25 mg/kilogramo, de al menos 30 mg/kilogramo o de al menos 50 mg/kilogramo. En otras formas de realización, la preparación de inmunoglobulina puede administrársele a un sujeto en dosis de hasta aproximadamente 100 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 150 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 200 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 250 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 300 mg/kilogramo, de hasta aproximadamente 400 mg/kilogramo, por día. En otras formas de realización, las dosis de la preparación de inmunoglobulina pueden ser mayores o menores. Adicionalmente, las preparaciones de inmunoglobulina pueden administrarse en una o más dosis por día. Los médicos familiarizados con las enfermedades que pueden ser tratadas con las preparaciones de IgG pueden determinar la dosis apropiada para un paciente de acuerdo con criterios conocidos en la técnica.

[0083] En determinadas formas de realización, una preparación de IgG concentrada puede administrársele a un sujeto en una dosis de entre aproximadamente 5 mg/kilogramo y aproximadamente 2000 mg/kilogramo por administración. En determinadas formas de realización, la dosis puede ser de al menos aproximadamente 5 mg/kg, o de al menos aproximadamente 10 mg/kg, o de al menos aproximadamente 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60

mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg, o de al menos aproximadamente 2000 mg/kg.

[0084] De acuerdo con la presente invención, el tiempo necesario para completar un curso de tratamiento puede ser determinado por el médico y puede variar entre un mínimo de un día y más de un mes. En determinadas formas de realización, un curso de tratamiento puede ser de entre 1 y 6 meses.

[0085] La dosis y la frecuencia del tratamiento con IVIG dependerán, entre otros factores, de la enfermedad o la afección que se deseen tratar y de la severidad la enfermedad o la afección en el paciente. En general, para una disfunción inmune primaria, se administrará una dosis de entre aproximadamente 100 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal, con una frecuencia aproximada de entre 3 y 4 semanas. Para las enfermedades neurológicas y autoinmunes, se implementarán hasta 2 g/kg de peso corporal, con una frecuencia de entre tres y seis meses, en un período de cinco días una vez al mes. Esto generalmente se complementa con una terapia de mantenimiento que comprende la administración de entre aproximadamente 100 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal, aproximadamente una vez cada 3-4 meses. En general, un paciente recibirá una dosis o un tratamiento aproximadamente una vez cada 14-35 días, o aproximadamente cada 21-28 días. La frecuencia del tratamiento dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o la afección que se deseen tratar y de la severidad de la enfermedad o la afección en el paciente.

[0086] En una forma de realización preferida, se provee un método para tratar una inmunodeficiencia, una enfermedad autoinmune o una infección aguda en un ser humano que lo necesita, donde el método comprende administrar una composición farmacéutica de IgG de la presente invención.

EJEMPLOS

[0087] Los siguientes ejemplos se proveen solamente con fines ilustrativos, y no para limitar la invención. Aquellos versados en la técnica han de poder reconocer fácilmente la posibilidad de cambiar o modificar una variedad de parámetros no críticos para obtener resultados esencialmente iguales o similares.

Ejemplo 1. Estudio de la estabilidad de diversas composiciones y formulaciones concentradas de IgG

1. Propósito

[0088] El propósito de este estudio es comparar la estabilidad durante el almacenamiento de las formulaciones a pH bajo (con glicina 0,25 M y con un pH de 4,4-4,9, medido en una solución concentrada) y con mayores concentraciones de proteínas con la estabilidad de la formulación a pH neutro (con 22,5 g/l de glicina y 3 g/l de NaCl, pH 7) usada actualmente para la administración de inmunoglobulinas por medio de inyecciones intramusculares y subcutáneas.

2. Diseño experimental

[0089] Todos los procedimientos comienzan con la concentración del nanofiltrado hasta obtener una concentración de proteínas de 5%. Se llevan a cabo diez intercambios de amortiguador contra glicina 0,15 M (la menor concentración de glicina investigada), a lo que sigue una concentración final hasta alcanzar un valor deseado superior a 20% de proteínas. Para el primer conjunto de experimentos, se usa una membrana de poliétersulfona Millipore de 0,5 m², con un límite de peso molecular de 30 K (pantalla regular); para el segundo conjunto de experimentos, se usa una membrana de poliétersulfona Millipore de 0,5 m² con una pantalla abierta, que es más apropiada para las soluciones con mayor viscosidad; y las fracciones obtenidas con el lavado posterior se concentran con un segundo dispositivo de ultra/diafiltración, con una membrana con una menor superficie (de 0,1 m², pantalla abierta), con el fin de reducir las pérdidas de rendimiento.

[0090] Los productos finales se formulan y se almacenan a pH bajo, o bien el almacenamiento a pH bajo se realiza por lotes, para luego realizar la formulación a

pH neutro antes del almacenamiento.

Tabla 1. Consideraciones generales de los pasos de ultra/diafiltración (membranas de poliétersulfona de 30 K) y el pH del producto final

Dispositivo de ultrafiltración de 0,5 m ²	Pantalla convencional	Pantalla convencional	Pantalla abierta	Pantalla abierta
Dispositivo de ultrafiltración de 0,1 m ²	Sin pantalla	Sin pantalla	Pantalla abierta	Pantalla abierta
pH del producto final	4,7	7	4,7	7

3. Métodos de evaluación

[0091]pH. El pH se evaluó con un dispositivo Knick Portamess del tipo 911 XPH, equipado con un electrodo Mettler Toledo LoT405-DPA-SC-S8/120 y una sonda de temperatura PT 1000.

[0092]Proteínas. Los valores de las proteínas se determinaron usando Biuret.

[0093]Distribución del tamaño molecular. Se la evaluó usando una cromatografía de exclusión por tamaño de alto desempeño.

[0094]Titulación de ACA. Se la evaluó como se describe en la Farmacopea Europea.

4. Criterios de aceptación

[0095] Se definen los siguientes criterios de aceptación:

- Distribución del tamaño molecular por HPLC:
 - i. Monómeros y oligo/dímeros $\geq 90\%$
 - ii. Agregados $\leq 10\%$ ($\leq$ % para la administración IV)
- Titulación de ACA:

Menos de 50% de unidades CH50 consumidas/mg de proteínas para la administración IV.

5. Resultados y discusión

5.1. Comparación del contenido de agregados y de fragmentos y de la titulación

de ACA en las preparaciones formuladas a pH bajo (4,7) y a pH 7,0

[0096] En la tabla 2 a continuación se detalla el contenido de agregados y de fragmentos, así como la titulación de ACA, después de 3 meses de almacenamiento a una temperatura de entre 28 y 30°C, para formulaciones convencionales (a pH 4,7, con glicina 0,25 M, o a pH 7,0, con 22,5 g/l de glicina y 3 g/l de NaCl) con distintas concentraciones de proteínas.

Tabla 2. Valores de los fragmentos, de los agregados y de ACA después de 3 meses de almacenamiento a 28-30°C, a pH bajo y a pH 7,0, con distintas concentraciones de proteínas

Proteínas	Fragmentos, %		Agregados, %		Titulación de ACA, %	
	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0
14%	1,35	1,50	0,10	0,92	44,1	52,0
16%	1,24	1,38	0,08	0,91	40,5	53,1
18%	1,24	1,60	0,11	0,93	40,3	52,4
20%	1,35	1,52	0,12	0,93	37,5	62,7

[0097] A partir de los datos, se observa claramente que la formulación a bajo pH presenta menos agregados y una menor titulación de ACA después de 3 meses de almacenamiento a 28-30°C. Todas las titulaciones de ACA de las formulaciones a pH 7 son mayores que el criterio de aceptación definido para esta prueba. En la tabla 2 se proveen los valores obtenidos después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C.

Tabla 3. Valores de los fragmentos, de los agregados y de ACA después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C, a pH bajo y a pH 7,0, con distintas concentraciones de proteínas

Proteínas	Fragmentos, %		Agregados, %		Titulación de ACA	
	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0	pH 4,7	pH 7,0
14%	0,36	1,80	0,16	1,09	38,3	46,5
16%	0,30	0,51	0,11	1,01	37,4	44,7
18%	0,33	1,10	0,17	0,86	35,8	39,8

20%	0,33	1,98	0,20	1,06	36,1	46,0
-----	------	------	------	------	------	------

[0098] La tendencia observada a 28-30°C se confirma con los resultados a 2-8°C. Todas las titulaciones de ACA son inferiores al límite definido en los criterios de aceptación, aunque las formulaciones a pH 7,0 parecen presentar valores mayores. El valor de las proteínas no influye en los resultados de los parámetros evaluados.

5.2 Influencia de los distintos procedimientos de concentración sobre el contenido de agregados y de fragmentos, así como sobre la titulación de ACA, en las preparaciones IGSC60 (a pH 4,7, pantalla A) e IGSC62 (a pH 4,7, pantalla V, con la concentración del lavado posterior con un sistema de UF más pequeño)

[0099] En la siguiente tabla 4 se detalla el contenido de agregados y de fragmentos, así como la titulación de ACA, después de 3 meses de almacenamiento a 28-30°C, para las formulaciones a pH bajo, con distintos procedimientos de concentración y distintas concentraciones de proteínas.

Tabla 4. Valores de los fragmentos, de los agregados y de ACA después de 3 meses de almacenamiento a 28-30°C, a pH bajo y con distintos métodos para concentrar las proteínas

Proteínas	Fragmentos (%)		Agregados (%)		Titulación de ACA	
	pantalla convencional	pantalla abierta	pantalla convencional	pantalla abierta	pantalla convencional	pantalla abierta
14%	1,35	0,92	0,10	0,21	44,1	42,6
16%	1,24	1,09	0,08	0,20	40,5	40,9
18%	1,24	0,96	0,11	0,23	40,3	40,7
20%	1,35	0,98	0,12	0,30	37,5	41,6

[0100] Los datos representan resultados similares después de 3 meses de almacenamiento para ambos modos de concentración. En la tabla 5 se detallan los valores correspondientes obtenidos a 2-8°C.

Tabla 5. Valores de los fragmentos, de los agregados y de ACA después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C, a pH bajo y con distintos métodos para

concentrar las proteínas

	Fragmentos (%)		Agregados (%)		Titulación de ACA (%)	
Proteínas	pantalla convencional	pantalla abierta	pantalla convencional	pantalla abierta	pantalla convencional	pantalla abierta
14%	0,36	0,27	0,16	0,17	38,3	39,6
16%	0,30	0,22	0,11	0,14	37,4	38,3
18%	0,33	0,23	0,17	0,18	35,8	39,6
20%	0,33	0,22	0,20	0,20	36,1	39,9

[0101] Los valores obtenidos a 2-8°C permiten confirmar los resultados obtenidos a 28-30°C. El método usado para la concentración no influye en la estabilidad del producto.

[0102] El abordaje con dos sistemas, uno para el proceso de concentración principal y otro para la concentración del lavado posterior, da como resultado un rendimiento mayor, por lo que se considera que este método es más apropiado para la manufactura a gran escala.

6. Conclusión

[0103] Es posible extraer las siguientes conclusiones de los resultados que se presentan en este estudio:

- La formulación a bajo pH da como resultado menores valores de ACA y menores contenidos de agregados y de fragmentos después de 3 meses de almacenamiento a 2-8°C y a 28-30°C.
- Después de 3 meses de almacenamiento a 28-30°C, los valores de ACA de las formulaciones a pH neutro son mayores que los criterios de aceptación.
- El valor de las proteínas no influye en los resultados de los parámetros evaluados.
- El método usado para la concentración no influye en la estabilidad del producto.
- Solamente puede obtenerse un lavado posterior apropiado con membranas con pantallas abiertas.

[0104] Sobre la base de estas conclusiones, se decidió producir el nuevo producto de IgG de administración subcutánea con la formulación a bajo pH, con un método de concentración donde se usaría un segundo dispositivo más pequeño para concentrar el lavado posterior, con un dispositivo de ultra/diafiltración con membranas de pantalla abierta y con un contenido de proteínas de $20\% \pm 2\%$.

Ejemplo 2: Ultrafiltración y formulación de SUB Q NG

1. Antecedentes

[0105] Esta información se obtuvo durante la producción de lotes a mayor escala y preclínicos al 20%. El proceso usado para manufacturar los lotes al 20% hasta el paso de nanofiltración fue como se describió con anterioridad. La ultra/diafiltración se mejoró para concentrar la solución hasta 20% (límites: 18 y 22%). Con el fin de reducir la pérdida de rendimiento al mínimo, el lavado posterior del dispositivo de ultrafiltración usado para la diafiltración se concentra con un segundo dispositivo más pequeño equipado con las mismas membranas, y luego se agrega a la solución en lotes.

[0106] Sorprendentemente, se demostró que la inactivación de los virus durante el almacenamiento a bajo pH no es influida por la concentración de las proteínas en la solución. La reducción de los virus se efectuó de manera similar en la solución al 10% (GAMMAGARD® LIQUID) y en la solución al 20%. Por lo tanto, el almacenamiento a bajo pH, como un paso para reducir los virus, se mantiene para el producto al 20%.

2. Narrativa del proceso

Ultrafiltración

[0107] La concentración de glicina del nanofiltrado se ajusta en el valor deseado: 0,25 M. La solución se concentra por ultrafiltración (UF) hasta obtener una concentración de proteínas de $6 \pm 2\%$ p/v. Típicamente, la concentración de las proteínas se determina por medio de una medición de $AU_{280-320}$. Se usa un coeficiente de extinción de 14,1. El pH se ajusta en $5,2 \pm 0,2$. La membrana de UF usada tiene un límite nominal de peso molecular (NMWCO) de 50000 daltons o

menos, y está diseñada especialmente para productos de gran viscosidad (por ejemplo, la pantalla V de Millipore). Otro ejemplo es la membrana Millipore Pellicon Biomax, que tiene un NMWCO de 50 kilodaltons o menos. El material de la membrana es la poliétersulfona.

[0108]El concentrado se somete a una diafiltración contra una solución de glicina 0,25 M, con un pH de $4,2 \pm 0,2$. El volumen de intercambio mínimo es 10 veces el volumen del concentrado original. Durante la operación de ultrafiltración/diafiltración, la solución se mantiene a 4°C-20°C.

[0109]Después de la diafiltración, la solución se concentra hasta alcanzar una concentración de proteínas de al menos 22% (p/v). La temperatura de la solución se ajusta entre 2°C y 8°C. La concentración de proteínas puede determinarse por medio de una lectura UV, mediante el uso de un coeficiente de extinción con un valor de 14,1

[0110]Con el fin de recuperar las proteínas residuales completas en el sistema, el lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración mayor se efectúa con al menos el doble del volumen muerto en el modo de recirculación, para asegurar el lavado completo de todas las proteínas. Luego se concentra el lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración hasta obtener una concentración de proteínas de al menos 22% p/v, con un segundo sistema de ultra/diafiltración equipado con el mismo tipo de membrana, que tiene un décimo de las dimensiones de la primera. El concentrado del lavado posterior se agrega a la solución en bruto. Después, el segundo sistema de ultrafiltración se somete a un lavado posterior. Este lavado posterior se usa para ajustar la concentración de proteínas del lote final en el paso 14. La temperatura de la solución se mantiene en 2°C-8°C.

Formulación

[0111]La concentración de proteínas se somete a un ajuste adicional hasta alcanzar $20,4 \pm 0,4\%$ p/v, con el lavado posterior del segundo sistema de ultrafiltración menor, y/o con el amortiguador de diafiltración. El pH se ajusta entre 4,4 y 4,9, de ser necesario.

Ejemplo 3. Manufactura de los lotes al 20%

1. Introducción

[0112] En este ejemplo se describe la producción preclínica y se resumen los resultados de la nueva preparación investigativa de inmunoglobulina de Baxter “SUBQ NG 20%”, que es una preparación de inmunoglobulina humana polivalente líquida al 20% (p/v) de uso subcutáneo.

[0113] La manufactura se realizó como se describe en la “descripción detallada de la invención”, con el método de concentración descrito con anterioridad. El fraccionamiento comienza con la separación del crioprecipitado. Posteriormente, el plasma con bajo contenido de crioprecipitados puede usarse para aislar diversos factores de coagulación e inhibidores en bruto, antes del fraccionamiento subsiguiente con alcohol frío. Antes de la purificación de SUBQ NG 20%, se seleccionan siete vías para la adsorción en lotes de los factores de coagulación y de los inhibidores en bruto del plasma con bajo contenido de crioprecipitados, y estas vías se numeran 1 a 7 en la siguiente tabla.

Tabla 6

			Vías de absorción						
Paso	Gel	Heparina	1	2	3	4	5	6	7
Crioprecipitación	-	-	X	X	X	X	X	X	X
FEIBA	0,5 g de DEAE-Sephadex/1	-		X	X				
Factor IX	0,5 g de DEAE-Sephadex/1	2000 IU/ml				X	X	X	X
Factor VII	120 de Al(OH) ₃ /1	750 IU/ml						X	X
Antitrombina	1 g de DEAE-	80000 IU/ml			X		X	X	

	Sephadex/1								
--	------------	--	--	--	--	--	--	--	--

[0114] Para la producción preclínica SUBQ NG 20%, se seleccionó un material de partida de Cohn derivado de las vías 1, 3 y 6, de manera tal de abarcar una amplia variedad de opciones de absorción diferentes. Se describen diversos procesos de adsorción en Teschner *et al.*, 2007, *Vox Sang.* **92**:42-55; en Polsler *et al.*, 2008, *Vox Sang.* **94**:184-192; en las Patentes de los EEUU N° 6395880 y 5409990; y en *Prothrombin complex: Brummelhuis*, en *Methods of Plasma Protein Fractionation* (J.M. Curling, editor, Academic Press, 1980).

[0115] El fraccionamiento con alcohol de Cohn modificado da como resultado una fracción intermedia principal, que se conoce como el precipitado G, el cual se somete a un procesamiento adicional para obtener el producto final usando una purificación por cromatografía. La manufactura ulterior comprende una cromatografía de intercambio catiónico (CM-sefarosa, de flujo rápido) y una cromatografía de intercambio aniónico (ANX-safarosa, de flujo rápido), e incluye tres pasos independientes para inactivar o eliminar los virus:

- Un tratamiento con solvente/detergente (mezcla de 1% de Triton X-100, 0,3% de fosfato de tri-N-butilo y 0,3% de polisorbato-80);
- una nanofiltración (Asahi Planova, 35 nm); y
- un almacenamiento a bajo pH durante 3 semanas a una temperatura elevada.

[0116] Con el fin de alcanzar una mayor concentración de proteínas para la aplicación subcutánea, es necesario usar una pantalla con canales abiertos en el paso de ultra/diafiltración. Preferiblemente, se usa un segundo dispositivo de ultra/diafiltración para concentrar la fracción del lavado posterior, con el fin de recuperar todas las proteínas del primer dispositivo.

[0117] SUBQ NG 20% es una formulación líquida de inmunoglobulina G (IgG) donde al menos 95% de las proteínas son gammaglobulina. El producto es isotónico y se formula a un pH bajo. Con una concentración de proteínas de 10% durante el paso de concentración final, el pH es de entre 4,4 y 4,9. El pH final de la

solución al 20% será determinado una vez que estén disponibles los resultados de los estudios de estabilidad extendida. La solución final contiene entre 180 y 220 g de proteínas, y como único excipiente comprende entre 0,1 y 0,3 moles de glicina por litro de solución. La preparación líquida es entre transparente y ligeramente pálida/amarilla, y está sustancialmente libre de partículas visibles.

2. Datos y equilibrio de masa de los lotes preclínicos

1. Lote preclínico: SC00107NG

Opción de adsorción 1: Opción 6: F IX, F VII, AT-III

Número de lote del material de partida: Precipitado G VNELG171 (fuente US)

Número de lote del producto final: SC00107NG

2. Lote preclínico: SC00207NG

Opción de adsorción 3: FEIBA, AT-III

Número de lote del material de partida: Precipitado G VNELG173 (fuente US)

Número de lote del producto final: SC00207NG

3. Lote preclínico: SC00307NG

Opción de adsorción 1: sin pasos de adsorción

Número de lote del material de partida: Precipitado G LB0790301 (fuente US)

Número de lote del producto final: SC00307NG

Tabla 7

	Paso			Lote estéril		
Prueba/método	Lote			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
Proteínas totales/UV	g/l de plasma			3,4	3,7	3,7
IgG/nefelométrico	g/l de plasma			3,0	3,0	3,0
IgA/ELISA	g/l de plasma			<0,001	<0,001	<0,001
IgM/ELISA	g/l de plasma			<0,001	<0,001	<0,001
MSD (HPLC)						
	% de agregados			0,1	0,1	0,1

	% de oligo/dímeros			4,6	4,5	3,2
	% de monómeros			95,2	95,4	96,6
	% de fragmentos			0,1		0,1

[0118] En el lote final, el nivel de pureza de la preparación se ve reflejado en los niveles bajos de las impurezas principales, que son bastante menores que 0,1%, con relación a la IgG total. La distribución del tamaño molecular en el producto al 20% en esta etapa final del proceso es similar a la del producto final GAMMAGARD® LIQUID/KIOVIG. Esto refleja que la concentración de proteínas de 20% no tiene un impacto negativo sobre la integridad de la molécula de IgG.

3. Resultados adicionales de la caracterización de los lotes preclínicos

[0119] Los criterios de liberación preliminares del producto final se definieron sobre la base de los requerimientos de las autoridades para las inmunoglobulinas humanas subcutáneas, las especificaciones del producto final usado actualmente para la administración subcutánea y las especificaciones de GAMMAGARD® LIQUID/KIOVIG. Se realizaron pruebas de control de calidad adicionales para evaluar el nivel de impurezas relacionadas con el producto y/o con el proceso.

[0120] Además, se llevó a cabo la caracterización del espectro de anticuerpos relevantes de los productos finales y se la comparó con los resultados de los lotes preclínicos de IVIG, con 10% de TVR.

[0121] Los resultados se proveen en la siguiente tabla.

Tabla 8

			SUBQ NG 20%			IVIG, 10% de TVR		
			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG	P0010ING	P00201NG	P0030ING
						01C21AN11	01C21AN21	01D05AN11
	Sistema de prueba	Unidad						
Bacterias								
Corynebacterium diphtheriae EUR	Cobayos	IU/ml	6.	6.	6.	5.	5.	5.
Virus								
HAV	ELISA	IU/ml	14.	14.	27.	14		1
HBV (anticuerpo contra hep B s Ag)	ELISA	UI/mg TP	40.	47.	43.	35,9	40,1	40.
Factor de enriquecimiento	Hemaglutinación		41.	41.	24.	n.a.	n.a.	n.a

8099

			SUBQ NG 20%			IVIG, 10% de TVR		
			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG	P0010ING	P00201NG	P0030ING
						01C21AN11	01C21AN21	01D05AN11
	Sistema de prueba	Unidad						
del virus del sarampión EUR								
Virus del sarampión US	Hemaglutinación	NIH 176	0,8	0,8	0.	1,001	1,0	1,001
Parvo 619	ELISA	IU/ml	718	78	71	567	442	36
Virus de la poliomielitis del tipo I		NIHU/ml	1,4	1,711	1,5	1,01	1,11	1,21

[0122] Las titulaciones de anticuerpos y de los factores de enriquecimiento están en el mismo orden de magnitud para los tres productos finales preclínicos SUBQ NG 20% y para los lotes preclínicos GAMMAGARD® LIQUID/KIOVIG.

Tabla 9. Pruebas de control de calidad del producto final SUBQ NG 20%

81/8

			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
	Sistema de prueba	Unidad			
Integridad funcional de Fc	Unión a Bc	% de BPR, lote 3	15,8	138	164
Actividad anti-complementaria	Método de la EP	%	41,1	41,5	41,2
Actividad anti-complementaria	Método de la EP	C'H50 U/mg	41,4	41,8	41,6
Actividad del activador de la prekalikreína, EUR	Cromogénico	IU/ml	<0,6	1,004	1,237
Hemaglutininas anti-A, pH. Eur.	Hemaglutinación	Dilución 1	8	16	8
Hemaglutininas anti-B, pH. Eur.	Hemaglutinación	Dilución 1	4	4	2
Anti-D	Hemaglutinación		Satisfactorio	Satisfactorio	Satisfactorio

8287

			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
	Sistema de prueba	Unidad			
Exclusión de la pirogenicidad, pH. Eur. y CFR	Conejo	Incremento de °C	Libre de pirógenos	Libre de pirógenos	Libre de pirógenos
Endotoxinas bacterianas por medio de una electroforesis en acetato de celulosa	Cromogénico, CAE	IU/ml %	<1,2 99,6	1,8 99,8	<1,2 99,5
Distribución del tamaño molecular (monómeros + dímeros)	HPLC de exclusión por tamaño	%	99,2	99,3	99,2
Distribución del tamaño molecular	HPLC de exclusión por tamaño	%	0,2	0,2	0,3

8382

			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
	Sistema de prueba	Unidad			
(polímeros)					
Distribución del tamaño molecular (fragmentos)	HPLC de exclusión por tamaño	%	0,6	0,5	0,5
IgA – EUR	ELISA	µg/ml	20	20	30
IgM	ELISA	µg/ml	1,1	1,0	1,2
IgG	Nefelometría	mg/ml	177	165	163
Proteínas (en bruto)	UV	mg/ml	201	203	202
Proteínas	Autom. N2	mg/ml	202	208	203
Glicina	HPLC	mg/ml	14,7	14,5	14,7
Polisorbato 80	Espectrofot.	µg/ml	<250	<250	<250
TNBP	Cromat. gas.	µg/ml	<0,3	<0,3	<0,3
Octoxinol 9	Cromat. iónica	µg/ml	<3	<3	<3
Esterilidad	Filtr. por membrana	NA	Estéril	Estéril	Estéril

84

			SC00107NG	SC00207NG	SC00307NG
	Sistema de prueba	Unidad			
Osmolalidad		mOsmol/Kg	298	298	299
pH, sin dilución	Potenciometría		5,1	5,2	5,3
Apariencia	Inspección visual		Satisfactorio	Satisfactorio	Satisfactorio
Etanol	Cromat. gas.	µg/ml	<20	<20	<20
Isopropanol	Cromat. gas.	µg/ml	<20	<20	<20
Aluminio, AAS	Fotometría	µg/l	<50	<50	<50
Silicio, ICP OES	Ión electr.	µg/l	3466	17270	21180
Heparina		IU/ml	<0,0075	<0,0075	<0,0075

85
84

[0123] La remoción de las impurezas relacionadas con el producto y con el proceso es satisfactoria en los tres lotes.

4. Conclusiones

[0124] Se manufacturaron con éxito tres lotes de productos finales SUBQ NG 20%, en una escala de 200 litros. Las vías de adsorción se seleccionaron de manera de abarcar una amplia variedad de pasos de adsorción antes del fraccionamiento con alcohol:

- Opción 1, plasma en la fuente US, sin pasos de adsorción
- Opción 3, plasma en la fuente US después de una adsorción FEIBA, AT-III
- Opción 6, plasma en la fuente US después de una adsorción F-IX, F-VII, AT-III

[0125] Con relación a los parámetros del proceso analizados durante la producción preclínica y la caracterización de los intermediarios y del producto final, no se detectaron diferencias evidentes entre los tres lotes.

[0126] Todos los productos finales cumplieron con las especificaciones preliminares relacionadas con el producto, independientemente del tipo de material de partida seleccionado.

Ejemplo 4. Estudio de almacenamiento de la preparación al 20%

1. Introducción

[0127] SUBQ NG 20% es una preparación de inmunoglobulina humana polivalente líquida al 20% (p/v) de uso subcutáneo. Se la produjo como se describió con anterioridad.

[0128] En este estudio se resumen los datos de almacenamiento de 3 lotes preclínicos y de un lote de factibilidad, a 2-8°C y a 28-30°C (solamente para el

lote de factibilidad) durante un máximo de 6 meses.

2. Propósito

[0129]El propósito de este estudio es evaluar la estabilidad durante el almacenamiento de productos finales Sub Q NG 20% a 2-8°C y a 28-30°C.

3. Parámetros indicativos de la estabilidad

[0130]Los modos de degradación primarios son la desnaturalización, la agregación y la fragmentación, que dan como resultado un cambio en la distribución del tamaño molecular de la muestra. Entonces el análisis de la distribución del tamaño molecular por medio de una cromatografía de exclusión por tamaño de alto desempeño es el parámetro principal indicativo de la estabilidad.

4. Lotes examinados y envasado primario

[0131]Los datos de estabilidad que se presentan en este ejemplo se proveen con los lotes preclínicos SC00107NG, SC00207NG y SC00307NG, y también con el lote de factibilidad IgGSC 62/1.

5. Resultados

[0132]En la siguiente tabla 11 se detallan los resultados de los productos finales preclínicos, después de almacenarlos hasta 12 meses.

Tabla 10. Estabilidad de los lotes preclínicos Sub Q 20% a 2-8°C

		MSD (HP-SEC) (%)		
Lote	Mes	Agregados (>450 KDa)	Oligo/dímeros + monómeros	Fragmentos (<70 Kda)
SC00107NG	0	0,3	99,5	0,2
	3	0,4	99,5	0,2
	4	0,5	99,4	0,2

		MSD (HP-SEC) (%)		
Lote	Mes	Agregados (>450 KDa)	Oligo/dímeros + monómeros	Fragmentos (<70 Kda)
	6	0,5	99,3	0,2
	12	0,7	99,1	0,3
SC00207NG	0	0,3	99,5	0,2
	3	0,4	99,5	0,1
	4	0,5	99,3	0,2
	6	0,6	99,2	0,2
	12	0,8	99,0	0,2
SC00307NG	0	0,3	99,6	0,1
	3	0,5	99,3	0,2
	4	0,6	99,2	0,1
	6	0,7	99,1	0,2
	12	0,9	98,8	0,2
Criterios de liberación		<5	>90	<5

Tabla 11. Estabilidad del lote de factibilidad IgGSC 62/1 a 2-8°C y a 28-30°C

			MSD (HP-SEC) (%)		
Lote	°C	Mes	Agregados (>450 KDa)	Oligo/dímeros + monómeros	Fragmentos (<70 Kda)
	2-8	0	0,2	99,5	0,3
		1	0,1	99,7	0,2
		3	0,2	99,6	0,2

			MSD (HP-SEC) (%)		
Lote	°C	Mes	Agregados (>450 KDa)	Oligo/dímeros + monómeros	Fragmentos (<70 Kda)
IgGSC 62/1		6	0,3	99,4	0,3
		12	0,4	99,3	0,3
		18	0,4	99,2	0,4
	28-30	0	0,2	99,5	0,3
		1	0,2	99,2	0,6
		3	0,3	98,7	1,0
		6	0,6	98,0	1,4
		12	1,2	95,6	3,2
		18	1,9	93,5	3,8
Criterios de liberación			<5	>90	<5

6. Conclusión

[0133] Con los datos se confirma que el producto cumple con las especificaciones predefinidas para los parámetros investigados, durante un almacenamiento de hasta 18 meses a 2-8°C y a 28-30°C.

Ejemplo 5. Tratamiento a bajo pH para inactivar los virus

PROPÓSITO y FUNDAMENTO

Introducción

[0134] La inmunoglobulina subcutánea (humana) en la solución con 14%-20% de viralidad triple reducida (TVR) que se conoce como la solución **Subcuvia NG** se manufactura a partir de plasma humano combinado. Después de llevar a cabo pasos de captura de masa para eliminar los factores de

coagulación/inhibidores, la purificación de Subcuvia NG comienza con un fraccionamiento con alcohol de Cohn modificado, que da como resultado un precipitado intermedio principal G, y que es seguido por un proceso ulterior que comprende una purificación por cromatografía, así como tres pasos diferentes para inactivar/eliminar los virus. En este estudio, se investigó en detalle la capacidad de reducción de virus del almacenamiento a bajo pH del producto final.

[0135] El proceso de purificación ulterior comprende los siguientes pasos: el precipitado G suspendido nuevamente se somete a un tratamiento con solvente/detergente (S/D), una cromatografía de intercambio catiónico con una columna de carboximetil(CM)-sefarosa de flujo rápido y una cromatografía de intercambio aniónico usando una columna de ANX-sefarosa de flujo rápido, una nanofiltración, una ultra/diafiltración, un ajuste del pH y una filtración estéril, a lo que sigue el envasado. Una vez realizado el envasado aséptico de la solución **Subcuvia NG**, se la somete a un almacenamiento a bajo pH en el recipiente final (para hallar una ilustración esquemática del proceso de manufactura, véase el esquema del proceso más adelante).

Esquema del proceso

[0136] En el esquema del proceso **A**, que se ilustra en la figura 2, se provee una vista general de la parte ulterior del esquema para manufacturar la solución **Subcuvia NG**, a partir del paso 10. El intermediario hecho a medida que se usa en este estudio es igual al usado en el paso de "almacenamiento previo del producto final" del proceso.

[0137] En el esquema del proceso **B**, que se ilustra en la figura 2, se provee una vista general del proceso a menor escala usado en este estudio,

incluyendo la toma de muestras para determinar la titulación de virus.

Propósito

[0138] Para proveer un margen de seguridad elevado con relación a la transmisión potencial de virus, en el proceso para manufacturar la solución **Subcuvia NG** se integran tres pasos de inactivación/remoción de virus, cuyos modos de acción se complementan mutuamente:

- Un tratamiento con solvente/detergente (paso 11);
- Una nanofiltración (paso 14);
- Un almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada en el recipiente final (envasado post-aséptico).

[0139] La capacidad y la robustez del almacenamiento a bajo pH y a alta temperatura con relación a la inactivación de los virus ya fue investigada en un estudio previo, donde se usó un producto de **IGIV 10% TVR**, equivalente a **Subcuvia NG**, pero con una concentración de proteínas ajustada en 10% para la administración *i.v.* Los resultados obtenidos en este estudio permitieron comprobar que todos los virus con recubrimientos lipídicos evaluados eran inactivados de manera efectiva y robusta, y que el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) era el que presentaba la cinética de inactivación más lenta. Más aun, fue posible demostrar que este paso del proceso también contribuye a la seguridad viral del proceso de manufactura, con relación a los virus de ADN sin recubrimientos lipídicos. **Subcuvia NG** e **IGIV 10% TVR** son productos de inmunoglobulina, donde **Subcuvia NG** es la variación para la administración subcutánea e **IGIV 10% TVR** es la variación del producto para aplicaciones *i.v.* Ambos comparten el mismo proceso de manufactura, hasta los pasos de ultrafiltración/diafiltración y formulación, donde la única diferencia es que la

concentración de proteínas de **Subcuvia NG** se ajusta en un rango de entre 14% y 20%, en lugar de 10%.

[0140]Entonces, se evaluó la capacidad y la robustez del paso de almacenamiento a bajo pH y a alta temperatura en la manufactura de **Subcuvia NG** (véase The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Evaluation of Medicines for Human Use (2001): CPMP Biotechnology Working Party – Note for Guidance on Plasma-Derived Medicinal Products, CPMP/BWP/269/95 (rev. 3)), con relación a la inactivación del BVDV y del MMV, mediante el establecimiento de los parámetros críticos del proceso en los límites superior e inferior especificados para el proceso de manufactura (es decir, el tiempo, el límite inferior de la temperatura, el límite superior del pH). Además, para investigar adicionalmente la robustez de este paso de inactivación de los virus, se redujo la temperatura durante un período de tiempo dado en los procedimientos a escala pequeña.

[0141]Como se describió con anterioridad, se usaron los siguientes virus recubiertos y no recubiertos:

- El virus de la diarrea viral bovina (BVDV), como un modelo del virus de la hepatitis C (HCV) y de otros virus de ARN pequeños recubiertos con lípidos;
- El virus minúsculo del ratón (MMV), como un modelo del parvovirus humano B19 (B19V) y de otros virus de ADN pequeños no recubiertos.

[0142]De acuerdo con los lineamientos CPMP 268/95 (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Human Medicines Evaluation Unit (1996): CPMP Biotechnology Working Party – Note for Guidance on Virus Validation Studies: The Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses, CPMP/BWP/268/95

(revisado)), el estudio se llevó a cabo en un modelo a pequeña escala del paso de manufactura respectivo. La validez de los resultados obtenidos con el paso de manufactura a pequeña escala de "almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada", con relación a la inactivación de los virus en la manufactura de la solución **Subcuvia NG**, se demostró a partir de una comparación de los parámetros especificados para este paso de manufactura en el proceso de producción a gran escala con los parámetros del proceso en el modelo a pequeña escala. Adicionalmente, se analizaron parámetros bioquímicos seleccionados y se los comparó con los parámetros respectivos en el proceso a gran escala.

MATERIALES, MÉTODOS Y EQUIPO

Virus y células

[0143] Se usa la cepa NADL del BVDV (clonada por medios biológicos, ATCC VR-1422), obtenida en la Colección Americana de Tipos de Cultivo (ATCC; Rockville, Maryland). El virus se propaga en células MDBK (ATCC CCL-22), de acuerdo con procedimientos de operación convencionales, y se titula en células BT (ATCC CRL-1390).

[0144] La cepa prototípica del MMV (ATCC VR-1346) se obtuvo en la Colección Americana de Tipos de Cultivo, Rockville, Maryland. El virus se propagó de acuerdo con procedimientos de operación convencionales y se tituló en células A9 (ATCC CCL-1.4).

Artículo de prueba

[0145] Los siguientes lotes del intermediario **Subcuvia NG**, preparado a medida antes del paso de "almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada", es decir, después del paso de envasado aséptico de la manufactura,

se obtuvieron en el Departamento de Soporte de Productos, PPD, de Baxter, Industriestrasse 131, Viena, Austria:

- El lote número IGSC64, con una concentración de proteínas de 13,5%
- El lote número IGSC64, con una concentración de proteínas de 20,9%

[0146] En el recipiente final, el material se envasó a una temperatura de entre +2°C y +8°C, y se lo usó en un período de 6 meses.

Amortiguadores/soluciones

Soluciones para ajustar el pH

[0147] El pH se ajustó usando NaOH 0,5 M o HCl 0,5 M (ambas soluciones se almacenaron a temperatura ambiente y se usaron en un período de 12 meses).

Preparación del ácido clorhídrico (HCl) 0,5 M

Componente	Componente por litro de la solución	Vida de almacenamiento	Almacenamiento
HCl al 37%	41,4 ± 0,4 ml	12 meses	23 ± 5°C

[0148] Los reactivos, es decir, el agua destilada y el HCl, se combinaron a temperatura ambiente.

Preparación del hidróxido de sodio 0,5 M (NaOH)

Componente	Componente por kg de agua destilada	Vida de almacenamiento	Almacenamiento
NaOH	20,0 ± 0,2 g	12 meses	± 5°C

[0149] La cantidad respectiva de NaOH se disolvió en agua destilada a temperatura ambiente.

Soluciones para medir el pH

[0150] El pH se midió directamente y en una solución diluida de acuerdo la Farmacopea Europea (EP). Para medir el pH de acuerdo con el método de la

EP, la concentración de proteínas se diluyó hasta 1% usando una solución de NaCl al 0,9%.

[0151] La solución de NaCl al 0,9% se preparó como se indica a continuación: se disolvieron $9,0 \pm 0,9$ g de NaCl en 1000 ml de agua destilada. La solución se filtró a través de un tamiz de $0,2 \mu\text{m}$, se almacenó a temperatura ambiente y se usó en un período de 12 meses.

Medio de cultivo para las células

[0152] Los medios usados para cultivar las células o para titular los virus se prepararon de acuerdo con procedimientos de operación convencionales, con el objeto de realizar la titulación de los virus BVDV y MMV.

Ensayos de titulación de los virus

Ensayo de TCID₅₀

[0153] Las muestras que contenían los virus se titularon con ensayos de TCID₅₀, de acuerdo procedimientos de operación convencionales. En resumen, se prepararon diluciones semilogarítmicas en serie en el medio de cultivo de tejido respectivo y se agregaron 100 μl de cada dilución a cada una de las 8 cavidades de una placa de microtitulación sembrada con la línea celular indicadora respectiva. Las placas de microtitulación se almacenan en unidades de almacenamiento humidificadas y con una concentración de CO₂ regulada, a una temperatura de $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. La evaluación de los efectos citopáticos se efectúa mediante la inspección de las células bajo un microscopio, después de 7 días de almacenamiento.

[0154] Las medianas de las dosis infecciosas para el cultivo de tejido (TCID₅₀) se calcularon de acuerdo con la distribución de Poisson y se expresaron como $\log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$.

Titulación del BVDV en bruto

[0155] Los estudios se realizaron en muestras tratadas con el MMV. Con el fin de disminuir el límite de detección para las muestras tratadas con el MMV tomadas del intermediario **Subcuvia NG** después de 20 y 27 días de almacenamiento a bajo pH, las muestras se titularon como se indica a continuación. Además del ensayo de TCID₅₀ convencional, se agregan muestras de la dilución 1:3,16 (semilogarítmica) y de las diluciones semilogarítmicas subsiguientes (para la dilución se usa el medio de cultivo celular respectivo) a las cavidades (a razón de 100 µl por cavidad) de placas de microtitulación de 96 cavidades sembradas con la línea celular indicadora respectiva. El almacenamiento de las células y la evaluación del efecto citopático del virus respectivo se realizan como se describió con anterioridad (ensayo de TCID₅₀). Los resultados se calcularon como se describe a continuación. Se calculó la relación R_{Vol} , entre el volumen titulado en la titulación en bruto y el volumen titulado en el ensayo de TCID₅₀ regular. Se sustrae el $\log_{10}$ de R_{Vol} de la titulación de virus obtenida en el ensayo de TCID₅₀, y el resultado se expresa como la titulación de virus determinada con la titulación en bruto.

Ejemplo

- Se evalúa una muestra (ensayo de TCID₅₀) en una placa de microtitulación en diluciones semilogarítmicas en serie (en el total de 12 columnas) y se establece que las cavidades son negativas desde la dilución 0 (es decir, sin dilución) en adelante. Con el cálculo de acuerdo con la distribución de Poisson, se obtiene una titulación de virus $<0,11 \log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$. El volumen total correspondiente de la muestra evaluada es

de 1,17 ml.

- La misma muestra (dilución 0) se aplica en las cavidades de una placa de microtitulación (titulación en bruto). Entonces, el volumen total de la muestra aplicada es de 9,6 ml
- La relación entre los volúmenes es $R_{Vol} = 9,6/1,17 = 8,21$; $\log_{10} (R_{Vol}) = 0,91$.
- Por ende, la titulación de virus calculada es $< 0,11 - 0,91$; es decir $< -0,80$. El límite superior del intervalo de confianza de la titulación de virus se calcula de manera idéntica.

Cálculo de la titulación de virus cuando no se determina infectividad en muestras cinéticas sucesivas

[0156] Cuando no se detecta infectividad viral en las muestras cinéticas sucesivas hasta el final del muestreo, una vez completo el almacenamiento a bajo pH, se tiene en cuenta el volumen de todas las muestras negativas sucesivas usadas para las cavidades en el ensayo de TCID₅₀ con un resultado claramente negativo para calcular el límite de detección del ensayo. Para esto se usa la siguiente fórmula (véase también el apéndice 1):

Titulación de virus basada en n muestras cinéticas negativas sucesivas

$$[\log_{10} (TGCD_{50}/ml)] = < -\log_{10} \left(\sum_{i=1}^n 1/10^{X_i} \right)$$

donde

X_i ($i = 1, 2, 3, \dots, n$) es la titulación de cada virus individual $[\log_{10}(TCID_{50}/ml)]$ de n muestras negativas sucesivas.

[0157] Si todas las muestras negativas tienen la misma titulación, es decir, x, la fórmula se simplifica:

Titulación de virus basada en n muestras cinéticas negativas sucesivas

$$[\log_{10} (\text{TGCD}_{50}/\text{ml})] = \bar{x} - \log_{10}(n)$$

Citotoxicidad

[0158] La citotoxicidad de los intermediarios del proceso sobre las líneas celulares indicadoras de los virus se determinó a partir de un intermediario **Subcuvia NG** sometido a un tratamiento simulado, es decir, tratado con el medio BT para las células infectadas (suero de caballo al 5%)*, en lugar de una solución madre del virus, y también a partir de material de partida sometido a un tratamiento simulado, a un ajuste del pH (en $4,9 \pm 0,1$) y a una filtración a través de un tamiz de $0,45 \mu\text{m}$, para cada línea celular usada para determinar la citotoxicidad. Las muestras se analizaron en forma de muestras que contenían virus, es decir, se las sometió a una dilución en serie y se las almacenó con la línea celular indicadora. Después del almacenamiento, se determinó la mayor concentración no citotóxica. Con relación a las variaciones en estos sistemas biológicos, las desviaciones de pasos $\pm$ semilogarítmicos se consideraron no significativas cuando se comparó la citotoxicidad en las muestras tratadas con virus y sometidas a tratamientos simulados.

*La composición del medio BT para las células infectadas es como se indica a continuación: DMEM (que contiene 4,5 g/l de D-glucosa) + 1% (v/v) de L-glutamina (200 mM) + 1% (v/v) de sulfato de gentamicina (10 mg/ml) + 1% (v/v) de piruvato de sodio + 2% (v/v) de bicarbonato de sodio (7,5%) + 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales + 5% (v/v) de suero de caballo.

Interferencia

[0159] Para las muestras con bajas titulaciones de virus, es necesario evaluar la influencia de la matriz de muestreo sobre el desempeño del ensayo de infectividad. Para las muestras que contienen titulaciones de virus elevadas, la

parte relevante de la serie de dilución, es decir, la parte donde pueden calificarse las cavidades positivas para virus y negativas para virus, tiene lugar con las mayores diluciones de las muestras. En consecuencia, puede omitirse la influencia de la matriz de muestreo, que también comprende varios pasos de dilución $\log_{10}$, sobre la detección de la infectividad de los virus. La interferencia con las determinaciones de las titulaciones virales bajas entre las muestras que contenían el intermediario **Subcuvia NG** se midió como se detalla a continuación. Se tomaron muestras de un material de partida sometido a un tratamiento simulado, un ajuste del pH (en $4,9 \pm 0,1$), una filtración a través de un tamiz de $0,45 \mu\text{m}$ (el intermediario **Subcuvia NG**), una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo de tejido apropiado, un tratamiento 1:100 con una suspensión madre de virus diluida con antelación (en el medio de cultivo de tejido apropiado, es decir, el medio BT para las células BT/el BVDV y el medio A9 para las células A9/el MMV), hasta una titulación nominal de 2 ó 3 $\log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$, y una titulación como se describió con anterioridad. Las titulaciones obtenidas con los intermediarios del proceso tratados se compararon con las de los controles con el medio de cultivo tratado.

Cálculo de los factores de reducción de los virus

[0160] El análisis de la capacidad de inactivación de virus del proceso se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos CPMP 268/95 [3], usando la siguiente formula:

$$R = \log \left(\frac{V_1 x T_1}{V_2 x T_2} \right),$$

donde

R = factor de reducción de los virus;

V_1 = volumen de material de partida;

$T1$ = concentración de los virus en el material de partida [TCID₅₀/ml];

$V2$ = volumen de material después del paso;

$T2$ = concentración de los virus después del paso [TCID₅₀/ml].

[0161] Para calcular R , se usaron los volúmenes y las titulaciones de cada muestra tratada antes y después del tratamiento. Cuando el virus era indetectable, se tomó el límite de detección de la titulación del virus para el cálculo. De acuerdo con los procedimientos de operación convencionales, los cálculos se llevaron a cabo con titulaciones de virus ($\log_{10}$ [TCID₅₀/ml]), con dos cifras decimales; los factores de reducción se redondearon hasta la primera cifra decimal.

Determinación de los parámetros de convalidación

Tiempo, temperatura [°C]

[0162] El período de almacenamiento se midió con cronómetros; la temperatura se midió con sensores Pt-100 y se registró de manera continua.

Valor del pH

[0163] El valor del pH se determinó de acuerdo con procedimientos de operación convencionales, con un medidor del pH convencional de laboratorio, mediante una medición directa y también por medio de la implementación del método especificado en la Farmacopea Europea (EP), es decir, después de diluir las proteínas hasta 1% con una solución de NaCl al 0,9%. Más adelante, la expresión del pH con un sufijo (EP) denota la medición del pH de acuerdo con el método de la EP, mientras que "pH" sin sufijo denota una medición directa.

Determinación de otros parámetros

Distribución del tamaño molecular (MSD)

[0164] El análisis de la distribución del tamaño molecular por HPLC-SEC (cromatografía líquida de alto desempeño – cromatografía de exclusión por tamaño) fue realizado por el Departamento de Bioquímica Analítica de Baxter, Viena, Austria, de acuerdo con procedimientos de operación convencionales. El análisis de HPLC-SEC de todas las muestras de los lotes “a gran escala” (producidos en el Departamento de Soporte de Productos, PPD, de Baxter, Viena, Austria) se realizaron de acuerdo con esta prueba. Por consiguiente, para asegurar la equivalencia entre los resultados de las muestras de los procedimientos con tratamientos simulados (acumulados en el proceso a menor escala en el transcurso del estudio) y los resultados de las pruebas de los lotes “a gran escala”, el análisis de MSD de las muestras de los procedimientos con tratamientos simulados se realizó de acuerdo con la misma prueba y en el mismo departamento.

Electroforesis con acetato de celulosa

[0165] La electroforesis con acetato de celulosa (CAE) se llevó a cabo de acuerdo con procedimientos de operación convencionales en el Departamento de ACV de Baxter, Viena, Austria.

Redondeo

[0166] El redondeo se llevó a cabo de acuerdo con las prácticas convencionales.

- Los resultados del ensayo se redondearon hasta la misma cantidad de cifras decimales que la indicada para el parámetro respectivo en el proceso de manufactura, o sobre la base de la precisión del ensayo.
- Los cálculos se realizaron sin redondear los resultados de los ensayos, y solamente se redondeó el resultado final.

Equipo

- Se usó un medidor del pH convencional de laboratorio.
- Se usó una balanza analítica AT-100 y una balanza de laboratorio Sartorius BP3100P.
- La filtración a través del tamiz de 0,45 µm se efectuó con membranas de filtro de PVDF (Millex-HV o equivalentes).
- La duración del proceso se midió con cronómetros de laboratorio.
- Se usaron recámaras de bioseguridad clase II.
- Las células se almacenaron en incubadoras de CO₂ Heraeus con una humedad controlada.
- Se usaron agitadores magnéticos/barras agitadoras para la mezcla.
- La temperatura se controló con crióstatos Haake o Julabo y/o con un bloque de calentamiento con agitación.
- La temperatura se midió usando sensores Pt-100 conectados con grabadores YOKOGAWA µR 1000.

DISEÑO DEL ESTUDIO

[0167] Con el fin de investigar la robustez del paso de manufactura de "almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada" de **Subcuvia NG** con relación a la inactivación de los virus, los parámetros clave para la eficacia de la inactivación de los virus se definieron como se describe a continuación. Los procedimientos se llevaron a cabo bajo condiciones apropiadas para investigar la robustez de la inactivación de los virus con el almacenamiento a bajo pH. En la tabla A se provee una comparación de las condiciones para el proceso a gran escala y para los procedimientos a menor escala.

- Concentración de proteínas: Como **Subcuvia NG** es un producto en

desarrollo, el rango de la concentración de proteínas para el lote formulado es más bien amplio, es decir, de aproximadamente entre 14% y 20%, y podrá precisarse más adelante. Por ende, para investigar la robustez del tratamiento a bajo pH, se llevaron a cabo dos procedimientos (diseños de procedimiento) en los dos extremos de las concentraciones posibles de proteínas. El diseño del procedimiento 1 se llevó a cabo con una concentración de proteínas de 13,5%; el diseño del procedimiento 2 se llevó a cabo con una concentración de proteínas de 20,9%.

La concentración de proteínas del material hecho a medida fue provista por el Departamento de Soporte del Producto, PPD. La concentración de proteínas del material hecho a medida no fue determinada nuevamente, debido que ya había datos disponibles de los análisis realizados después de la producción del intermediario hecho a medida **Subcuvia NG**. Como el material usado para el proceso a menor escala había sido filtrado y almacenado a 2°C-8°C hasta el comienzo de dicho proceso (es decir, no había sido sometido a un procedimiento de congelamiento/descongelamiento), no se anticipan cambios en la concentración de proteínas para el intermediario final formulado y sometido a una filtración estéril.

- Valor del pH: En la producción, se especifica un rango de pH de 4,4-4,9 (medición directa) para el producto final **Subcuvia NG** durante el almacenamiento a bajo pH. Para investigar la eficacia y la robustez del tratamiento a bajo pH bajo condiciones menos favorables para la inactivación de los virus, ambos procedimientos se llevaron a cabo en el límite superior especificado, es decir, a un pH de $4,9 \pm 0,1$. El pH se midió después de realizar el tratamiento y ajustarlo en el límite superior, de ser necesario. Una vez

realizado el almacenamiento a bajo pH durante 27 días $\pm$ 5 horas, el pH se midió nuevamente de manera directa y con el método recomendado por la Farmacopea Europea, es decir, con la dilución de las proteínas hasta 1% con una solución de NaCl al 0,9%.

- Temperatura: En el proceso de producción, la temperatura durante el almacenamiento a bajo pH se fija en 30-32°C. Para investigar la robustez del almacenamiento a bajo pH bajo condiciones menos favorables para la inactivación de los virus, todos los procedimientos a menor escala se llevaron a cabo en el límite inferior del rango de temperatura, es decir, a $30 \pm 1^\circ\text{C}$. Para examinar el impacto potencial de las fluctuaciones en la temperatura, la temperatura se redujo hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante ≥ 6 horas una vez a la semana (es decir, la disminución de la temperatura se inició durante los días 0, 7, 14, 20 y 27; la numeración de los días hace referencia a los días calendarios, es decir, el día 0 es el día en el que se comienza con el almacenamiento). De manera errónea, la disminución en la temperatura hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 horas se realizó de manera errónea, dos veces por semana, durante la primera y la segunda semana de almacenamiento, es decir, durante los días 0 y 4 del almacenamiento en la primera semana y durante los días 7 y 10 del almacenamiento en la segunda semana del tratamiento a bajo pH.
- Tiempo: La duración del almacenamiento típicamente se halla en el rango de entre 21 días (necesarios para la inactivación efectiva del BVDV) y 28 días (límite superior por razones técnicas/logísticas). Para investigar la eficacia y la robustez del tratamiento a bajo pH bajo condiciones menos favorables para la inactivación de los virus, todos los procedimientos a menor escala se llevaron a cabo debajo de los límites indicados con anterioridad para el rango

del período de almacenamiento; es decir, durante 20 días $\pm$ 4 horas para la opción breve y durante 27 días $\pm$ 5 horas para la opción prolongada. El intermediario tratado se almacenó a pH bajo y a temperatura elevada durante 27 días $\pm$ 5 horas, pero las muestras para determinar la titulación de los virus se tomaron después de 20 días $\pm$ 4 horas de almacenamiento, con el fin de investigar la eliminación de los virus después de 3 semanas de almacenamiento (véase también la tabla A).

[0168] En general, se llevó a cabo un total de 4 procedimientos de tratamiento con virus (2 con el BVDV y 2 con el MMV) para investigar la robustez de la capacidad de inactivación de virus del paso de manufactura de "almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada". Además, se llevaron a cabo dos procedimientos de control sin tratamiento para generar muestras para determinar los parámetros bioquímicos. Además, se llevaron a cabo dos procedimientos de control con un tratamiento simulado, y las muestras tomadas de estos procedimientos se usaron para investigar los efectos potenciales (es decir, la citotoxicidad y la interferencia) de los intermediarios del proceso sobre el ensayo de titulación de los virus.

[0169] También, para demostrar la equivalencia de los procesos a pequeña escala y a gran escala, se llevaron a cabo los siguientes análisis bioquímicos sobre el producto final, antes y después del almacenamiento a bajo pH: distribución del tamaño molecular y electroforesis con acetato de celulosa.

Tabla A. Parámetros del proceso y bioquímicos de los procedimientos a menor escala, en comparación con el proceso de manufactura a gran escala. En negrita se señalan los parámetros para los cuales los rangos diferentes de los del proceso a gran escala se aplican al proceso a

pequeña escala.

Parámetro	Proceso a gran escala	Proceso a menor escala	
		Diseño del procedimiento 1	Diseño del procedimiento 2
Antes del tratamiento y el ajuste del pH			
Concentración de proteínas [g/100ml]	14-20 ¹	14 ± 1 ¹	20 ± 1 ¹
Después del tratamiento y el ajuste del pH			
pH (medición directa)	4,4-4,9	4,9 ± 0,1	4,9 ± 0,1
Almacenamiento a bajo pH			
Período de almacenamiento [días]	21-28 ²	20 d ± 4 h ³ 27 d ± 5 h ³	20 d ± 4 h ³ 27 d ± 5 h ³
Temperatura durante el almacenamiento [°C]	30-32	30 ± 1 ⁴	30 ± 1 ⁴
Después del almacenamiento a bajo pH			
pH (medición directa)	4,4-4,9	Según se lo midió (no especificado)	
pH (después de diluir las proteínas hasta 1% con NaCl al 0,9%) de acuerdo con la EP ⁵	4,6-5,1	Según se lo midió (no especificado)	

¹Como **Subcuvia NG** es un producto en desarrollo, la concentración de proteínas aún no ha sido definida con precisión. Por consiguiente, los dos procedimientos a menor escala se llevaron a cabo en los dos extremos de la concentración posible de proteínas.

²El período de almacenamiento aún no ha sido definido con precisión, ya que depende del resultado de los estudios de eliminación de los virus.

³Ambos procedimientos se llevaron a cabo durante 27 días $\pm$ 5 horas, y las muestras para la titulación de los virus se tomaron el día 20 del almacenamiento, de modo que también hubiera datos sobre la inactivación de los virus disponibles para la opción del proceso a gran escala, con 21-22 días de almacenamiento.

⁴La temperatura se redujo hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 horas una vez a la semana (es decir, la disminución de la temperatura se inició durante los días 0, 7, 14, 20 y 27; la numeración de los días hace referencia a los días calendarios, es decir, el día 0 es el día en el que se comienza con el almacenamiento) del almacenamiento. Como se describe en la sección 4.1.1 ("perfil de temperatura"), la disminución en la temperatura hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 horas se realizó de manera errónea, dos veces por semana, durante la primera y la segunda semana de almacenamiento (véase también DR1_0407).

⁵Método de acuerdo con la Farmacopea Europea.

Procedimiento experimental

[0170] Debido a su complejidad, la secuencia de los pasos de tratamiento con virus, de ajuste del pH y de filtración a través de tamices de 0,45 mm se ilustra en el diagrama de flujo de la figura 3 (el grosor de las flechas representa los volúmenes relativos).

Material de partida

[0171] Para el procedimiento 1, se tomó material hecho a medida (lote número IGSC64) con una concentración de proteínas de 13,5%. Este material se usó para poner en práctica los procedimientos en el límite inferior de la

concentración posible de proteínas, en el límite superior del rango de pH (es decir, 4,97 para el BVDV y 4,93 para el MMV) y en el límite inferior del rango de temperatura (es decir, a 29,4°C).

[0172] Para el procedimiento 2, se tomó material hecho a medida (lote número IGSC64) con una concentración de proteínas de 20,9%. Este material se usó para poner en práctica los procedimientos en el límite superior de la concentración posible de proteínas, en el límite superior del rango de pH (es decir, 4,92 para el BVDV y 4,86 para el MMV) y en el límite inferior del rango de temperatura (es decir, a 29,4°C).

Tratamiento con los virus: BVDV, MMV

[0173] Se trataron 45,5 ml de cada material de partida con 4,5 ml de la suspensión madre de virus, y se tomó una muestra de 1 ml después de 1 ó 2 minutos de agitación. La muestra inmediatamente se sometió a una dilución 1:3,16 (es decir, 1 volumen de la muestra más 2,16 volúmenes del medio de cultivo celular) con el medio de cultivo celular respectivo y se tituló. Luego se tomó otra muestra de 3 ml y se la filtró a través de una membrana de PVDF de 0,45 µm. De inmediato, se sometió un ml del material filtrado a una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo celular respectivo y se lo tituló.

Ajuste del pH

[0174] El pH de una alícuota de 35 ml del material de partida tratado con los virus se ajustó en $4,9 \pm 0,1$ (en ambos procedimientos) usando una solución de HCl 0,5 M con agitación. Después, el material se dividió en dos alícuotas. Una alícuota de 30 ml se usó en el "almacenamiento a bajo pH", y una alícuota de 5 ml se usó en el "control de mantenimiento de la temperatura" (véase la sección "controles de mantenimiento").

[0175] El pH de otra alícuota de 10 ml del material de partida tratado con los virus se ajustó en $7,0 \pm 0,1$ usando una solución de HCl 0,5 M, y se usó una alícuota de 5 ml del material sometido al ajuste del pH para el "control de mantenimiento del pH".

[0176] Los 5 ml remanentes del material sometido al ajuste del pH se usaron para el "control de mantenimiento combinado del pH y la temperatura" (véase la sección "controles de mantenimiento").

Controles de mantenimiento

[0177] Para investigar el mecanismo de la inactivación de los virus, es decir, si está mediada por el pH, por la temperatura o por una combinación de ambos, se almacenaron controles de mantenimiento bajo distintas condiciones.

[0178] Cada una de las alícuotas de 5 ml del material de partida sometido al tratamiento con virus y el ajuste del pH (en $7,0 \pm 0,1$) se filtró a través de una membrana de filtro de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$, en un recipiente congelado. Una alícuota se almacenó a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, junto con el material procesado y tratado, y luego se mantuvo a esta temperatura hasta el final del proceso (control de mantenimiento del pH, "pH HC"). La otra alícuota se almacenó de inmediato a 2°C - 8°C durante $27 \text{ días} \pm 5 \text{ horas}$ (control de mantenimiento combinado del pH y la temperatura, "c HC").

[0179] La alícuota de 5 ml del material de partida sometido al tratamiento con virus y el ajuste del pH (en $4,9 \pm 0,1$) y del material de partida filtrado a través del tamiz de $0,45 \mu\text{m}$ (véase el "ajuste de pH" descrito con anterioridad) se almacenó de inmediato a 2°C - 8°C hasta el final del proceso (control de mantenimiento de la temperatura, "t HC").

[0180] El volumen mínimo de todos los controles de mantenimiento después de

la filtración siempre fue mayor que 3 ml, por lo que siempre hubo disponible un volumen apropiado para determinar la titulación de virus después del período de almacenamiento.

Almacenamiento a bajo pH

[0181] La alícuota de 30 ml del intermediario **Subcuvia NG** sometido al tratamiento con virus y el ajuste del pH (en $4,9 \pm 0,1$) se filtró a través de una membrana de filtro de PVDF de 0,45 μm , en una botella de vidrio estéril de 50 ml. El volumen mínimo del intermediario **Subcuvia NG** después de la filtración siempre fue mayor que 24 ml. Por consiguiente, hubo disponible un volumen suficiente para la titulación de los virus después del período de almacenamiento. Posteriormente, la temperatura se equilibró en $30 \pm 1^\circ\text{C}$ con una agitación lenta hacia adelante y hacia atrás, usando un baño de agua con una temperatura controlada con un crióstato y un sensor de la temperatura externa. El sensor de la temperatura externa y un electrodo adicional Pt 100 se colocaron en una botella de vidrio de 50 ml equivalente a las usadas para el almacenamiento a bajo pH, que luego se llenó con 30 ml de agua, la mayor cantidad posible de material procesado y tratado después de la filtración. La temperatura se registró de manera continua. Apenas el material hubo alcanzado una temperatura de 29°C , se comenzó con la toma de muestras. Cada muestra se sometió inmediatamente a una dilución 1:3,16 (es decir, 1 volumen de muestra más 2,16 volúmenes del medio de cultivo celular) con el medio de cultivo celular frío respectivo (almacenado a 2°C - 8°C) para impedir que continuara la inactivación de los virus debido al bajo pH, después de lo cual se realizó la titulación. En todos los procedimientos, el intermediario **Subcuvia NG** se almacenó con agitación (lentamente, hacia adelante y hacia

atrás) a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante el proceso completo, de 27 días $\pm$ 5 horas, con una reducción de la temperatura hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante al menos seis horas (≥ 6 horas), una vez por semana de almacenamiento. La disminución en la temperatura hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 6 horas se realizó de manera errónea, dos veces por semana, durante la primera y la segunda semana de almacenamiento, es decir, durante los días 0 y 4 del almacenamiento en la primera semana y durante los días 7 y 10 del almacenamiento en la segunda semana del tratamiento a bajo pH. Para hallar una descripción, véase la sección 4.1.1 ("perfil de temperatura"). Se tomaron muestras adicionales de acuerdo con el plan de muestreo (véase la sección 3.2), se las diluyó de inmediato como se describió con anterioridad y se las tituló. Una vez completo el almacenamiento a bajo pH a $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, se determinó el pH por medio de una medición directa y con el método recomendado por la Farmacopea Europea (es decir, una dilución hasta una concentración de proteínas de 1% con una solución de NaCl al 0,9%).

Procedimiento de control sin virus

[0182] Se llevaron a cabo dos procedimientos de control como se describió para los procedimientos con la aplicación de virus, donde se procesaron intermediarios **Subcuvia NG** sin tratar y filtrados a través de un tamiz de 0,45 μm . Se aplicaron parámetros del proceso iguales a los especificados para los procedimientos 1 y 2, respectivamente, que incluyeron los tratamientos con virus, excepto que no se ajustó el pH del material. Las muestras para la determinación de los parámetros bioquímicos se tomaron de acuerdo con el plan de muestreo (véase la sección 3.2).

[0183] Se determinó la citotoxicidad del material de partida sometido a un

tratamiento simulado (tratado a razón de 0,9:10 con el medio BT para las células infectadas*; antes de la titulación, la muestra se filtra como se describió con anterioridad) y del intermediario **Subcuvia NG** sometido a un tratamiento simulado y un ajuste del pH, después de filtrarlo a través de un tamiz de 0,45 μm . Las muestras para la determinación de la citotoxicidad se tomaron de acuerdo con el plan de muestreo (véase la sección 3.2).

*La composición del medio BT para las células infectadas es como se indica a continuación: DMEM (que contiene 4,5 g/l de D-glucosa) + 1% (v/v) de L-glutamina (200 mM) + 1% (v/v) de sulfato de gentamicina (10 mg/ml) + 1% (v/v) de piruvato de sodio + 2% (v/v) de bicarbonato de sodio (7,5%) + 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales + 5% (v/v) de suero de caballo.

Interferencia potencial

[0184] Se investigó la interferencia de la matriz de muestreo con la detección de los virus para las muestras que contenían el intermediario **Subcuvia NG**, después del ajuste del pH (en $4,9 \pm 0,1$), por duplicado para cada línea celular indicadora, como se indica a continuación. Se tomó una muestra de 1 ml del intermediario **Subcuvia NG** sometido a un tratamiento simulado, un ajuste del pH, una filtración a través de un tamiz de 0,45 μm y una dilución 1:3,16 (v/v) con el medio de cultivo celular frío respectivo (almacenado a 2°C-8°C). Posteriormente, se trataron 8 ml del material diluido en una proporción de 1:10 con 0,2 ml de la suspensión madre de virus diluida con antelación*, en una titulación calculada de 2,0 y 3,0 $\log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$. Después de la mezcla, se tomaron muestras y se las tituló de inmediato. Como control, se trataron 1,8 ml del medio de cultivo celular frío respectivo (almacenado a 2°C-8°C) de la misma manera con la suspensión madre de virus diluida con antelación, antes de la

titulación.

*Se usó el medio de cultivo celular apropiado [el medio BT para las células BT (BVDV), el medio A9 para las células A9 (MMV)] para la dilución preliminar de las suspensiones madre de virus.

Plan de muestreo

Titulaciones de los virus

[0185] Los rangos de aceptación a continuación se aplican a la toma de muestras: después de 1 día de almacenamiento, ± 1 hora, después de entre 2 y 6 días de almacenamiento, ± 2 horas, después de entre 7 y 13 días de almacenamiento, ± 3 horas, después de entre 14 y 20 días de almacenamiento, ± 4 horas, y después de entre 21 y 27 días de almacenamiento, ± 5 horas. Para hallar los códigos de las muestras, véase la sección 1.1 (esquema del proceso).

[0186] Las muestras se titularon de inmediato, sin un almacenamiento adicional.

Etapas de control	Cantidad
Suspensión madre de virus	1 x 0,3 ml
Material de partida tratado con virus	1 x 2 ml
Material de partida tratado con virus y filtrado	1 x 3 ml
Material de partida tratado con virus, sometido a un ajuste del pH y una filtración ^s	1 x 1 ml
Material de partida tratado con virus, sometido a un ajuste del pH y una filtración, almacenado a bajo pH, a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$, inmediatamente después de que la temperatura alcanzara los 29°C , es decir la muestra "0 d" ^s , después de un	1 x 1 ml cada uno

almacenamiento durante 7 días [§] , 14 días [§] , 20 días (solamente el MMV) [§] y 27 días (solamente el MMV) [§]	
Material de partida tratado con virus, sometido a un ajuste del pH y una filtración, almacenado a bajo pH, a 30 ± 1°C, después de un almacenamiento durante 20 días y 27 días (solamente el BVDV) [§] , titulado de acuerdo con un ensayo de TCID50 y con una titulación en bruto	1 x 6 ml cada uno
Control de mantenimiento del pH: pH 7,0 ± 0,1 a 30 ± 1°C	1 x 5 ml
Control de mantenimiento de la temperatura: pH 4,9 ± 0,1 § a 2°C-8°C	1 x 5 ml
Control de mantenimiento combinado del pH y la temperatura: pH 7,0 ± 0,1 a 2°C-8°C	1 x 5 ml

§Las muestras inmediatamente fueron sometidas a una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo celular frío respectivo antes de la titulación.

Determinación de la citotoxicidad

[0187]Las muestras se titularon de inmediato, sin un almacenamiento adicional.

Etapas de control	Cantidad (para cada línea celular y cada procedimiento)
Suspensión madre de virus	1 x 0,3 ml
Material de partida sometido a un tratamiento simulado y una filtración “SM Filt.”	1 x 3 ml
Material de partida sometido a un tratamiento simulado,	1 x 1 ml

un ajuste del pH y una filtración ^s “ SM pH Filt. ”	
---	--

§Las muestras inmediatamente fueron sometidas a una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo celular frío respectivo antes de la titulación.

Determinación de la interferencia

[0188]Las muestras se titularon de inmediato, sin un almacenamiento adicional.

Etapas de control	Cantidad
Suspensión madre de virus	1 x 0,3 ml
Intermediario Subcuvia NG sometido a un tratamiento simulado, un ajuste del pH ($4,9 \pm 0,1$), una filtración, una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo celular frío respectivo y un tratamiento en una proporción 1:10 con VSS diluido con antelación. hasta alcanzar una titulación calculada de 2,0 $\log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$	1 x 1 ml
Intermediario Subcuvia NG sometido a un tratamiento simulado, un ajuste del pH ($4,9 \pm 0,1$), una filtración, una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo celular frío respectivo y un tratamiento en una proporción 1:10 con VSS diluido con antelación. hasta alcanzar una titulación calculada de 3,0 $\log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$	1 x 1 ml
Medio de cultivo celular frío tratado en una proporción 1:10 con VSS diluido con antelación hasta alcanzar una titulación calculada de 2,0 $\log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$	1 x 2 ml
Medio de cultivo celular frío tratado en una proporción 1:10 con VSS diluido con antelación hasta alcanzar una titulación	1 x 2 ml

calculada de $3,0 \log_{10}[\text{TCID}_{50}/\text{ml}]$	
--	--

§Las muestras inmediatamente fueron sometidas a una dilución 1:3,16 con el medio de cultivo celular frío respectivo antes de la titulación.

Determinación de los parámetros bioquímicos

[0189] Solamente se tomaron muestras de cada procedimiento control sin tratar, y se las almacenó a 2-8°C hasta el análisis.

Etapas de control	Parámetro	Cantidad (incluyendo las muestras de respaldo)
Material de partida antes del tratamiento ¹	Distribución del tamaño molecular " SM – MSD "	2 x 1 ml
	Electroforesis con acetato de celulosa " SM – CAE "	
Material de partida tratado después del almacenamiento a bajo pH, a 30°C ± 1°C durante 20 días ²	Distribución del tamaño molecular " 20d – MSD "	2 x 1 ml
	Electroforesis con acetato de celulosa " 20d – CAE "	
Material de partida tratado después del	Distribución del tamaño molecular " 27d – MSD "	2 x 1 ml

almacenamiento a bajo pH, a 30°C ± 1°C durante 27 días ³	Electroforesis con acetato de celulosa "27d – CAE"	
---	--	--

¹Los datos generados durante la producción de los dos lotes "a gran escala" y del material preparado a medida (lote N° IGSC64) también se tuvieron en cuenta para la evaluación del proceso a menor escala.

²Los datos generados durante la producción de los dos lotes "a gran escala" también se tuvieron en cuenta para la evaluación del proceso a menor escala.

³Con relación a la etapa del desarrollo del producto, parece improbable que haya disponibles datos de los parámetros bioquímicos después de un período de almacenamiento de 28 días.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

[0190] La eficacia y la robustez del almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada de **Subcuvia NG**, como un paso dedicado a la inactivación de los virus con recubrimientos lipídicos y sin ellos, se investigaron con el BVDV y con el MMV, usando un modelo de laboratorio a menor escala de este paso. En el proceso a menor escala se definieron y se midieron los parámetros de la convalidación y los parámetros bioquímicos, y al comparar los resultados con las condiciones del proceso de manufactura, se estableció la equivalencia de los dos procesos.

Resultados de los parámetros de convalidación y bioquímicos

Parámetros de la convalidación

[0191] La validez del procedimiento a menor escala se verificó determinando los parámetros críticos para la inactivación de los virus, es decir, el pH del material procesado, la temperatura durante el almacenamiento a bajo pH y la

duración del almacenamiento.

Valor del pH antes del almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada

[0192] El pH del material procesado y tratado se midió y se ajustó en $4,9 \pm 0,1$ en todos los procedimientos, de modo que se hallara dentro de los límites especificados en el plan de estudio. Los valores del pH determinados después del almacenamiento se describen en la sección 4.1.2 (otros parámetros del proceso y bioquímicos).

Perfil de temperatura

[0193] Para investigar la robustez del paso de almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada contra las variaciones en la temperatura, se redujo la temperatura desde $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas, una vez por semana de almacenamiento. La temperatura siempre se halló dentro de los rangos especificados en el plan de estudio. Sin embargo, en la primera y la segunda semana de almacenamiento, la disminución en la temperatura hasta $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 6 horas se realizó de manera errónea, dos veces por semana, es decir, durante los días 0 y 4 en la primera semana y durante los días 7 y 10 en la segunda semana. Como este incidente convirtió el perfil del procedimiento en un escenario peor con relación a la inactivación de los virus, la robustez de la inactivación de los virus se investigó de manera aun más exhaustiva que lo que se había planeado originalmente.

Período de almacenamiento

[0194] La duración del almacenamiento a bajo pH y a temperatura elevada no ha sido especificada para el proceso de manufactura de **Subcuvia NG**. En función del resultado de este estudio, hay diversas opciones: una opción para la duración del período de almacenamiento es de 21-22 días; una segunda

opción puede ser de aproximadamente 28 días. Para investigar la eficacia y la robustez del tratamiento a bajo pH bajo condiciones menos favorable para la inactivación de los virus, todos los procedimientos a menor escala se llevaron a cabo debajo de los límites inferiores del período de almacenamiento posible; es decir, con un almacenamiento de 20 días $\pm$ 4 horas para la primera opción y con un almacenamiento de 27 días $\pm$ 5 horas para la segunda opción. El intermediario tratado se almacenó a pH bajo y a temperatura elevada durante 26 días + 22 horas (MMV, ambos procedimientos) y durante 27 días + 1 hora (BVDV, ambos procedimientos). Con el fin de investigar la eliminación de los virus después de 3 semanas de almacenamiento, se tomaron muestras para determinar la titulación de los virus después de 20 días + 1 hora de almacenamiento para el MMV y después de 20 días + 2 horas para el BVDV.

[0195] El período de almacenamiento estuvo dentro de los límites especificados para el proceso a pequeña escala, es decir, 20 días $\pm$ 4 horas y 27 días $\pm$ 5 horas en todos los procedimientos, valores inferiores a los límites inferiores considerados en la actualidad para el período de almacenamiento en la manufactura.

Otros parámetros del proceso y bioquímicos

pH después del almacenamiento a bajo pH

[0196] Después del almacenamiento a bajo pH, se midió nuevamente el valor del pH, tanto de manera directa como de acuerdo con el método recomendado por la Farmacopea Europea (EP), es decir, con una dilución con una solución de NaCl al 0,9% hasta obtener 1% de proteínas. El pH medido por medio de la medición directa posterior al tratamiento fue cercano al valor del pH antes del almacenamiento a bajo pH; es decir, las diferencias variaron entre $-0,07$ y

+0,04 (los signos representan las variaciones previas y posteriores al almacenamiento). El pH medido de acuerdo con el método de la EP fue siempre mayor en un factor de 0,2-0,3, en comparación con el determinado con el método de medición directa. Este ligero incremento en los valores del pH observado al usar el método de la EP es típico de estos dos métodos diferentes para determinar el pH. Este hecho también se considera en los límites especificados a escala de manufactura, donde los límites del pH después del tratamiento a bajo pH son 4,4 y 4,9 cuando se los determina por medio de una medición directa y 4,6 y 5,1 cuando se los determina con el método de la EP.

Distribución del tamaño molecular (MSD)

[0197] Se investigó la distribución del tamaño molecular (por medio de un análisis de HPLC) antes y después del almacenamiento de los dos procedimientos de control sin tratar. Los resultados de la prueba se compararon con tres lotes "a gran escala" producidos durante la etapa de desarrollo de **Subcuvia NG** y con el material preparado a medida, IGSC64 (con concentraciones de proteínas de 14% y 20%). El lote IGSC64, que también se conoce como el lote "a gran escala", no fue sometido a un almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada en la manufactura, ya que no había suficiente material disponible para este paso. Todos los resultados fueron comparables. Los valores de la distribución del tamaño molecular, especialmente el porcentaje de monómeros de IgG, fueron cercanos a los observados en los procedimientos "a gran escala". En el segundo procedimiento control, donde la concentración de monómeros de IgG después del almacenamiento fue unos pocos puntos porcentuales menor, se observa que el material antes del almacenamiento ya presentaba una concentración de monómeros de IgG

comparativamente baja, lo que también se aplica al material evaluado en el contexto del proceso "a gran escala". Por ende, los datos de la distribución del tamaño molecular sirven para apoyar la equivalencia del proceso a pequeña escala con el proceso a gran escala.

Pureza de la gammaglobulina

[0198] Se determinó la pureza de la gammaglobulina (determinada con una electroforesis CA) de muestras de los dos procedimientos control sin tratar y se la comparó con los resultados obtenidos con los dos lotes "a mayor escala" y con el material preparado a medida, IGSC64 (con concentraciones de proteínas de 14% y 20%, respectivamente, solamente antes del tratamiento a bajo pH; véase la explicación provista con anterioridad). Todos los valores determinados para la pureza de la gammaglobulina durante el proceso a pequeña escala fueron similares a los obtenidos con los lotes "a gran escala" y se hallaban dentro de la precisión del ensayo (la desviación estándar relativa es de 1,5%). Con estos resultados se demuestra la equivalencia del proceso a pequeña escala con el proceso de manufactura.

Resultados de la titulación de los virus

Citotoxicidad

[0199] La citotoxicidad de los intermediarios obtenidos antes del almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada se investigó en procedimientos control, usando un material sometido a un tratamiento simulado con un pH ajustado apropiadamente, como se describió para los procedimientos con tratamientos con virus. Antes y después de ajustar el pH, los intermediarios del proceso sometidos al tratamiento simulado solamente presentaron un efecto citotóxico débil sobre las células en los dos

procedimientos, excepto por el procedimiento 2, sobre las células BT, donde el intermediario con el pH ajustado no presentó efectos citotóxicos desde la dilución de $1,0 \log_{10}$ en adelante. No se observaron diferencias significativas en la citotoxicidad para los procedimientos donde se usaron tratamientos con virus.

Evaluación de la interferencia

[0200] Los resultados de la evaluación de la interferencia permiten comprobar que no hay diferencias significativas relacionadas con la matriz de muestreo en la detección de las titulaciones bajas del BVDV y del MMV. Las diferencias en las titulaciones de los virus entre los controles con el medio de cultivo celular tratado y los intermediarios **Subcuvia NG** tratados fueron de entre $-1,0 \log_{10}$ y $0,1 \log_{10}$, lo cual se halla dentro de la precisión del ensayo de titulación de los virus. Por lo tanto, las titulaciones obtenidas durante los procedimientos de inactivación de los virus no se vieron alteradas por los efectos de interferencia y representan la titulación efectiva de la muestra.

Inactivación de los virus

[0201] Se pusieron en práctica dos procedimientos con cada uno de los virus BVDV y MMV, es decir, el procedimiento 1, con una concentración de proteínas de 13,5%, y el procedimiento 2, con una concentración de proteínas de 20,9%. Ambos procedimientos se llevaron a cabo a $\text{pH } 4,9 \pm 0,1$ y a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, donde la temperatura se disminuyó hasta $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante un mínimo de 6 horas una vez por semana. Mediante la comparación de los resultados de los procedimientos, no se determinaron diferencias significativas en la cinética de inactivación de los virus entre los dos procedimientos, dentro de los límites superior e inferior de la concentración de proteínas posible de **Subcuvia NG**.

[0202] Al usar condiciones menos favorables para la inactivación de los virus, es decir, los límites inferiores del período de almacenamiento y de la temperatura, así como los límites superiores del pH, se comprobó una inactivación significativa del BVDV después de 20 días $\pm$ 4 horas de almacenamiento y una inactivación completa de todos los virus que se aplicaron sobre el intermediario **Subcuvia NG** respectivo después de 27 días $\pm$ 5 horas de almacenamiento, independientemente de las condiciones investigadas. En ambos procedimientos, todavía podía detectarse una infectividad residual del BVDV el día 20. Sin embargo, se inactivó la totalidad del BVDV hasta un valor inferior al límite de detección para el final del 27º día del almacenamiento. Los factores de reducción para el MMV reflejan una contribución sustancial de este paso del proceso a la seguridad viral del producto, también con relación a los virus sin recubrimientos lipídicos. Las titulaciones de virus y los factores de reducción para los virus individuales usados se describirán con mayor detalle más adelante. Además, se proveen ilustraciones gráficas de la cinética de inactivación de los virus para cada virus, después de la tabla de resultados respectiva.

BVDV

[0203] El BVDV había sido inhibido prácticamente hasta el límite de detección (procedimiento 1) o hasta el límite de detección (procedimiento 2) para el día 20 del almacenamiento, con factores de reducción de $5,3 \log_{10}$ y $5,5 \log_{10}$ en los procedimientos 1 y 2, respectivamente. Después de 27 días de almacenamiento, todos los BVDV aplicados sobre el intermediario **Subcuvia NG** habían sido inactivados debajo del límite de detección para ambos procedimientos, con factores de reducción de $>6,6 \log_{10}$ y $>6,5 \log_{10}$ en los

procedimientos 1 y 2, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la cinética de inactivación de los dos procedimientos. Los dos intermediarios en el procedimiento 1 (con una concentración de proteínas de 13,5%) y el procedimiento 2 (con una concentración de proteínas de 20,9%) presentaron una cinética de inactivación comparable.

[0204] El tratamiento a pH bajo y a temperatura elevada dio como resultado una inactivación efectiva del BVDV después de un almacenamiento durante 20 días $\pm$ 4 horas, con un factor de reducción promedio calculado de 5,4 $\log_{10}$. Después de 27 días de almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada, se alcanzó una inactivación completa del BVDV, hasta un valor inferior al límite de detección, con un factor de reducción promedio calculado $>6,6 \log_{10}$.

MMV

[0205] Para el MMV, se calcularon factores de reducción de 2,9 $\log_{10}$ y 3,1 $\log_{10}$ para los procedimientos 1 y 2, respectivamente, después de 20 días de almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada. El factor de reducción promedio calculado es de 3,0 $\log_{10}$. Después de 27 días de tratamiento a bajo pH, se obtuvieron factores de reducción de 3,4 $\log_{10}$ y 3,7 $\log_{10}$, donde el factor de reducción promedio calculado es de 3,6 $\log_{10}$. Estos factores de reducción son indicativos de una contribución sustancial de este paso del proceso al perfil de seguridad viral del proceso de manufactura con relación a los parvovirus, que son muy resistentes a la inactivación fisicoquímica. La cinética de inactivación de los virus en ambos procedimientos fue bifásica, con una inactivación más rápida durante los primeros 7 días y una inactivación algo más lenta durante las siguientes tres semanas.

Controles de mantenimiento

[0206] Para investigar el mecanismo de la inactivación de los virus, es decir, si está mediada por el pH, por la temperatura o por una combinación de ambos, se realizaron tres controles de mantenimiento bajo las condiciones respectivas.

[0207] La titulación del "control de mantenimiento combinado" (con un pH de $7,0 \pm 0,1$) mantenido a 2°C - 8°C durante 27 días $\pm$ 5 horas dio como resultado una titulación de los dos virus investigados que fue comparable a la del material de partida tratado con los virus, excepto por el MMV en el procedimiento 2, donde se observó una pequeña pérdida en la titulación ($1,6 \log_{10}$).

[0208] Al realizar el almacenamiento a $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y a pH $7,0 \pm 0,1$ ("control de mantenimiento del pH"), se comprobó que el virus BVDV, que tiene un recubrimiento lipídico, era muy sensible al almacenamiento a temperaturas elevadas. El BVDV fue inactivado en una medida de $4,6 \log_{10}$ en ambos procedimientos. También, el virus MMV, que carece del recubrimiento lipídico, fue inactivado en una medida de $3,3$ y $3,8 \log_{10}$ en el procedimiento 1 y el procedimiento 2, respectivamente.

[0209] La titulación de los "controles de mantenimiento de la temperatura" (t HC) después de un almacenamiento de 27 días $\pm$ 5 horas a pH bajo y a 2°C - 8°C dio como resultado una titulación de los dos virus investigados que fue comparable a la del material de partida tratado con virus. Con estos resultados se demuestra que tanto el BVDV como el MMV fueron resistentes al almacenamiento a un pH bajo, en el rango de entre 4,4 y 4,9, y a baja temperatura.

[0210] En conjunto, es posible extraer las siguientes conclusiones a partir de los resultados de los tres controles:

- La temperatura sería el factor más significativo para la inactivación del

BVDV, con una menor contribución del pH bajo (sobre la base del hecho de que el control a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ y el pH neutro dieron como resultado una inactivación sustancial pero no completa después de 27 días).

- Para la inactivación del MMV, la temperatura pareció ser el único factor relevante, ya que las titulaciones de virus de las muestras cinéticas a bajo pH después de 27 días fueron virtualmente idénticas al control a pH neutro y a 30°C .

RESUMEN Y CONCLUSION

[0211] En el transcurso del presente estudio, se estableció un modelo a pequeña escala de almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada en la manufactura de **Subcuvia NG**, y se demostró su equivalencia con el procedimiento de manufactura por medio de varios de los parámetros del proceso. Además, se realizó una comparación de los parámetros bioquímicos de los intermediarios del modelo a pequeña escala y del proceso de manufactura para apoyar la equivalencia de ambos procesos, y se comprobó que los factores de reducción obtenidos a pequeña escala también son válidos a gran escala. Para investigar la robustez con relación a la inactivación de los virus, se analizó el impacto de las distintas concentraciones de proteínas en **Subcuvia NG**, se ajustó el pH del material de partida tratado en el límite superior, en comparación con el proceso de manufactura, y se estudió el impacto de disminuciones periódicas en la temperatura. Los factores de reducción de los virus y la cinética de inactivación obtenidos en este estudio permiten demostrar que el virus BVDV, que tiene un recubrimiento lipídico, es inactivado de manera efectiva y robusta por el almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada en un período de 27 días. También, después del

almacenamiento a pH bajo y a temperatura elevada durante 20 días, se obtuvo una inactivación significativa del BVDV, con un factor de reducción promedio calculado de 5,4 $\log_{10}$ para el BVDV. Los factores de reducción promedio calculados para el modelo de parvovirus MMV, es decir, 3,0 $\log_{10}$ después de 20 días de almacenamiento y 3,6 $\log_{10}$ después de 27 días de almacenamiento, son indicativos de que este paso del proceso también contribuye a la seguridad viral del proceso de manufactura, con relación a los virus de ADN pequeños sin recubrimientos lipídicos que presentan una resistencia fisicoquímica elevada [2], con un período de almacenamiento de 20 ó 27 días.

[0212] Ambas concentraciones de proteínas investigadas presentaron la misma cinética de inactivación para el MMV y para el BVDV, lo que sería indicativo de que el impacto de la concentración de proteínas sobre la capacidad de inactivación de virus no es significativo para las soluciones concentradas de inmunoglobulina y para los virus BVDV y MMV.

[0213] Ha de comprenderse que los ejemplos y las formas de realización que se describen en la presente se proveen solamente con fines ilustrativos, y que, a la luz de dichos ejemplos y formas de formas de realización, aquellos versados en la técnica han de poder sugerir diversas modificaciones y cambios, los cuales quedarán incluidos dentro del espíritu y el alcance de esta solicitud, en función de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, las patentes y las solicitudes de patentes que se citan en la presente se incorporan en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito.

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa CARACTERIZADA PORQUE comprende más de aproximadamente 180 gramos de proteínas por litro de la composición, donde al menos 95% de las proteínas son IgG.
2. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE se produce con un proceso que da como resultado un producto apropiado para la administración subcutánea e intravenosa, y que puede tratarse a una temperatura elevada en el recipiente final para inactivar los virus, independientemente del ajuste de la concentración de proteínas en un rango de entre 10 y 22%.
3. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la IgG es IgG humana.
4. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE la concentración de proteínas es de aproximadamente 20% (p/v).
5. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE también comprende glicina aproximadamente 0,1-0,3 M.
6. La composición de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE tiene un pH de aproximadamente 3-6.
7. La composición de la reivindicación 6, CARACTERIZADA PORQUE tiene un pH de aproximadamente 4-6.
8. Una mejora en un método para preparar una composición de IgG concentrada a partir de plasma, CARACTERIZADA PORQUE comprende los siguientes pasos:
 - (1) concentrar las proteínas en una preparación de plasma hasta aproximadamente 5% (p/v) por ultrafiltración;

(2) concentrar aun más las proteínas en la preparación, hasta aproximadamente 20% (p/v), por diafiltración, donde al menos 95% de las proteínas son IgG.

9. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE el paso (1) se lleva a cabo usando una membrana de ultrafiltración con un límite nominal de peso molecular (NMWCO) de 100 kDa o menos.

10. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE el paso (2) se lleva a cabo contra un amortiguador de diafiltración de glicina con un pH de $4,2 \pm 0,1$.

11. El método de la reivindicación 10, CARACTERIZADA PORQUE el amortiguador de diafiltración tiene glicina 0,25 M y un pH de 4,0.

12. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE la concentración de proteínas después del paso (2) es mayor que 20% (p/v), y subsiguientemente se ajusta en aproximadamente 20% (p/v) con un amortiguador de diafiltración.

13. El método de la reivindicación 8, CARACTERIZADA PORQUE la IgG es IgG humana.

14. Un método para preparar una composición de IgG concentrada a partir de plasma, CARACTERIZADO PORQUE comprende los siguientes pasos:

- (1) separar el líquido y el precipitado del plasma por centrifugación;
- (2) mezclar etanol enfriado con antelación con el líquido de (1) para formar una mezcla con una concentración de etanol de aproximadamente 8% (v/v);
- (3) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (2) por centrifugación;
- (4) ajustar el pH y la concentración de etanol del líquido de (3) en aproximadamente 7,0 y 20-25% (v/v), respectivamente, con lo que se forma

una mezcla;

- (5) separar el líquido y el precipitado de la mezcla de (4) por centrifugación;
- (6) suspender nuevamente el precipitado de (5) con un amortiguador, en una proporción de aproximadamente 1 a 15 en peso, para formar una suspensión;
- (7) mezclar dióxido de silicio (SiO_2) con la suspensión de (6) y obtener un filtrado por filtración;
- (8) mezclar un detergente y alcohol frío con el filtrado de (7) y obtener un precipitado por centrifugación;
- (9) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un solvente o un detergente, y mantener la solución durante al menos 60 minutos;
- (10) después de (9), hacer pasar la solución a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna, para obtener una fracción eluida;
- (11) hacer pasar la fracción eluida de (10) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente;
- (12) hacer pasar el efluente a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado;
- (13) hacer pasar el nanofiltrado a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado;
- (14) diafiltrar el ultrafiltrado contra un amortiguador de diafiltración para generar una solución con una concentración de proteínas de aproximadamente 20% (p/v); y
- (15) esterilizar la solución de (14) filtrándola a través de un tamiz de $0,2\ \mu\text{m}$ o menos, de manera de obtener una composición de IgG concentrada.

15. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE también comprende el paso de almacenar los recipientes sellados a entre 30 y 32°C, durante aproximadamente entre 21 y 22 días.
16. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE también comprende un paso de formulación para tornar el producto con 20% de IgG tan estable como la formulación intravenosa al 10% usada en la actualidad.
17. Una composición acuosa producida con el método de cualquiera de las reivindicaciones 14-15, CARACTERIZADO PORQUE comprende al menos 18% (p/v) de inmunoglobulina.
18. La composición de la reivindicación 17, CARACTERIZADO PORQUE comprende al menos 20% (p/v) de inmunoglobulina.
19. Un método para tratar un paciente que sufre una inmunodeficiencia, una enfermedad autoinmune o una infección aguda, CARACTERIZADO PORQUE comprende administrarle al paciente una cantidad eficaz de la composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 17-18.

RESUMEN

Método novedoso y mejorado para preparar una composición altamente concentrada de inmunoglobulina a partir de plasma combinado para una inyección subcutánea. Composición de uso subcutáneo que comprende 20% o más de inmunoglobulina.

Figura 1. Ilustración gráfica del sistema de ultrafiltración/diafiltración

Primer paso: Concentración del nanofiltrado, diafiltración del primer concentrado y concentración final de la solución en bruto hasta alcanzar un valor de proteínas >22%.

El sistema de ultra/diafiltración está equipado con una membrana diseñada específicamente para incrementar la concentración de las proteínas en las soluciones (por ejemplo, la pantalla V de Millipore).

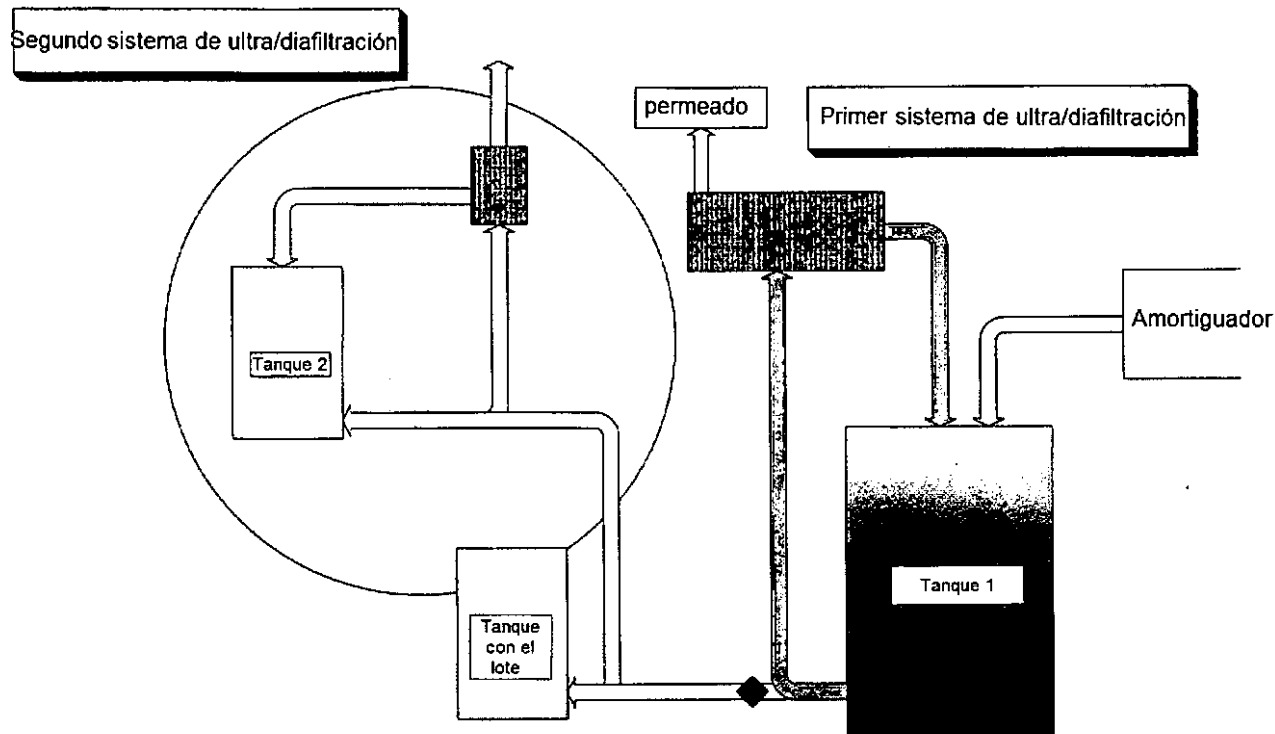


FIG. 1A

Como el volumen final de la solución concentrada en el tanque 1 de un lote de Sub Q NG 20% es solamente la mitad del volumen de un lote GAMMAGARD® LIQUID, el tanque 1 debe estar diseñado de manera tal de que pueda soportar volúmenes bajos, idealmente con un fondo cónico.

Segundo paso: Evacuación del sistema de ultra/diafiltración

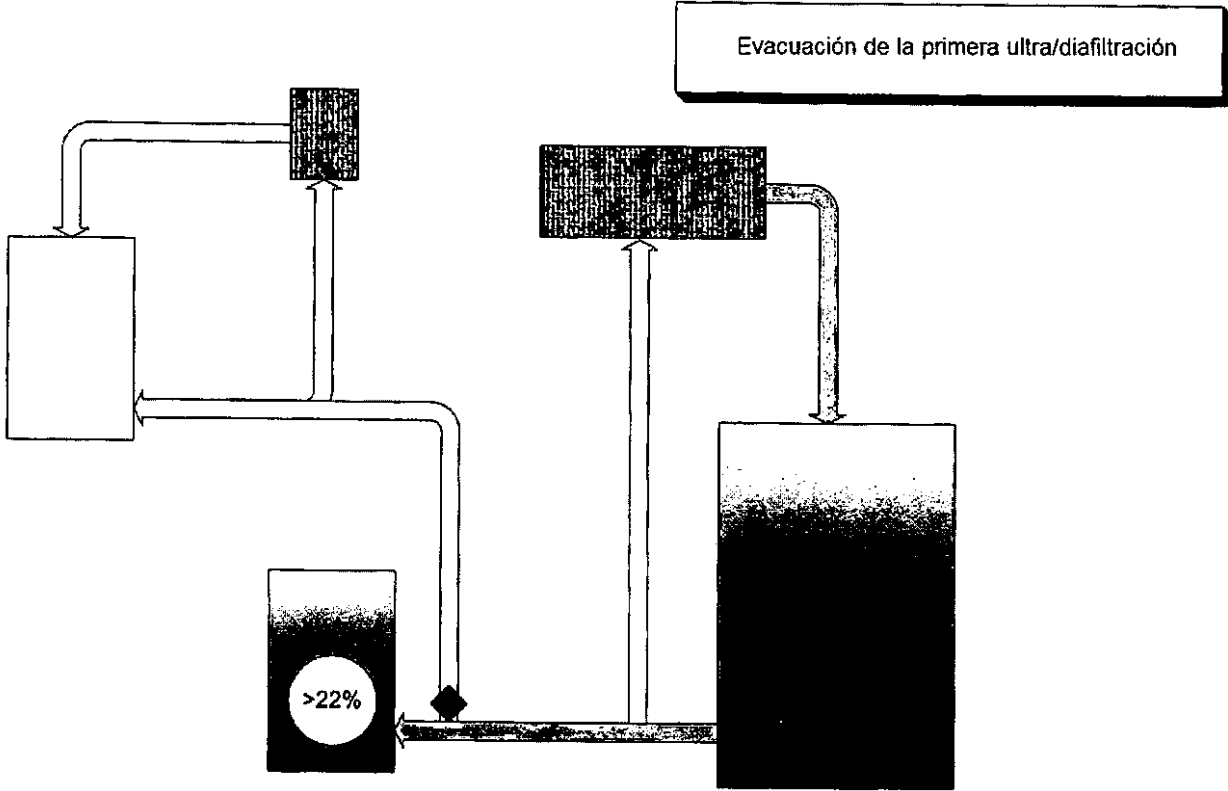


FIG. 1B

Tercer paso: Lavado posterior del primer dispositivo de ultra/diafiltración, incluyendo la recirculación del amortiguador de lavado posterior en el sistema 1 y la transferencia al sistema 2.

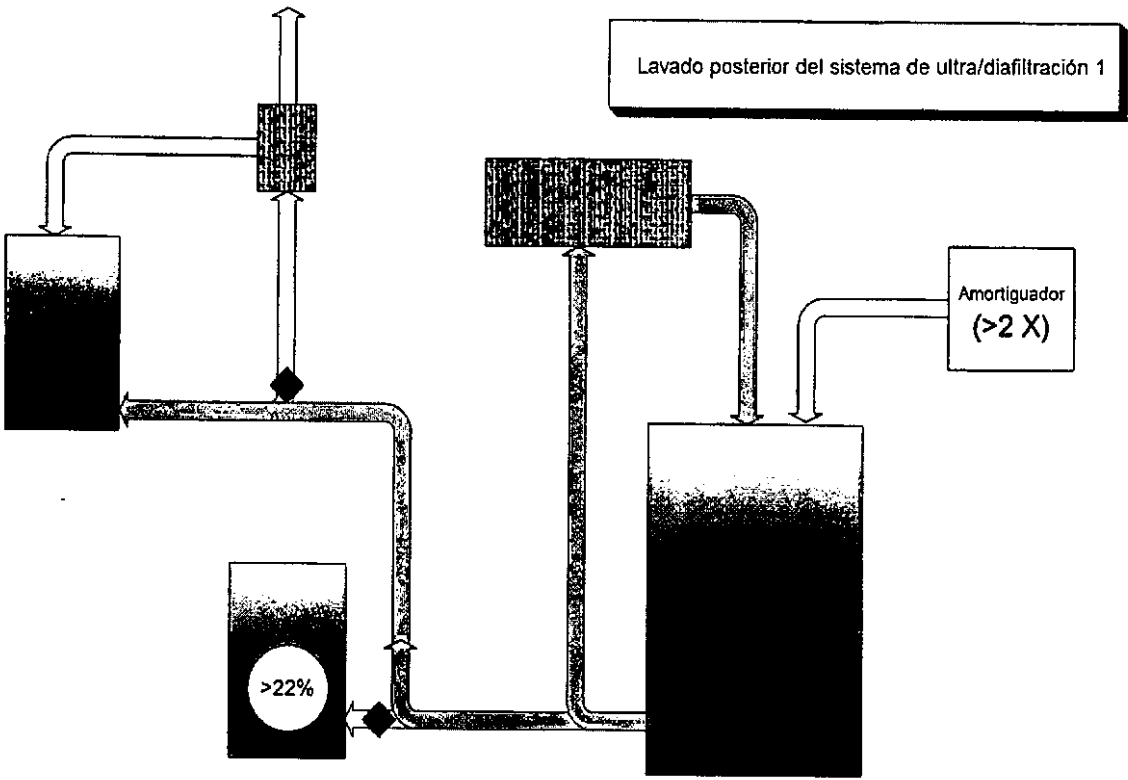


FIG. 1C

Cuarto paso: Concentración del lavado posterior con el segundo dispositivo de ultrafiltración más pequeño, equipado con las mismas membranas que el sistema de ultrafiltración grande.

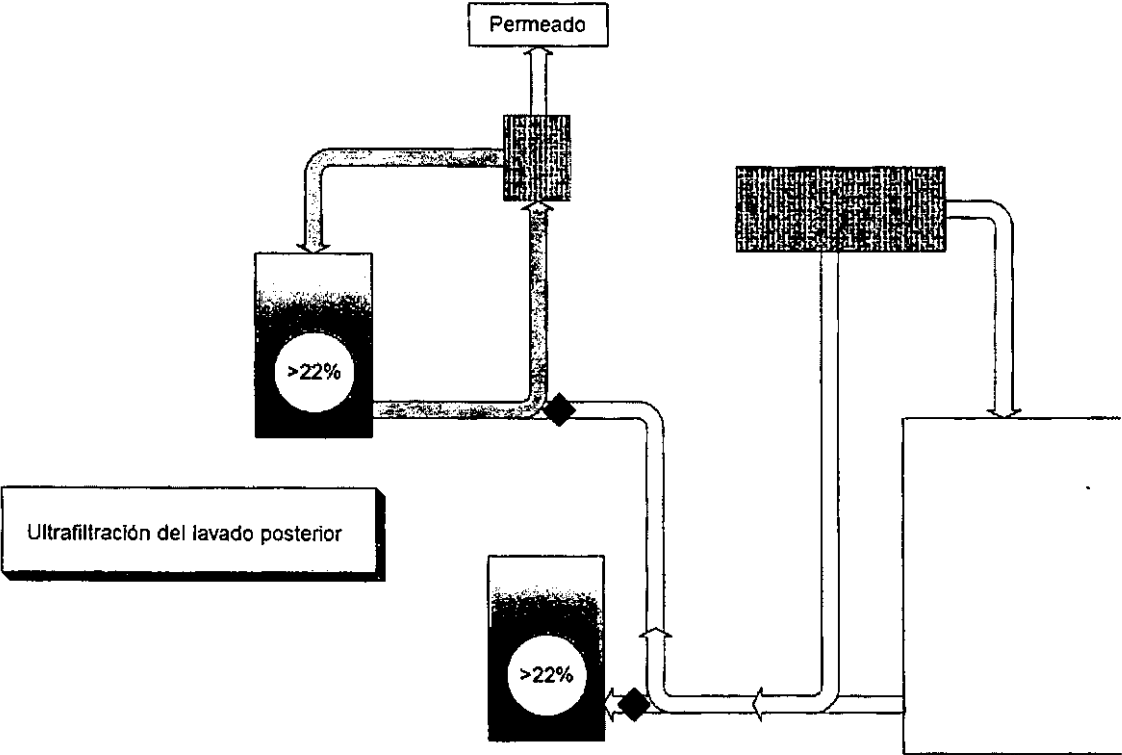
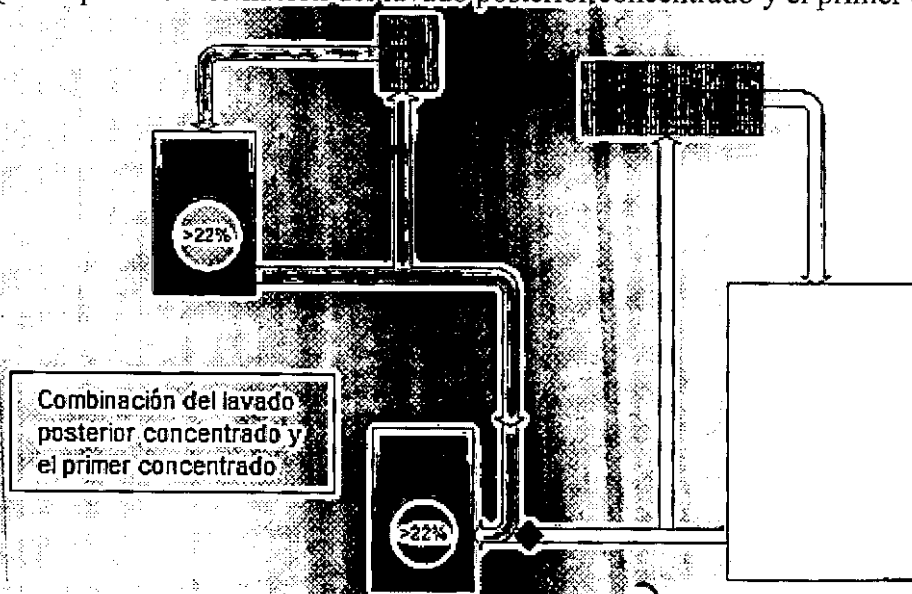


FIG. 1D

Quinto paso: Combinación del lavado posterior concentrado y el primer concentrado.



Sexto Paso: Lavado posterior del primer sistema de ultrafiltración más pequeño y uso de este lavado posterior para ajustar la concentración final de proteínas en la solución en bruto en $20,4 \pm 0,4\%$ p/v (no ilustrado).

La filtración estéril y el envasado se realizan de manera similar al proceso GAMMAGARD® LIQUID.

FIG. 1E

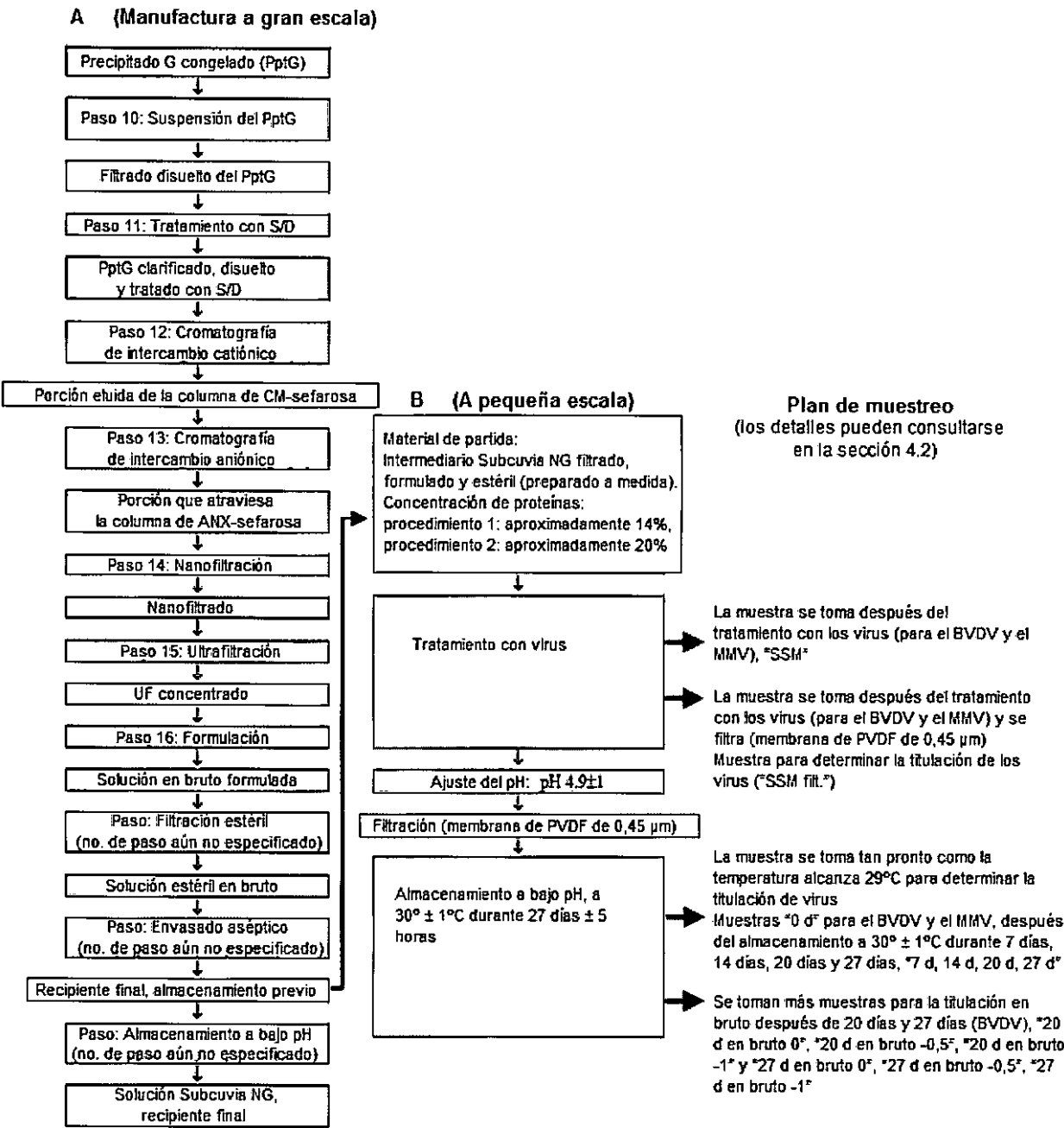


FIG. 2

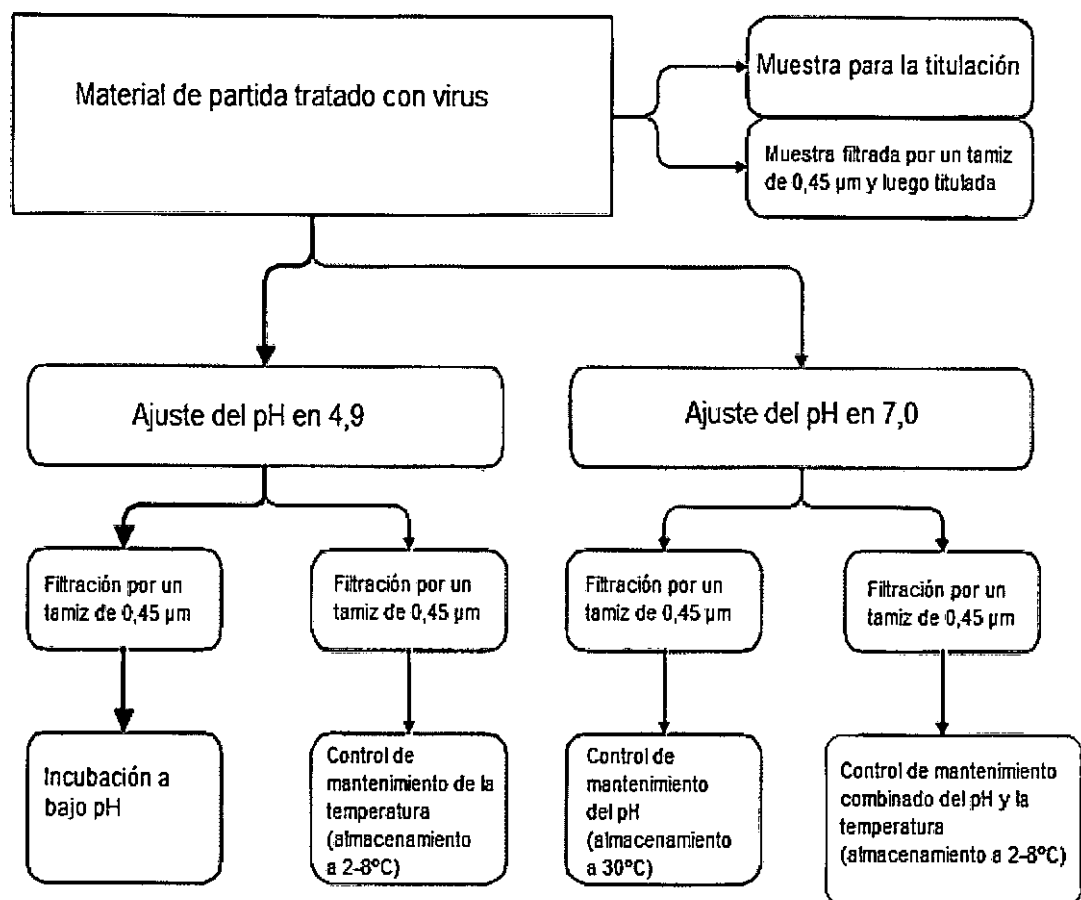


FIG. 3

139
190

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2010/036430

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/073252 A1 (SUOMEN PUNAINEN RISTI VERIPALV [FI]; PARKKINEN JAAKKO [FI]) 11 August 2005 (2005-08-11) page 7, line 24 - page 8, line 8 page 12, paragraph 4 page 14, line 27 - line 29 -----	1-7, 17-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 January 2011

Date of mailing of the international search report

26/01/2011

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schwachtgen, J

140
191

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/036430

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-7, 17-19

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/SA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-7, 17-19

An aqueous composition comprising more than about 180 grams of protein per liter of the composition, wherein at least 95% of the protein is IgG.

2. claims: 8-13

In a method for preparing a composition of concentrated IgG from plasma, the improvement comprising the steps of:
 (1) concentrating protein in a plasma preparation to about 5% (w/v) by ultrafiltration;
 (2) further concentrating the protein in the preparation to about 20% (w/v) by diafiltration,
 wherein at least 95% of the protein is IgG.

3. claims: 14-16

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

14. A method for preparing a composition of concentrated IgG from plasma, comprising the steps of:
- (1) separating liquid and precipitate from plasma by centrifugation;
 - (2) mixing pre-cooled ethanol with the liquid from (1) to form a mixture, which has an ethanol concentration of about 8% (v/v);
 - (3) separating liquid and precipitate from the mixture of (2) by centrifugation;
 - (4) adjusting pH and ethanol concentration of the liquid from (3) to about 7.0 and 20-25% (v/v), respectively, thereby forming a mixture;
 - (5) separating liquid and precipitate from the mixture of (4) by centrifugation;
 - (6) resuspending the precipitate of (5) with a buffer at a ratio of about 1 to 15 in weight to form a suspension;
 - (7) mixing silicon dioxide (SiO₂) with the suspension from (6) and obtaining a filtrate by filtration;
 - (8) mixing a detergent and cold alcohol with the filtrate of (7) and obtaining a precipitate by centrifugation;
 - (9) dissolving the precipitate in an aqueous solution comprising a solvent or detergent and maintaining the solution for at least 60 minutes;
 - (10) passing the solution after (9) through a cation exchange chromatography column and eluting proteins absorbed on the column in an eluate;
 - (11) passing the eluate from (10) through an anion exchange chromatography column to generate an effluent;
 - (12) passing the effluent through a nanofilter to generate a nanofiltrate;
 - (13) passing the nanofiltrate through an ultrafiltration membrane to generate an ultrafiltrate;
 - (14) diafiltrating the ultrafiltrate against a diafiltration buffer to generate a solution having a protein concentration of about 20% (w/v); and
 - (15) sterilizing the solution from (14) by filtering the solution through a filter of 0.2 [micro]m or less, thereby obtaining a composition of concentrated IgG.
-

143
144

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2010/036430

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005073252 A1	11-08-2005	BR PI0507298 A	03-07-2007
		EP 1709077 A1	11-10-2006
		JP 2008500959 T	17-01-2008
		KR 20070009995 A	19-01-2007

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 61/181,606 27/05/2009 US		(51) Int Cl: C07K 016/006 (71) Solicitante(s) BAXTER INTERNATIONAL INC. BAXTER HEALTHCARE S.A. (72) Inventor(es) WOLFGANG TESCHNER Y OTROS (74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27/12/2011 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 27/05/2009 No. de solicitud PCT/US2010/036430		(87) Publicación internacional Fecha: 02/12/2010 N° publicación: WO 2010/138736 A3	
(54) Título: MÉTODO PARA PRODUCIR UNA PREPARACIÓN ALTAMENTE CONCENTRADA DE INMUNOGLOBULINA DE USO SUBCUTÁNEO			

Resumen:

Método novedoso y mejorado para preparar una composición altamente concentrada de inmunoglobulina a partir de plasma combinado para una inyección subcutánea. composición de uso subcutáneo que comprende 20% o más de inmunoglobulina.

AS 146

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 117785

Bogotá D.C., Diciembre 05 de 2011 - 07:29:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411754512	02/12/2011	57.421.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. LINDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-179041- -00000-0000

Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

COLO: 13936-841-035-9

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 5 de 2011 - 07:29:46

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 117786

Bogotá D.C., Diciembre 05 de 2011 - 07:29:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411754512	02/12/2011	57.421.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1.000.00	1.000.00
				\$1.000.00

SON: **MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-179041- -00000-0000

Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 148

Act. 411 PRESENTACION Follos: 150

COLO: 13936-841-035-9.

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 5 de 2011 - 07:29:46

148

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

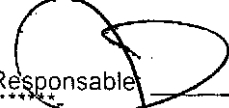
Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 117638
		Bogotá D.C., Diciembre 05 de 2011 - 07:29:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411754512	02/12/2011	57.421.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
			\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-179041- -00000-0000
Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130

COLO: 13936-841-035-9,

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 117656

Bogotá D.C., Diciembre 05 de 2011 - 07:29:31

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS

NI 860.041.367

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	411754512	02/12/2011	57.421.000.00

*** Conceptos Pagados ***

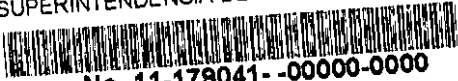
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-08	PRORROGA DE TERMINOS	1609 S.DISTINTIVOS PRORROGA DE TERMINOS O PLAZO ADICIONAL	87.000.00
				87.000.00
				<u>\$87.000.00</u>

SON: **OCHENTA Y SIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-179041- -00000-0000

Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148
Act. 411 PRESENTACION ~~Folios: 150~~

COLO: 13936-841-0359

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 5 de 2011 - 07:29:42

749
150

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 11 - 122646
		Bogotá D.C., Diciembre 16 de 2011 - 18:38:37

RECIBIDO DE : CAVELIER ABOGADOS NI 860.041.367

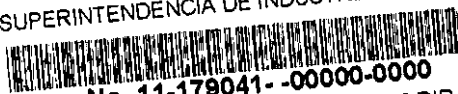
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	427470886	16/12/2011	36.506.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO Vr. CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	1613 TASA ANUAL AÑOS 13 a 16 PARA MANTENIMIENTO DE PATENTE D	698.000.00 698.000.00
			\$698.000.00

SON: **SEISCIENTOS NOVENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 11-179041-00000-0000
Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148
Act. 411 PRESENTACION ~~Folios: 150~~

COLO: 13936-841-035-9,



No. 11-179041- -00000-0000

Fecha: 2011-12-27 11:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 148

LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

Act. 411 PRESENTACION Folios: 150

~~PATENTE DE INVENCION~~ ☐ ~~MODELO DE UTILIDAD~~ ☐

Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐