SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-060700- -00000-0000

Fecha: 2014-03-20 16:29:16 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 204

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCIÓN

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** MÉTODO PARA REDUCIR EL POTENCIAL TROMBOEMBÓLICO DE UNA COMPOSICIÓN DE INMUNOGLOBULINA DERIVADA DE PLASMA

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____

71. **SOLICITANTE** BAXTER INTERNATIONAL INC. Y BAXTER HEALTHCARE S.A.

DOMICILIO Deerfield, Illinois, Estados Unidos de América y Glattpark (opfikon), Suiza

74. **APODERADO** LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C 35.456.344 de Usaquén

22. **BOGOTÁ, D.C.,** _____

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO adicación
No. 14-060700- -00000-0000
Fecha 2014-03-20 16:29:16 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 204

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención	☐ Patente de Modelo de Utilidad
		☒ Capitulo I	☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2012/052567	Fecha	2012/08/27
Publicación Internacional No.	WO 2013/033042 A1	Fecha	2013/03/07

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN

MÉTODO PARA REDUCIR EL POTENCIAL TROMBOEMBÓLICO DE UNA COMPOSICIÓN DE INMUNOGLOBULINA DERIVADA DE PLASMA

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

C07K 016/006

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1. BAXTER INTERNATIONAL INC.			

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, Estados Unidos de América	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	Deerfield	CORREO ELECTRÓNICO	clientes@cavelier.com
DEPARTAMENTO/ESTADO	Illinois	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Estado de Delaware, Estados Unidos de América
PAÍS DE RESIDENCIA	Estados Unidos de América		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1. TESCHNER	Wolfgang	Alemán
2. BUTTERWECK	Harald, Arno	Austriaco
3. KOELBL	Bernhard	Austriaco
4. HOFBAUER	Lucia	Austriaca
5. SCHWARZ	Hans-Peter	Austriaco

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1. Austria		Vienna	Gestettengasse 19/14, A-1030 Vienna, Austria.
2. Austria		Vienna	Naufahrtweg 5, A-1220 Vienna, Austria.
3. Austria		Achau	Hintausstrasse 20/5, A-2481 Achau, Austria.
4. Austria		Eggenburg	Grafenberg 9, A-3730 Eggenburg, Austria.
5. Austria		Vienna	Weimarer Strasse 76, A-1180 Vienna, Austria.

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S) INVENTOR(ES))

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
De Páez	Luz Clemencia	C.C . 35.456.344 T.P . 23.555

DIRECCIÓN	Carrera 4ª No. 72-35	No. TELÉFONO	3 47 36 11
CIUDAD	BOGOTA	CORREO ELECTRÓNICO	cavelier@cavelier.com
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
U.S.A	US	61/527,974	2011/08/26

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leido y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	**COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO**	**N°** 14-0030277	**Fecha** 2014/03/19

16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

Nombre del Firmante **LUZ CLEMENCIA DE PAEZ**	Firma
C.C 35.456.344 de Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

MMS\MMS\NCA\ID-AF262340\WPC13936

17	ANEXOS

Documentación Técnica

Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción N° de folios: 155
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 62
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 4
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☒ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes de BAXTER INTERNATIONAL INC. y BAXTER HEALTHCARE S.A.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.

☒ Hoja de información complementaria (1 Solicitante)

☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $515.000.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

FIGURA CARACTERISTICA

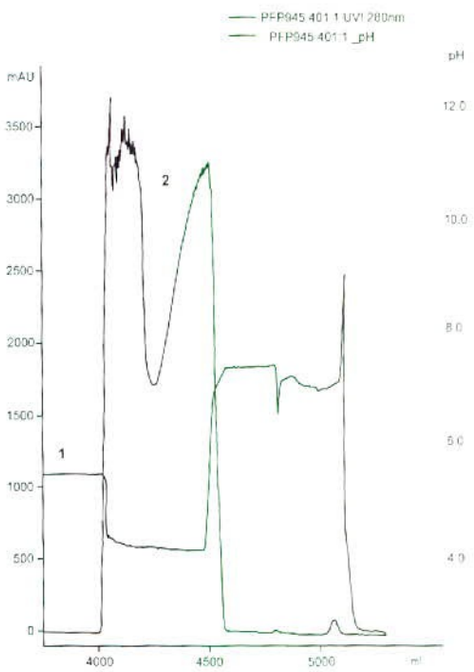


FIG. 2

5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	NUMERO DE RADICACIÓN
☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		FECHA DE PRESENTACIÓN

4	(71) SOLICITANTE (S)			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
2. BAXTER HEALTHCARE S.A.			

5	DATOS DEL SOLICITANTE		
PAÍS DE RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
2. Suiza		Glattpark (opfikon)	Thurgaustrasse 130 CH-8152 Glattpark (opfikon), Suiza
TELÉFONO	FAX	E-MAIL	NACIONALIDAD

6	(72) INVENTOR (ES)	
APELLIDOS	NOMBRE	NACIONALIDAD

7	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN	CIUDAD	DEPARTAMENTO/ESTADO	PAÍS RESIDENCIA

9	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD		
PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	NÚMERO	FECHA (AAAA/MM/DD)

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
7 March 2013 (07.03.2013)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2013/033042 A1

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

(21) International Application Number:
PCT/US2012/052567

(22) International Filing Date:
27 August 2012 (27.08.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/527,974 26 August 2011 (26.08.2011) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **BAXTER INTERNATIONAL INC.** [US/US]; One Baxter Parkway, Deerfield, IL 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/DE]; Gestettengasse 19/14, A-1030 Vienna (AT). **BUTTERWECK, Harald, Arno** [AT/AT]; Naufahrtweg 5, A-1220 Vienna (AT). **KOELBL, Bernhard** [AT/AT]; Hintausstrasse 20/5, A-2481 Achau (AT). **HOFBAUER, Lucia** [AT/AT]; Grafenberg 9, A-3730 Eggenburg (AT). **SCHWARZ, Hans-Peter** [AT/AT]; Weimarer Strasse 76, A-1180 Vienna (AT).

(74) Agent: **PARENT, Annette, S.**; Morgan, Lewis & Bockius LLP, One Market, Spear Street Tower, San Francisco, CA 94105 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, QA, RO, RS, RU, RW, 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, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, RS, SE, SI, SK, SM,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR REDUCING THE THROMBOEMBOLIC POTENTIAL OF A PLASMA-DERIVED IMMUNOGLOBULIN COMPOSITION

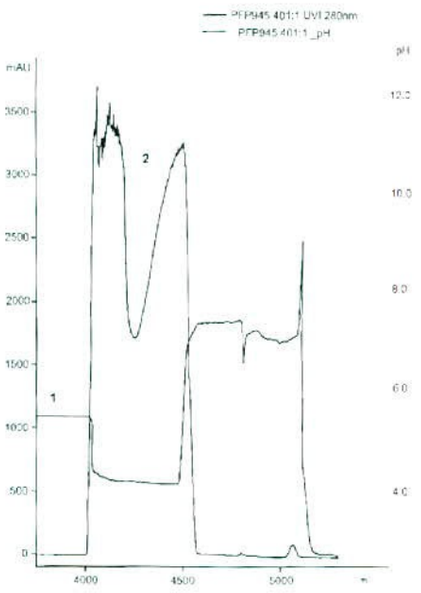


FIG. 2

(57) Abstract: The present invention provides methods for reducing the amidolytic and anti-complement activity (ACA) content of an immunoglobulin composition through the use of cation exchange chromatography. In a specific embodiment, the invention provides methods for reducing the Factor XI and/or Factor XIa and/or ACA content of an immunoglobulin composition by collecting the leading portion of a cation exchange eluate. The present invention also provides immunoglobulin composition having reduced levels of amidolytic activity, Factor XI, and/or Factor XIa, and/or ACA content.

WO 2013/033042 A1

MÉTODO PARA REDUCIR EL POTENCIAL TROMBOEMBÓLICO DE UNA COMPOSICIÓN DE INMUNOGLOBULINA DERIVADA DE PLASMA

REFERENCIA A SOLICITUD RELACIONADA

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisoria de los EEUU Nº 61/527974, presentada el 26 de agosto de 2011, cuyo contenido se incorpora expresamente en la presente a modo de referencia, en su totalidad y para todo propósito.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los productos sanguíneos derivados de plasma no solo se usan para tratar una variedad de trastornos sanguíneos, sino también para enfermedades de un origen distinto. Por ejemplo, los productos de inmunoglobulina (IgG) del plasma humano se usaron por primera vez en 1952 para tratar deficiencias del sistema inmune. Desde entonces, se han utilizado ampliamente las preparaciones de IgG en al menos tres grandes categorías de condiciones médicas: (1) deficiencias inmunológicas tales como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia (deficiencias inmunológicas primarias) y condiciones de compromiso de inmunidad adquiridas (deficiencias inmunológicas secundarias), caracterización de niveles bajos de anticuerpos; (2) enfermedades inflamatorias y autoinmunes; y (3) infecciones agudas.

[0003] Se deben tener en cuenta diversas precauciones de seguridad en la elaboración y formulación de terapias biológicas derivadas de plasma. Estas incluyen métodos para eliminar y/o inactivar patógenos sanguíneos (por ejemplo, patógenos virales y bacterianos), actividad anticomplemento y otros contaminantes indeseados que surgen del uso de plasma donado. Los

estudios han sugerido que la administración de niveles altos de actividad amidolítica puede dar como resultado eventos tromboembólicos indeseados (Wolberg AS *et al.*, *Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations*, Am J Hematol 2000; 65: 30-34; y Alving BM *et al.*, *Contact-activated factors contaminants of immunoglobulin preparations with coagulant and vasoactive properties*, *J Lab Clin Med*, 1980; 96: 334-346; cuyas divulgaciones se incorporan por completo en la presente a modo de referencia para todo fin).

[0004] Un indicador de esta preocupación fue el reciente retiro voluntario del mercado de Octagam® (Octapharma) en los EE.UU. y la suspensión de la autorización de comercialización para Octagam® y Octagam 10% por la Comisión Europea luego de un incremento de informes de eventos tromboembólicos. Se ha sugerido que dicho incremento de eventos tromboembólicos fuera causado por niveles elevados de actividad amidolítica en los preparados biológicos, causados por impurezas de serina proteasas y zimógenos de serina proteasas, tales como Factor XI, Factor XIa, Factor XII y Factor XIIa (Nota del FDA: Retiro Voluntario del Mercado – 23 de septiembre, 2010, Octagam [Inmunoglobulina Intravenosa (Humana)] Preparación Líquida 5%: Octagam 50 mg/ml, solución para perfusión - Octapharma France - *Mise en quarantaine de tous les lots*, publicado en línea el 9 de septiembre, 2010, por AFSSAPS; y preguntas y respuestas acerca de la suspensión de las autorizaciones de comercialización para Octagam (inmunoglobulina normal humana 5% y 10%), publicadas en línea el 23 de septiembre, 2010, por la Agencia Europea de Medicamentos).

[0005] El EDQM (*European Directorate on the Quality of Medicines &*

Health Care) publicó una revisión de la monografía sobre inmunoglobulinas humanas normales en la administración intravenosa (0918) para una implementación rápida el 1 de enero, 2012, para solucionar la potencial actividad pro-coagulante en productos de inmunoglobulina. En la revisión se establece que "el método de preparación también incluye uno o más pasos que eliminarían los agentes generadores de trombosis. Se destaca la identificación de los factores de coagulación activados y sus zimógenos y los pasos de proceso que pueden causar su activación. También se consideran otros agentes procoagulantes que podrían ser introducidos por el proceso de elaboración".

[0006] El 18 de marzo, 2011, Swissmedic informó que se habían observado eventos adversos tromboembólicos asociados con numerosos lotes del producto Vivaglobin según la FDA. El producto Vivaglobin (solución de inmunoglobulinas humanas normales 160 mg/ml para inyección subcutánea), elaborado por CSL, se autorizó como una terapia de reemplazo para adultos y niños con síndromes de inmunodeficiencia primaria, mieloma o leucemia linfática crónica. Hasta el presente se desconocía el riesgo de eventos adversos tromboembólicos para esta ruta de administración. Las investigaciones revelaron actividad pro-coagulante por lo menos en algunos lotes. Como consecuencia de ello, se retiró el producto Vivaglobin del mercado y se reemplazó por el producto nuevo Hizentra (solución 20% de inmunoglobulinas humanas normales para inyección subcutánea). Debido a los eventos adversos informados para Vivaglobin, ahora es un requisito que los productos de inmunoglobulina para administración subcutánea tengan niveles bajos de actividad procoagulante, de manera similar a los requisitos para los

productos de inmunoglobulina de administración intravenosa.

[0007] Las serina proteasas dedicadas, conocidas genéricamente como factores de coagulación, son componentes integrales de ambas vías de activación por contacto y de factores tisulares de la cascada de la coagulación. Luego del estímulo de las vías de la coagulación, los zimógenos de serina proteasas, que son precursores de enzimas inactivos, se convierten en proteasas activadas que catalizan la activación del siguiente zimógeno de proteasa, dando como resultado la activación de la cascada. Esta cascada de la coagulación culmina con la activación de la trombina (Factor IIa) y del Factor XIIIa, cuya función consiste en convertir fibrinógeno (Factor I) en fibrina (Factor Ia) y entrecruzar la fibrina para formar un coágulo de fibrina, respectivamente.

[0008] La vía de activación por contacto, también conocida como vía de coagulación intrínseca, comienza con la activación de la calicreína y del Factor XIIa (FXIIa) a partir de precalicreína y del Factor XII, respectivamente. La serina proteasa activada FXIIa corta al Factor XI (FXI), convirtiendo al zimógeno en el Factor XIa (FXIa), una serina proteasa activa que participa en la subsiguiente activación del Factor Xa (FXa).

[0009] Dada la preocupación creciente por la presencia de serina proteasas y zimógenos de serina proteasa en las composiciones de proteínas derivadas de plasma, persiste la necesidad en el arte de métodos para reducir los niveles de estos contaminantes, y en particular de FXI y FXIa, en las preparaciones de inmunoglobulinas.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

[0010] La presente invención provee, entre otros aspectos, métodos para reducir el contenido amidolítico (por ejemplo, de FXI y/o FXIa) en

composiciones de inmunoglobulina IgG y en composiciones de inmunoglobulina IgG con niveles menores de actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) que las composiciones comparables disponibles en el mercado.

[0011] En un primer aspecto, la presente invención provee un método para reducir el contenido del Factor XI (FXI) y/o del Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) proveer una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa; (b) poner la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprenden un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa una resina de intercambio catiónico; (c) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción de cabeza y porción de estabilización; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato no comprende más que un 80% del eluato.

[0012] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En otra forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución

comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En otra forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm.

[0013] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el método comprende además un paso de lavado de la resina de intercambio catiónico que contiene las inmunoglobulinas y FXI y/o FXIa unidos a la misma con una solución amortiguadora de lavado que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad menor que 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en el paso (c).

[0014] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica de los métodos provistos previamente, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.

[0015] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5. En otra forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende un pH de 8,0 ± 0,2.

[0016] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM. En otra forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 240 y 260 mM.

[0017] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 100

mM y 300 mM. En otra forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 175 mM y 225 mM.

[0018] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 70% del eluato.

[0019] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar un eluato con un pH no mayor que 7,0 separadamente del eluato con un pH mayor que 7,0.

[0020] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar un eluato con un pH no mayor que 6,5 separadamente del eluato con un pH mayor que 6,5.

[0021] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar un eluato con un pH no mayor que 6,0 separadamente del eluato con un pH mayor que 6,0.

[0022] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar un eluato con un pH no mayor que 5,5 separadamente del eluato con un pH

mayor que 5,5.

[0023] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar un eluato con un pH no mayor que 5,0 separadamente del eluato con un pH mayor que 5,0.

[0024] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende monitorear el pH del eluato.

[0025] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato comprende los subpasos de: (i) monitorear la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280}); (ii) comenzar la recolección cuando la DO280 del eluato se eleva por encima de un primer umbral de DO_{280} de por lo menos 50 mAU; y (iii) terminar la recolección cuando la DO280 del eluato cae por debajo de un segundo umbral de DO_{280} no menor que 500 mAU. En una forma de realización específica, el segundo umbral de DO_{280} no es menor que 1 AU. En otra forma de realización específica, el segundo umbral de DO_{280} no es menor que 2 AU.

[0026] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0. En otra forma de realización de los métodos provistos previamente, la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de 5,5 ± 0,2.

[0027] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, menos que un 50% del FXI y/o del FXIa unidos a la resina de

intercambio catiónico en el paso (b) está presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d).

[0028] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, menos que un 25% del FXI y/o del FXIa unidos a la resina de intercambio catiónico en el paso (b) está presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d).

[0029] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, menos que un 10% del FXI y/o del FXIa unidos a la resina de intercambio catiónico en el paso (b) está presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d).

[0030] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la cantidad de FXI y/o FXIa se determina mediante un ensayo de actividad amidolítica usando un sustrato específico de FXIa.

[0031] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la fracción de plasma en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.

[0032] En una forma de realización de los métodos provistos previamente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la Fracción II en suspensión.

[0033] En un aspecto, la presente divulgación provee un método para reducir la actividad anti-complemento (ACA) en una composición de

inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) proveer una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA; (b) poner la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (c) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción de cabeza y una porción de estabilización; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato no comprende más que un 80% del eluato.

[0034] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm.

[0035] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el método comprende además un paso de lavado de la resina de

intercambio catiónico que contiene las inmunoglobulinas y ACA unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad menor que 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en el paso (c).

[0036] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica de los métodos descritos previamente, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.

[0037] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende un pH de 8,0 ± 0,2.

[0038] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 240 y 260 mM.

[0039] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 100 mM y 300 mM. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 175 mM y 225 mM.

[0040] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 70%

del eluato.

[0041] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 7,0 separadamente de eluato con un pH de más de 7,0.

[0042] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 6,5 separadamente de eluato con un pH de más de 6,5.

[0043] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 6,0 separadamente de eluato con un pH de más de 6,0.

[0044] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 5,5 separadamente de eluato con un pH de más de 5,5.

[0045] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 5,0 separadamente de eluato con un pH de

más de 5,0.

[0046] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende monitorear el pH del eluato.

[0047] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato comprende los subpasos de: (i) monitorear la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280}); (ii) comenzar la recolección cuando la DO280 del eluato se eleva por encima de un primer umbral de DO_{280} de por lo menos 50 mAU; y (iii) terminar la recolección cuando la DO280 del eluato cae por debajo de un segundo umbral de DO_{280} no menor que 500 mAU.

[0048] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, el segundo umbral de DO280 no es menor que 1 AU. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, el segundo umbral de DO280 no es menor que 2 AU.

[0049] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0. En otra forma de realización de los métodos descritos previamente, la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de 5,5 ± 0,2.

[0050] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas

derivada de plasma provista en el paso (a).

[0051] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es por lo menos un 25% menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a).

[0052] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es por lo menos un 50% menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a).

[0053] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción de estabilización del eluato recolectado en el paso (d).

[0054] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que un 50% de la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción de estabilización del eluato recolectado en el paso (d).

[0055] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que un 25% de la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción de estabilización del eluato recolectado en el paso (d).

[0056] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la fracción de plasma en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.

[0057] En una forma de realización de los métodos descritos previamente, la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la Fracción II en suspensión.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0058] En la Figura 1 se muestra un cromatograma del paso de cromatografía de flujo rápido (ff) CM Sepharose descrito en el Ejemplo 1. La línea número 1 muestra la absorbancia UV; la línea número 2 muestra el pH y la línea número 3 muestra la conductividad del efluente a la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nanometros indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna ff CM Sepharose. El pH a la salida de la columna comienza a aumentar justo antes del comienzo de la re-elevación de la absorbancia de UV durante la elución.

En este punto, se separaron las dos fracciones de eluato como se muestra en el cromatograma como F4 y F5 (fracción 4 y fracción 5), denominadas E1 y E2 de aquí en adelante.

[0059] En la Figura 2 se muestra una cromatografía de la corrida ff CM Sepharose que se describe en el Ejemplo 2. Ilustra el transcurso del pH y la DO280 durante la elución de la fracción de IgG de la ff CM Sepharose (material de partida: vía II de la pasta de la fracción II de Cohn; P24701IV; pasos de adsorción: FIX; FVII; AT III).

[0060] En la Figura 3 se muestra un cromatograma del paso de cromatografía de flujo rápido (ff) CM Sepharose descrito en el Ejemplo 11. La línea número 1 muestra la absorbancia UV; la línea número 3 muestra el pH y la línea número 2 muestra la conductividad del efluente a la salida de la columna.

[0061] En la Figura 4 se muestra un cromatograma del paso de cromatografía de flujo rápido (ff) CM Sepharose descrito en el Ejemplo 12. La línea número 1 muestra la absorbancia UV; la línea número 3 muestra el pH y la línea número 2 muestra la conductividad del efluente a la salida de la columna.

[0062] En la Figura 5 se muestra un cromatograma del paso de cromatografía de flujo rápido (ff) CM Sepharose descrito en el Ejemplo 13. La línea número 1 muestra la absorbancia UV; la línea número 3 muestra el pH y la línea número 2 muestra la conductividad del efluente a la salida de la columna.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

I. Introducción

[0063] Dado el amplio uso de las composiciones terapéuticas de inmunoglobulinas intravenosas derivadas de plasma, resulta de vital importancia asegurar la seguridad de estas composiciones. La preocupación acerca del contenido amidolítico de las composiciones de inmunoglobulinas junto con la aparición de eventos tromboembólicos en pacientes a quienes se les administran inmunoglobulinas derivadas de plasma ha destacado la necesidad de métodos para reducir eficazmente serina proteasas (por ejemplo, FXIa y FXIIa) y zimógenos de serina proteasa (por ejemplo, FXI y FXII) durante la elaboración de las inmunoglobulinas.

[0064] La presente invención se basa por lo menos en parte en el sorprendente hallazgo que se pueden eliminar cantidades significativas de actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) y/o de actividad anti-complemento (ACA) de una composición de inmunoglobulinas por recolección de tan solo la porción de cabeza de un eluato de intercambio catiónico. Como tales, en la presente se proveen métodos para reducir la concentración de serina proteasas y de zimógenos de serina proteasas durante la elaboración de composiciones de proteínas derivadas de plasma.

[0065] En un aspecto, la invención se basa en el descubrimiento que durante una elución en un solo paso de una resina de intercambio catiónico, las inmunoglobulinas IgG son liberadas de la resina antes de la elución de una fracción significativa de actividad amidolítica (por ejemplo, aportada por al menos FXI y/o FXIa) y/o de ACA. Específicamente, se encontró que cuando se pone una resina de intercambio catiónico que contiene inmunoglobulinas IgG y proteínas que contribuyen con la actividad amidolítica unidas a la misma en contacto con una solución amortiguadora de elución que tiene un pH mayor

que al menos 7,0, el eluato inicial recuperado de la columna tiene un pH bajo (por ejemplo, un pH menor que 5,0). Después de un período de tiempo, el pH del eluato recuperado de la columna cambia a por encima de 7,0. Sorprendentemente, se encontró que el eluato inicial con un pH bajo contiene niveles bajos de actividad amidolítica, contenido de FXI y/o FXIa y/o contenido de ACA, en tanto el eluato recuperado después del cambio de pH contiene un nivel significativamente mayor de actividad amidolítica, de contenido de FXI y/o FXIa y/o de contenido de ACA.

[0066] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se basa en un método para separar una fracción significativa de actividad amidolítica (por ejemplo, Factor XI y/o Factor XIa) y/o ACA de una composición de inmunoglobulinas IgG por unión de las inmunoglobulinas IgG, la actividad amidolítica y/o ACA a una resina de intercambio catiónico, elución de las inmunoglobulinas IgG, la actividad amidolítica y/o ACA en una elución de un solo paso y recolección de la porción de cabeza del eluato, caracterizado por un alto rendimiento de IgG, una baja actividad amidolítica y/o un bajo contenido de ACA, separadamente de la porción de estabilización del eluato, caracterizado por un bajo rendimiento de IgG, una gran actividad amidolítica y/o un gran contenido de ACA.

[0067] Entre otras ventajas, los métodos de la invención proveen (1) métodos simples para eliminar la actividad amidolítica de composiciones de inmunoglobulina IgG mediante cromatografía de intercambio catiónico con una elución de un solo paso; (2) métodos simples para identificar rápidamente fracciones de un eluato de intercambio catiónico de inmunoglobulina IgG con actividades amidolíticas elevadas (es decir, contenido alto de FXI y/o FXIa),

basados en el monitoreo del pH del eluato; (3) métodos para eliminar la actividad amidolítica de una composición de inmunoglobulina IgG que no es afectada por la concentración de proteína cargadas en una resina de intercambio catiónico, permitiendo un simple aumento de escala para los procesos de elaboración a gran escala; (4) métodos que permiten una determinación rápida de las fracciones eluidas de intercambio catiónico inmunoglobulina IgG a usar en procesamientos posteriores, basado en el monitoreo del pH; (5) métodos que permiten reducir significativa la actividad amidolítica (por ejemplo, el contenido de FXI y/o FXIa) con una pérdida mínima de rendimiento de inmunoglobulina IgG; (6) métodos para elaborar composiciones de inmunoglobulina IgG que tienen una menor concentración de agregados de IgG, menor actividad PKA, menor actividad amidolítica medida con sustratos cromogénicos (incluyendo, pero en un sentido no limitativo, el sustrato PL-1), una mayor concentración de monómeros de IgG y una distribución de subclases de IgG más deseable; (7) métodos que permitan determinar rápidamente las fracciones de elución por intercambio catiónico de inmunoglobulina IgG para usar en un procesamiento posterior, basado en el volumen de elución del paso cromatográfico; (8) métodos que permiten determinar rápidamente las fracciones elución por intercambio catiónico de de inmunoglobulina IgG para usar en un procesamiento posterior, basado en la absorbancia de proteínas de la fracción particular; (9) la capacidad para utilizar las características ventajosas de la invención en procesos de elaboración a gran escala; (10) enriquecimiento en la actividad amidolítica para su identificación y cuantificación; (11) métodos simples para eliminar la actividad anti-complemento (ACA) de composiciones de inmunoglobulina IgG por

cromatografía de intercambio catiónico con elución de un solo paso; (12) métodos simples para identificar rápidamente fracciones de un eluato de intercambio catiónico de inmunoglobulina IgG con gran actividad anti-complemento (ACA), basado en el monitoreo del pH del eluato; (13) métodos para eliminar la actividad anti-complemento (ACA) de una composición de inmunoglobulina IgG que no es afectada por la concentración de proteínas cargadas sobre una resina de intercambio catiónico, permitiendo un aumento de escala simple para los procesos de elaboración a gran escala; (14) métodos que permiten una reducción significativa en la actividad anti-complemento (ACA) con pérdida mínima del rendimiento de inmunoglobulina IgG; (15) métodos para elaborar composiciones de inmunoglobulina IgG con una menor concentración de agregados de IgG, menor actividad anti-complemento (ACA), una mayor concentración de monómeros de IgG y una distribución de subclases de IgG más deseable; y (16) enriquecimiento en actividad anti-complemento (ACA) para su identificación y cuantificación.

II. Definiciones

[0068] Según se 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. Se pueden usar anticuerpos completos o fragmentos de los mismos. 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 títulos 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.

[0069] Según se usa en la presente, el término "actividad amidolítica" se refiere a la capacidad de un polipéptido para catalizar la hidrólisis de por lo menos un enlace peptídico en otro polipéptido. La actividad amidolítica perfil de una composición de inmunoglobulina IgG se puede determinar por evaluación con diversos sustratos cromogénicos, con diferentes especificidades por las proteasas presentes en el plasma humano, incluyendo en un sentido no limitativo PL-1 (amplio espectro), S-2288 (amplio espectro), S-2266 (FXIa, calicreínas glandulares), S-2222 (FXa, tripsina), S-2251 (Plasmina) y S-2302 (Calicreína, FXIa y FXIIa). Los métodos para determinar la actividad amidolítica de una composición son bien conocidos en el arte, por ejemplo, como se describe en M. Etscheid *et al.,* (*Identification of kallikrein and FXIa as impurities in therapeutic immunoglobulins: implications for the safety and control of intravenous blood products*, Vox Sang 2011; cuya divulgación se incorpora expresamente en su totalidad en la presente a modo de referencia para todo fin.)

[0070] Según se usa en la presente, el término "actividad anti-complemento," "actividad anticomplementaria" y "ACA" se usan indistintamente

y se refieren a la capacidad de una composición de proteínas, por ejemplo, una composición de inmunoglobulinas IgG, para consumir el potencial de complemento en un ensayo de complemento, por ejemplo, un método basado sustancialmente en el método descrito en "Public Health Monography" N° 74; *Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Microtest*, Washington, 1965, y E. A. Kabat y M. Mayer, *Experimental Inmunochemistry*; 2ª Ed. Thomas Springfield 1961, cuyos contenidos se incorporan expresamente en su totalidad en la presente a modo de referencia para todo fin. La unidad típica de actividad del complemento es la cantidad de complemento que producirá la lisis de $2{,}5x10^{8,}$ de un total de $5x10^{8}$, glóbulos rojos apropiadamente sensibilizados en la actividad del complemento descrita en la presente.

[0071] En una forma de realización, la ACA se mide usando una suspensión estandarizada de eritrocitos de ovino sensibilizados en anticuerpos, que se incuba con diferentes diluciones de suero de cobayo que sirve como fuente del complemento. El grado de hemólisis se mide por espectrofotometría. Por ejemplo, para determinar la actividad anticomplementaria del producto de inmunoglobulinas, se preparan soluciones de prueba que contienen diversas cantidades del producto de inmunoglobulinas y 2 unidades $C'H_{50}$ de suero de cobayo por ml. En una forma de realización específica, la actividad anticomplementaria se mide por incubación de una cantidad definida de un material de prueba (por ejemplo, 10 mg de inmunoglobulina IgG) con una cantidad definida de complemento de cobayo (por ejemplo, 20 $C'H_{50}$) y se titula el complemento remanente. La actividad anticomplementaria se expresa como el porcentaje de consumo del complemento con relación al control de

complemento, considerado como el 100%. En una forma de realización, la ACA se mide de acuerdo con las normas que se describen en *European Pharmacopoeia*: *Human normal immunoglobulin for intravenous administration. European Pharmacopoeia* 6.3, monografía 2.6.17, 4166-4168. Consejo Europeo, Strasbourg Cedex, Francia, cuyo contenido se incorpora expresamente por completo en la presente en la presente a modo de referencia para todo fin.

[0072] Los métodos para disminuir la actividad anticomplementaria de las composiciones destinadas a una administración intravenosa se describen en la literatura (Schultz, H. E. y Schwick, G., *Dtsch. med. Wochenschrift* 87 (1962), 1643; Barandun, S. et al., Vox Sang, 28 (1957), 157; Barandun, S. et al., Vox Sang, 7 (1962), 187; y Stephen, W., *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 7 (1969), 282, cuyos contenidos se incorporan expresamente por completo en la presente en la presente a modo de referencia para todo fin).

[0073] Según se usa en la presente, "plasma pobre en crioprecipitados" se refiere al sobrenadante formado después de una precipitación en frío (crioprecipitación) de plasma o plasmas agrupados a temperaturas cercanas al congelamiento, por ejemplo, a temperaturas inferiores a 10°C aproximadamente. En el contexto de la presente invención, el plasma se puede referir indistintamente al plasma recuperado (es decir, plasma que ha sido separado de la sangre completa *ex vivo*) o plasma de fuentes (es decir, plasma recolectado por plasmaféresis). La crioprecipitación comúnmente se lleva a cabo, por ejemplo, por descongelamiento de un plasma agrupado congelado con anterioridad, que ya ha sido evaluado por sus condiciones de seguridad y calidad, aunque también se puede usar plasma fresco. El

descongelamiento típicamente se efectúa a una temperatura no mayor que 6ºC. Una vez que se ha descongelado el plasma congelado a baja temperatura, se realiza una centrifugación en frío (por ejemplo, ≤ 6ºC) para separar los crioprecipitados sólidos del líquido sobrenadante. Como alternativa, el paso de separación puede realizarse por filtración en lugar de centrifugación.

[0074] Según se usa en la presente, una "agrupación de Cohn" se refiere al material de partida usado para el fraccionamiento de una muestra de plasma o una agrupación de muestras de plasma. Las agrupaciones de Cohn incluyen plasma completo, muestras de plasma pobre en crioprecipitado y agrupaciones de muestras de plasma pobre en crioprecipitado que pueden haber pasado, o no, por un paso de pre-procesamiento. En determinadas formas de realización, una agrupación de Cohn es una muestra de plasma pobre en crioprecipitado de la cual se ha eliminado uno o más factores sanguíneos en un paso de pre-procesamiento, por ejemplo, adsorción sobre una fase sólida (por ejemplo, hidróxido de aluminio, dióxido de silicona finamente dividido, etc.) o en un paso cromatográfico (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad por heparina). Se pueden aislar diversos factores sanguíneos, incluyendo pero en un sentido no limitativo actividad de *bypass* inhibidora del Factor ocho (FEIBA), complejo del Factor IX, concentrado del Factor VII o complejo de antitrombina III, de la muestra de plasma pobre en crioprecipitado para formar una agrupación de Cohn.

[0075] Según se usa en la presente, el término "porción de cabeza del eluato" se refiere a una primera fracción de una composición de inmunoglobulinas eluída de una resina de intercambio catiónico, donde la

fracción se caracteriza por un alto rendimiento de inmunoglobulinas y una actividad amidolítica reducida en comparación con la actividad amidolítica total unida a la resina antes de la elución. La porción de cabeza del eluato es la primera fracción de un eluato que es liberada de una columna de intercambio catiónico, que tiene lugar antes de la liberación (es decir, elución) de una segunda fracción de una composición de inmunoglobulinas (conocida como la "porción de estabilización del eluato"). La porción de estabilización del eluato solamente contiene una pequeña cantidad de inmunoglobulinas (típicamente no más que un 25%, preferentemente no más que un 10%, de las inmunoglobulinas unidas a la columna) y se caracteriza por una mayor concentración de actividad amidolítica en comparación con la porción de cabeza del eluato. En diversas formas de realización, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se pueden definir por diversas características, incluyendo en un sentido no limitativo, el pH del eluato, el rendimiento de proteínas (por ejemplo, expresado como un porcentaje de proteínas unidas a la resina), la concentración de proteínas (por ejemplo, determinada por la densidad óptica) del eluato, el volumen de eluato y semejantes.

[0076] Según se usa en la presente, 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 proteínas, por ejemplo, proteínas, de moléculas pequeñas, tales como azúcares y sales.

[0077] Según se usa en la presente, el término "diafiltración" se realiza con las mismas membranas que la ultrafiltración y se puede correr en la modalidad de filtración de flujo tangencial o de punto muerto. 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, las inmunoglobulinas 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.

[0078] Según se 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 zwiteriónico 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), dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de sodio y otras sales de alquilsulfatos, lauretsulfato de sodio (también conocido como lauril éter sulfato de sodio o SLES), alquilbencensulfonato; agentes tensioactivos catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario), por ejemplo, bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB), también conocido como bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 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 zwiteriónicos (anfotéricos), por ejemplo, dodecilbetaína; cocamidopropilbetaína; 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 dodecildimetilamina.

[0079] Según se usa en esta solicitud, el término "atomización" hace referencia a un medio para administrar una sustancia líquida en un sistema, por ejemplo, durante un paso de precipitación con alcohol, tal como el paso de precipitación de las fracciones de Cohn modificadas I o II+III, en forma de

pequeñas gotas o una neblina de dicha sustancia líquida. La atomización puede llevarse a cabo usando cualquier dispositivo presurizado, tal como un recipiente (por ejemplo, una botella atomizadora) que tiene una cabeza o una tobera atomizadora y que se opera manual o automáticamente, para generar una neblina fina a partir de un líquido. Típicamente, la atomización se lleva a cabo mientras se agita o se mezcla continuamente el sistema que recibe la sustancia líquida, con el fin de asegurar una distribución rápida y pareja del líquido en el sistema.

[0080] Una "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" 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 Comppunding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, 2003, Gennaro, editor, Lippincott, Williams & Wilkins). *The Science and Practice of Pharmacy* (20ª Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkens).

III. Reducción de la actividad amidolítica

[0081] En un aspecto, la presente divulgación provee métodos cromatográficos para reducir la actividad amidolítica (por ejemplo, por reducción del contenido de FXI/FXIa y/o FXII/FXIIa) de una composición de inmunoglobulina IgG derivada de plasma. Asimismo, la divulgación también provee composiciones de inmunoglobulina IgG derivadas de plasma que

contienen niveles bajos de actividad amidolítica (por ejemplo, niveles bajos de FXI/FXIa y/o FXII/FXIIa) preparadas de acuerdo con los métodos provistos en la presente. Ventajosamente, los métodos descritos en la presente proveen composiciones de inmunoglobulina IgG derivadas de plasma con perfiles de seguridad mejorados. Específicamente, las composiciones provistas por estos métodos tienen un potencial reducido para causar eventos tromboembólicos indeseados, en comparación con las composiciones de inmunoglobulina IgG elaboradas actualmente.

A. Métodos de fraccionamiento

[0082] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento que la mayor parte de la actividad amidolítica presente en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma eluye de una resina de intercambio catiónico en la porción de estabilización de un eluato creado por un paso de elución, en tanto una mayor parte del contenido de inmunoglobulinas de la fracción eluye en la porción de cabeza de dicho eluato. Por lo tanto, al recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, se reduce significativamente la actividad amidolítica de la preparación resultante de inmunoglobulinas. Específicamente, en la presente se demuestra que el contenido de Factor XIa, y por consiguiente la actividad amidolítica asociada con el contenido de Factor XIa, está significativamente reducido en las composiciones de inmunoglobulinas preparadas de acuerdo con los métodos provistos en la presente.

[0083] Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método

comprende los pasos de: (a) unir las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica (es decir, proteínas contaminantes que tienen actividad amidolítica) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico sobre la cual están unidas las proteínas con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y la actividad amidolítica; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que contiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de actividad amidolítica. En una forma de realización específica, la actividad amidolítica es el Factor XIa presente en la composición. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0084] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de Factor XI (FXI) y/o de Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o

FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de actividad amidolítica. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0085] En una forma de realización específica, el método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH de entre 4,8 y 5,6 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de

intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de actividad amidolítica. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0086] En una forma de realización específica, el método comprende los

pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) lavar la resina con las inmunoglobulinas y FXI y/o FXIa unidas a la misma con una solución amortiguadora que tiene una conductividad suficientemente baja de modo que las inmunoglobulinas no eluyen de la resina y un pH de entre 5,1 y 5,9; (c) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de actividad amidolítica. En una forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,1. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5. En aún otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de

5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, o 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0087] En una forma de realización específica, el método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de 7,8 ± 0,4 y una conductividad de por lo menos 20 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una cantidad reducida de actividad amidolítica en comparación con la composición de partida y la porción

de estabilización del eluato contiene una gran concentración de actividad amidolítica. En una forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,1. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8. En aún otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,0, 7,1, 7,2, 7,36, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 ú 8,5. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0088] En general, el material de partida usado en los métodos provistos en la presente incluyen cualquier fracción o composición de plasma que comprenda inmunoglobulina IgG y actividad amidolítica. Como tal, en una forma de realización, el plasma es fraccionado parcialmente o por completo de acuerdo con cualquiera de los esquemas de purificación conocidos en el arte. En una forma de realización específica, el plasma se fracciona para producir un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción II, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann o

un precipitado modificado de los mismos, que se pueden usar como material de partida para los métodos provistos en la presente.

[0089] En una forma de realización preferida, el plasma se fracciona mediante uno o más pasos de precipitación por etanol. Los pasos de precipitación por etanol se pueden emplear para precipitar las inmunoglobulinas deseadas fuera de la solución, reteniendo al mismo tiempo por lo menos una proteína distinta de una inmunoglobulina en el sobrenadante o para precipitar por lo menos una proteína distinta de una inmunoglobulina fuera de la solución, reteniendo al mismo tiempo la inmunoglobulina deseada en el sobrenadante. Los métodos de fraccionamiento de inmunoglobulinas en esta modalidad son bien conocidos en el arte. Los ejemplos de precipitados por etanol incluyen, en un sentido no limitativo, un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y precipitados modificados de los mismos. En una forma de realización particularmente preferida, se enriquece el contenido de las inmunoglobulinas presentes en un plasma pobre en crioprecipitados mediante un proceso con etanol de cuatro pasos, que comprende un paso de precipitación de la Fracción I+II+III, un paso de precipitación de A, un paso de precipitación de B y un paso de precipitación de la Fracción II.

[0090] En una forma de realización, el material de partida de los métodos para reducir la actividad amidolítica provistos en la presente se preparan mediante fraccionamiento por etanol de plasma humano agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En una forma de realización específica, el fraccionamiento por etanol incluye precipitación de la Fracción

I+II+III de plasma pobre en crioprecipitados, precipitación de la Fracción A de un precipitado de la Fracción I+II+III en suspensión, precipitación de la Fracción B de un precipitado de la Fracción A en suspensión y precipitación de la Fracción II de un sobrenadante de la Fracción A, como se describirá más adelante. En otra forma de realización específica, el fraccionamiento por etanol incluye precipitación de la Fracción I de plasma pobre en crioprecipitados, precipitación de la Fracción II+III de un sobrenadante de la Fracción I y precipitación de la Fracción II de un precipitado de la Fracción II+III en suspensión.

[0091] Según se demuestra en la presente, las características ventajosas de los métodos provistos en la presente son retenidas cuando se aplican a procedimientos de elaboración a gran escala. Con respecto a la preparación de composiciones de inmunoglobulina IgG, una elaboración a gran escala se refiere un procesos que permiten el enriquecimiento en inmunoglobulinas a partir de por lo menos 100 l de material de partida de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En general, en los procesos de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se fraccionará entre 100 l y 20.000 l de plasma agrupado por lote. En determinadas formas de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 100 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 500 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se

refiere al fraccionamiento de por lo menos 1.000 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 5.000 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En aún otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 10,000 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados).

[0092] En general, se contemplan métodos que comprenden todas las combinaciones de condiciones de carga, condiciones de lavado y condiciones de elución descritas previamente. Aún más, se contemplan métodos que comprenden todas las combinaciones de las condiciones cromatográficas específicas con todos los posibles esquemas para definir y recolectar la porción de cabeza del eluato, como se describirá más adelante.

1. Porciones de cabeza y de estabilización del eluato de intercambio catiónico

[0093] En un aspecto, la presente invención provee métodos para reducir la actividad amidolítica, y específicamente la actividad amidolítica aportada por las impurezas de FXIa presentes en las preparaciones de inmunoglobulinas, por recolección de la porción de cabeza de un eluato de intercambio catiónico. Ventajosamente, se muestra en la presente que la porción de cabeza de un eluato formado por elución en un solo paso de un paso de cromatografía de intercambio catiónico contiene la mayor parte del contenido deseado de inmunoglobulinas, en tanto la porción de estabilización del eluato contiene la mayor parte de la actividad amidolítica no deseada.

Dado que no es posible separar completamente la elución de inmunoglobulinas y de actividad amidolítica, se debe determinar la división entre las porciones de cabeza y de estabilización del eluato. Se deben tener en cuenta dos consideraciones fundamentales al efectuar esta determinación, es decir: (i) que según la definición de las porciones de cabeza y de estabilización del eluato, se recuperará más o menos actividad amidolítica en la porción de cabeza – es decir, se puede separar una porción mayor de actividad amidolítica del contenido de inmunoglobulinas cuando la porción de cabeza del eluato se define como una porción menor del eluato total y viceversa; y (ii) que según la definición de las porciones de cabeza y de estabilización del eluato, habrá mayores o menores rendimientos de recuperación de inmunoglobulinas en la porción de cabeza – es decir, se obtendrá un menor rendimiento de inmunoglobulinas cuando la porción de cabeza del eluato se define como una porción menor del eluato total, y viceversa.

[0094] Por lo tanto, el especialista decidirá dónde trazará el límite entre las porciones de cabeza y de estabilización del eluato de intercambio catiónico en base a sus necesidades individuales. Por ejemplo, cuando se prepara una purificación a escala pequeña, para fines de investigación o terapéuticos especializados, el especialista podría maximizar el poder de separación del método por recolección de una porción más pequeña de la cabeza del eluato, en tanto sacrifica el rendimiento final de inmunoglobulinas. Por el contrario, cuando se efectúa una elaboración a gran escala (por ejemplo, el procesamiento de más que 500 l de plasma pobre en crioprecipitados), el costo de oportunidad puede implicar la recolección de una porción más grande de la cabeza del eluato para incrementar el rendimiento de la recuperación de

inmunoglobulinas a expensas de una reducción más modesta de la actividad amidolítica de la composición.

[0095] En diversas formas de realización, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se pueden definir por diversas características, incluyendo en un sentido no limitativo, el pH del eluato, el rendimiento de proteínas (por ejemplo, expresado como un porcentaje de proteínas unidas a la resina), la concentración de proteínas (por ejemplo, determinada por la densidad óptica) del eluato, el volumen de eluato y semejantes.

a. pH del eluato

[0096] Según se demuestra en los ejemplos provistos en la presente, el comienzo del paso de elución de intercambio catiónico es marcado por una caída en el pH de la solución que sale de la columna, hasta una pH menor que 5,0, a pesar de que la solución amortiguadora de elución tiene un pH más alto (generalmente > 7,0) que el de los pasos de carga y de lavado de la columna (generalmente 5,0-6,0). Esta caída en el pH se corresponde con la elución de una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una baja actividad amidolítica y contenido del Factor XIa (por ejemplo, véase, la Tabla 4, Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose y la Tabla 11, Caracterización bioquímica de muestras del eluato de CM-Sepharose tomadas después de la elución de cada volumen de columna, respectivamente). En un punto posterior de la elución, el pH de la solución que sale de la columna aumenta marcadamente a más de 6,0-8,0. Este cambio en el pH es concomitante de un aumento significativo en la actividad amidolítica y en el contenido de Factor XIa del eluato (por ejemplo, véase, la Tabla 4, Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose y la Tabla 11, Caracterización bioquímica de muestras del

eluato de CM-Sepharose tomadas después de la elución de cada volumen de columna, respectivamente). Por consiguiente, aunque se conduce una elución en pasos por la aplicación de una sola solución amortiguadora de elución de pH alto (generalmente mayor que 7,0), el perfil de elución es semejante a una elución de dos pasos en donde primero eluyen las inmunoglobulinas IgG de la columna, seguido por la actividad amidolítica concurrente (por ejemplo, Factor XI y/o Factor XIa). Por consiguiente, en determinadas formas de realización, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen en base al pH del eluato a la salida de la columna.

[0097] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, proteínas contaminantes que tienen actividad amidolítica) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas sobre la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y de actividad amidolítica; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,0. En otra forma de realización

específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,0. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 o menos. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0098] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de Factor XI (FXI) y/o de Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0. En una forma de

realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,0. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,0. En aún otras formas de realización específicas, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 o menos. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

b. Absorbancia del eluato

[0099] En aún otra forma de realización particularmente bien adaptada para la elaboración a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen por la concentración de inmunoglobulina que eluye de la columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, durante la elaboración a gran escala, la composición de

inmunoglobulinas se puede cargar sobre la resina de intercambio catiónico a cargas de proteínas suficientemente altas (por ejemplo, > 80 mg de proteína por ml de resina) de modo tal que el eluato pico está muy concentrada. En estos casos, la porción de cabeza del eluato se puede definir como la fracción del eluato que eluye antes del punto en el cual la DO_{280} cae por debajo de un valor umbral. De esta manera, se puede recuperar de manera reproducible prácticamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a otra, independientemente de varianzas menores entre las corridas de elaboración. Según se demuestra en el Ejemplo 9, la aplicación de este esquema de recolección en un proceso de elaboración a gran escala da como resultado la recuperación con un gran rendimiento de una composición de inmunoglobulina IgG con una TGA y un contenido de actividad amidolítica significativamente reducidos.

[0100] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, proteínas contaminantes que tienen actividad amidolítica) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,5 AU. En una

forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,0 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,5 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 2,0 AU. En aún otras formas de realización específicas, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0101] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de Factor XI (FXI) y/o de Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de

por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 2,0 AU. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,5 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,0 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,5 AU. En aún otras formas de realización específicas, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

c. Porcentaje del eluato total

[0102] En aún otra forma de realización particularmente bien adaptada

para la elaboración a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen como un porcentaje del contenido de proteínas totales del eluato (por ejemplo, por volumen o proteínas totales). Al predeterminar el porcentaje del eluato a recolectar en la porción de cabeza, es posible un estrecho control del rendimiento de recuperación de inmunoglobulina. Este método para definir las porciones de cabeza y de estabilización del eluato es de particular utilidad para los procesos de elaboración que requieren de un rendimiento mínimo del paso y para los procesos en los cuales la decisión se toma en base a sopesar el costo de rendimientos reducidos de inmunoglobulina con el beneficio de producir una composición con un contenido amidolítico y de Factor XI y/o de Factor XIa reducidos. De esta manera, se puede recuperar de manera reproducible prácticamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a otra, independientemente de varianzas menores entre las corridas de elaboración. Según se demuestra en el Ejemplo 8, la aplicación de este esquema de recolección puede dar como resultado la recuperación de gran rendimiento de una composición de inmunoglobulina IgG con un contenido significativamente reducido de TGA y actividad amidolítica.

[0103] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, proteínas contaminantes que tienen actividad amidolítica) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora

de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 80% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 75% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 75% y 80% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% u 80% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 70% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 65% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 65% y 70% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% u 70% del eluato total.

En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 60% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 60% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 55% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 55% y 60% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% u 60% del eluato total. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0104] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de Factor XI (FXI) y/o de Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar

un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 80% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 75% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 75% y 80% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% u 80% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 70% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 65% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 65% y 70% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% u 70% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 60%

del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 60% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 55% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 55% y 60% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% u 60% del eluato total. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

d. Volumen del eluato total

[0105] En otra forma de realización particularmente bien adaptada para la elaboración a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen como volúmenes del pico de eluato con relación al tamaño de la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, por un determinado número de volúmenes de columna). Al predeterminar un volumen de eluato a recolectar en la porción de cabeza, es posible un control estrecho y reproducible del rendimiento de recuperación de inmunoglobulinas. Este método para definir las porciones de cabeza y de

estabilización del eluato es de particular utilidad para los procesos de elaboración que requieren de un rendimiento mínimo del paso y para los procesos en los cuales la decisión se toma en base a sopesar el costo de rendimientos reducidos de inmunoglobulina con el beneficio de producir una composición con un contenido amidolítico y de Factor XI y/o de Factor XIa reducidos. De esta manera, se puede recuperar de manera reproducible prácticamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a otra, independientemente de varianzas menores entre las corridas de elaboración. Según se demuestra en los Ejemplos 11 a 13, la aplicación de este esquema de recolección puede dar como resultado la recuperación de gran rendimiento de una composición de inmunoglobulina IgG con un contenido significativamente reducido de TGA y actividad amidolítica.

[0106] En una forma de realización, el comienzo de la porción de cabeza está definido por una absorbancia basal. En algunas formas de realización, la recolección de la porción de cabeza comienza una vez que la absorbancia del pico de eluato atraviesa un primer umbral. En una forma de realización, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 2,0 AU. En una forma de realización específica, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 1,5 AU. En otra forma de realización específica, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 1,0 AU. En otra forma de realización específica, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 0,5 AU. En aún otras formas de realización específicas, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato

alcanza por lo menos 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más.

[0107] En algunas formas de realización, una vez iniciada la recolección de la porción de cabeza, se recolecta una cantidad predeterminada de volúmenes de columna antes de pasar a la recolección (o eliminación) de la porción de estabilización del eluato. En una forma de realización, no se recolectan más que 5 volúmenes de columna (CV) de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 4 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 3 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 2,7 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 2,5 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 2 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 1 CV de eluato en la porción de cabeza. En aún otras formas de realización, no se recolectan más que 0,5 CV, 0,6 CV, 0,7 CV, 0,8 CV, 0,9 CV, 1,0 CV, 1,1 CV, 1,2 CV, 1,3 CV, 1,4 CV, 1,5 CV, 1,6 CV, 1,7 CV, 1,8 CV, 1,9 CV, 2,0 CV, 2,1 CV, 2,2 CV, 2,3 CV, 2,4 CV, 2,5 CV, 2,6 CV, 2,7 CV, 2,8 CV, 2,9 CV, 3,0 CV, 3,1 CV, 3,2 CV, 3,3 CV, 3,4 CV, 3,5 CV, 3,6 CV, 3,7 CV, 3,8 CV, 3,9 CV, 4,0 CV, 4,1 CV, 4,2 CV, 4,3 CV, 4,4 CV, 4,5 CV, 4,6 CV, 4,7 CV, 4,8 CV, 4,9 CV, 5,0 CV, 5,1 CV, 5,2 CV, 5,3 CV, 5,4 CV, 5,5 CV, 5,6 CV, 5,7 CV, 5,8 CV, 5,9 CV, 6,0 CV o más volúmenes de columna de eluato en la porción de cabeza.

[0108] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un

método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (es decir, proteínas contaminantes que tienen actividad amidolítica) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que 4 volúmenes de columna (CV) del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,5 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 y 4,0 CV del eluato total. En aún otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,5 CV del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende 0,5 CV, 0,6 CV, 0,7 CV, 0,8 CV, 0,9 CV, 1,0 CV, 1,1 CV, 1,2 CV, 1,3 CV, 1,4 CV, 1,5 CV, 1,6 CV, 1,7 CV, 1,8 CV, 1,9 CV, 2,0 CV, 2,1 CV, 2,2 CV, 2,3 CV, 2,4 CV, 2,5 CV, 2,6 CV, 2,7 CV, 2,8 CV, 2,9 CV, 3,0 CV, 3,1 CV, 3,2 CV, 3,3 CV, 3,4 CV, 3,5 CV, 3,6 CV, 3,7 CV, 3,8 CV, 3,9 CV, 4,0 CV, 4,1 CV, 4,2 CV, 4,3 CV, 4,4 CV, 4,5 CV, 4,6 CV, 4,7 CV, 4,8 CV, 4,9 CV, 5,0 CV, 5,1 CV, 5,2 CV, 5,3 CV, 5,4 CV, 5,5

CV, 5,6 CV, 5,7 CV, 5,8 CV, 5,9 CV o 6,0 CV del eluato total. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0109] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de Factor XI (FXI) y/o de Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que 4 volúmenes de columna (CV) del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,5 CV del eluato total. En otra forma de realización

específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 y 4,0 CV del eluato total. En aún otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,5 CV del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende 0,5 CV, 0,6 CV, 0,7 CV, 0,8 CV, 0,9 CV, 1,0 CV, 1,1 CV, 1,2 CV, 1,3 CV, 1,4 CV, 1,5 CV, 1,6 CV, 1,7 CV, 1,8 CV, 1,9 CV, 2,0 CV, 2,1 CV, 2,2 CV, 2,3 CV, 2,4 CV, 2,5 CV, 2,6 CV, 2,7 CV, 2,8 CV, 2,9 CV, 3,0 CV, 3,1 CV, 3,2 CV, 3,3 CV, 3,4 CV, 3,5 CV, 3,6 CV, 3,7 CV, 3,8 CV, 3,9 CV, 4,0 CV, 4,1 CV, 4,2 CV, 4,3 CV, 4,4 CV, 4,5 CV, 4,6 CV, 4,7 CV, 4,8 CV, 4,9 CV, 5,0 CV, 5,1 CV, 5,2 CV, 5,3 CV, 5,4 CV, 5,5 CV, 5,6 CV, 5,7 CV, 5,8 CV, 5,9 CV o 6,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

IV. Reducción de la actividad anti-complemento (ACA)

[0110] En un aspecto, la presente divulgación provee métodos cromatográficos para reducir el contenido de actividad anti-complemento (ACA) de una composición de inmunoglobulina IgG derivada de plasma. Asimismo, la divulgación también provee composiciones de inmunoglobulina IgG derivadas de plasma que contienen niveles bajos de actividad anti-complemento (ACA)

preparadas de acuerdo con los métodos provistos en la presente. Ventajosamente, los métodos descritos en la presente proveen composiciones de inmunoglobulina IgG derivadas de plasma con perfiles de seguridad mejorados. Específicamente, las composiciones provistas con estos métodos tienen un potencial reducido para causar reacciones adversas asociadas con la actividad anticomplementaria, en comparación con las composiciones elaboradas actualmente de inmunoglobulina IgG (véase, por ejemplo, Buchacher A. *et al.*, Vox Sang, abril de 2010; 98(3 Pt 1): e209-18, cuyo contenido se incorpora expresamente y por completo en la presente a modo de referencia para todo fin.

A. Métodos de fraccionamiento

[0111] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento que la mayor parte de la actividad anti-complemento (ACA) presente en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma eluye de una resina de intercambio catiónico en la porción de estabilización de un eluato creado por un paso de elución, en tanto una mayor parte del contenido de inmunoglobulinas de la fracción eluye en la porción de cabeza de dicho eluato. Por lo tanto, al recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, se reduce significativamente la actividad anti-complemento de la preparación resultante de inmunoglobulinas. Específicamente, se muestra en la presente que el contenido de ACA está significativamente reducido en las composiciones de inmunoglobulinas preparadas de acuerdo con los métodos provistos en la presente.

[0112] Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento

(ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anti-complemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anti-complemento) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y ACA; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que contiene una cantidad reducida de ACA en comparación con la composición de partida, y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de actividad ACA. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0113] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la

primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una concentración reducida de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM). En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm.

[0114] En una forma de realización específica, el método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un

pH de entre 4,8 y 5,6 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que contiene una cantidad reducida de ACA, con relación a la cantidad de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida, y la porción de estabilización del eluato contiene una gran cantidad de ACA, con relación a la cantidad de inmunoglobulina IgG. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de

intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0115] En una forma de realización específica, el método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) lavar la resina con las inmunoglobulinas y ACA unidas a la misma con una solución amortiguadora que tiene una conductividad suficientemente baja de modo que las inmunoglobulinas no eluyen de la resina y un pH de entre 5,1 y 5,9; (c) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una concentración reducida de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida, y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG. En una forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la solución

amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,1. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5. En aún otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, o 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0116] En una forma de realización específica, el método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de 7,8 ± 0,4 y una conductividad de por lo menos 20 mS/cm para formar un eluato; y (c)

recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato comprende una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una concentración reducida de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en comparación con la composición de partida, y la porción de estabilización del eluato contiene una gran concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG. En una forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,1. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8. En aún otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,0, 7,1, 7,2, 7,36, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 ú 8,5. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0117] En general, el material de partida usado para los métodos provistos en la presente incluye cualquier fracción o composición de plasma que comprende inmunoglobulina IgG y actividad anticomplementaria. Como tal, en una forma de realización, el plasma es fraccionado parcialmente o por

completo de acuerdo con cualquiera de los esquemas de purificación conocidos en el arte. En una forma de realización específica, el plasma se fracciona para producir un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción II, un precipitado de las Fracciones I+II+III, un precipitado de las Fracciones II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann o un precipitado modificado de los mismos, que se pueden usar como material de partida para los métodos provistos en la presente.

[0118] En una forma de realización preferida, el plasma se fracciona mediante uno o más pasos de precipitación por etanol. Los pasos de precipitación por etanol se pueden emplear para precipitar las inmunoglobulinas deseadas fuera de la solución, reteniendo al mismo tiempo por lo menos una proteína distinta de una inmunoglobulina en el sobrenadante o para precipitar por lo menos una proteína distinta de una inmunoglobulina fuera de la solución, reteniendo al mismo tiempo la inmunoglobulina deseada en el sobrenadante. Los métodos de fraccionamiento de inmunoglobulinas en esta modalidad son bien conocidos en el arte. Los ejemplos de precipitados por etanol incluyen, en un sentido no limitativo, un precipitado de la Fracción I, un precipitado de las Fracciones I+II+III, un precipitado de las Fracciones II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y precipitados modificados de los mismos. En una forma de realización particularmente preferida, se enriquece el contenido de las inmunoglobulinas presentes en un plasma pobre en crioprecipitados mediante un proceso con etanol de cuatro pasos, que comprende un paso de precipitación de la Fracción I+II+III, un paso de precipitación de A, un paso de

precipitación de B y un paso de precipitación de la Fracción II.

[0119] Según se demuestra en la presente, las características ventajosas de los métodos provistos en la presente son retenidas cuando se aplican a procedimientos de elaboración a gran escala. Con respecto a la preparación de composiciones de inmunoglobulina IgG, una elaboración a gran escala se refiere un procesos que permiten el enriquecimiento en inmunoglobulinas a partir de por lo menos 100 l de material de partida de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En general, en los procesos de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se fraccionará entre 100 l y 20.000 l de plasma agrupado por lote. En determinadas formas de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 100 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 500 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 1.000 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 5.000 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En aún otra forma de realización, un proceso de elaboración de inmunoglobulinas a gran escala se refiere al fraccionamiento de por lo menos 10,000 l de plasma agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados).

[0120] En una forma de realización, el material de partida de los métodos para reducir la actividad anti-complemento (ACA) provistos en la presente se prepara mediante fraccionamiento por etanol de plasma humano agrupado (por ejemplo, plasma pobre en crioprecipitados). En una forma de realización específica, el fraccionamiento por etanol incluye precipitación de la Fracción I+II+III de plasma pobre en crioprecipitados, precipitación de la Fracción A de un precipitado de la Fracción I+II+III en suspensión, precipitación de la Fracción B de un precipitado de la Fracción A en suspensión y precipitación de la Fracción II de un sobrenadante de la Fracción A, como se describirá más adelante. En otra forma de realización específica, el fraccionamiento por etanol incluye precipitación de la Fracción I de plasma pobre en crioprecipitados, precipitación de la Fracción II+III de un sobrenadante de la Fracción I y precipitación de la Fracción II de un precipitado de la Fracción II+III en suspensión.

[0121] En general, se contemplan métodos que comprenden todas las combinaciones de condiciones de carga, condiciones de lavado y condiciones de elución descritas previamente. Aún más, se contemplan métodos que comprenden todas las combinaciones de las condiciones cromatográficas específicas con todos los posibles esquemas para definir y recolectar la porción de cabeza del eluato, como se describirá más adelante.

1. Porciones de cabeza y de estabilización del eluato de intercambio catiónico

[0122] En un aspecto, la presente invención provee métodos para reducir la actividad anti-complemento (ACA), presente en preparaciones de inmunoglobulinas por recolección de la porción de cabeza de un eluato de

intercambio catiónico. Ventajosamente, se muestra en la presente que la porción de cabeza de un eluato formado por elución en un solo paso de un paso de cromatografía de intercambio catiónico contiene la mayor parte del contenido deseado de inmunoglobulinas, en tanto la porción de estabilización del eluato contiene la mayor parte de la ACA no deseada. Dado que no es posible separar completamente la elución de inmunoglobulinas y ACA, se debe determinar la división entre las porciones de cabeza y de estabilización del eluato. Se deben tener en cuenta dos consideraciones fundamentales al efectuar esta determinación, es decir: (i) que según la definición de las porciones de cabeza y de estabilización del eluato, se recuperará más o menos actividad amidolítica ACA en la porción de cabeza – es decir, se puede separar una porción mayor de ACA del contenido de inmunoglobulinas cuando la porción de cabeza del eluato se define como una porción menor del eluato total y viceversa; y (ii) que según la definición de las porciones de cabeza y de estabilización del eluato, habrá mayores o menores rendimientos de recuperación de inmunoglobulinas en la porción de cabeza – es decir, se obtendrá un menor rendimiento de inmunoglobulinas cuando la porción de cabeza del eluato se define como una porción menor del eluato total y viceversa.

[0123] Por lo tanto, el especialista decidirá dónde trazará el límite entre las porciones de cabeza y de estabilización del eluato de intercambio catiónico en base a sus necesidades individuales. Por ejemplo, cuando se prepara una purificación a escala pequeña, para fines de investigación o terapéuticos especializados, el especialista podría maximizar el poder de separación del método por recolección de una porción más pequeña de la cabeza del eluato,

en tanto sacrifica el rendimiento final de inmunoglobulinas. Por el contrario, cuando se efectúa una elaboración a gran escala (por ejemplo, el procesamiento de más que 500 l de plasma pobre en crioprecipitados), el costo de oportunidad puede implicar la recolección de una porción más grande de la cabeza del eluato para incrementar el rendimiento de la recuperación de inmunoglobulinas a expensas de una reducción más modesta de la ACA de la composición.

[0124] En diversas formas de realización, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se pueden definir por diversas características, incluyendo en un sentido no limitativo, el pH del eluato, el rendimiento de proteínas (por ejemplo, expresado como un porcentaje de proteínas unidas a la resina), la concentración de proteínas (por ejemplo, determinada por la densidad óptica) del eluato, el volumen de eluato y semejantes.

a. pH del eluato

[0125] Según se demuestra en los ejemplos provistos en la presente, el comienzo del paso de elución de intercambio catiónico es marcado por una caída en el pH de la solución que sale de la columna, hasta una pH menor que 5,0, a pesar de que la solución amortiguadora de elución tiene un pH más alto (generalmente > 7,0) que el de los pasos de carga y de lavado de la columna (generalmente 5,0-6,0). Esta caída en el pH corresponde a la elución de una composición de inmunoglobulina IgG que tiene una baja ACA (por ejemplo, véase, la Tabla 3, Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 y E2, la Tabla 11, Caracterización bioquímica de muestras del eluato de CM-Sepharose tomadas después de la elución de cada volumen de columna y la Tabla 15, Comparación de las características

adicionales de los dos recipientes finales). En un punto posterior de la elución, el pH de la solución que sale de la columna aumenta marcadamente a más de 6,0-8,0. Este cambio en el pH es concomitante de un aumento significativo en el contenido de ACA del eluato (por ejemplo, véase, la Tabla 3, Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 y E2, la Tabla 11, Caracterización bioquímica de muestras del eluato de CM-Sepharose tomadas después de la elución de cada volumen de columna y la Tabla 15, Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales). Por consiguiente, aunque se conduce una elución en pasos por la aplicación de una sola solución amortiguadora de elución de pH alto (generalmente mayor que 7,0), el perfil de elución es semejante a una elución de dos pasos en donde primero eluyen las inmunoglobulinas IgG de la columna, seguido por la actividad anti-complemento concurrente. Por consiguiente, en determinadas formas de realización, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen en base al pH del eluato a la salida de la columna.

[0126] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anti-complemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anti-complemento) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico que contiene inmunoglobulina IgG y ACA unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y ACA; y (d) recolectar la porción de cabeza del

eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,0. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,0. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 o menos. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0127] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la ACA a

la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 6,0. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,5. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 5,0. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato con un pH no mayor que 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 o menos. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización

específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

b. Absorbancia del eluato

[0128] En aún otra forma de realización particularmente bien adaptada para la elaboración a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen por la concentración de inmunoglobulina que eluye de la columna de intercambio catiónico. Por ejemplo, durante la elaboración a gran escala, la composición de inmunoglobulinas se puede cargar sobre la resina de intercambio catiónico a cargas de proteínas suficientemente altas (por ejemplo, > 80 mg de proteína por ml de resina) de modo tal que el eluato pico está muy concentrada. En estos casos, la porción de cabeza del eluato se puede definir como la fracción del eluato que eluye antes del punto en el cual la DO_{280} cae por debajo de un valor umbral. De esta manera, se puede recuperar de manera reproducible prácticamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a otra, independientemente de varianzas menores entre las corridas de elaboración. Según se demuestra en el Ejemplo 9, la aplicación de este esquema de recolección para un proceso de elaboración a gran escala da como resultado una recuperación de gran rendimiento de una composición de inmunoglobulina IgG con un contenido significativamente reducido de actividad

anti-complemento (ACA).

[0129] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anti-complemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anti-complemento) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y ACA; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,5 AU. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,0 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,5 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 2,0 AU. En aún otras formas de realización específicas, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización

específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0130] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,5 AU. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,0 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 1,5 AU. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 2,0 AU. En aún otras formas de realización específicas,

la porción de cabeza del eluato consiste en la porción del eluato que tiene una DO_{280} de por lo menos 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

c. Porcentaje del eluato total

[0131] En aún otra forma de realización particularmente bien adaptada para la elaboración a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen como un porcentaje del contenido de proteínas totales del eluato (por ejemplo, por volumen o proteínas totales). Al predeterminar el porcentaje del eluato a

recolectar en la porción de cabeza, es posible un estrecho control del rendimiento de recuperación de inmunoglobulina. Este método para definir las porciones de cabeza y de estabilización del eluato es de particular utilidad para procesos de elaboración que requieren de un rendimiento mínimo del paso y para procesos en los cuales la decisión se toma en base a sopesar el costo de rendimientos reducidos de inmunoglobulina con el beneficio de producir una composición con un contenido reducido de actividad anti-complemento (ACA). De esta manera, se puede recuperar de manera reproducible prácticamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a otra, independientemente de varianzas menores entre las corridas de elaboración. Según se demuestra en el Ejemplo 8, la aplicación de este esquema de recolección puede dar como resultado la recuperación de gran rendimiento de una composición de inmunoglobulina IgG con un contenido significativamente reducido de actividad anti-complemento.

[0132] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anti-complemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anti-complemento) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y ACA; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato

consiste en no más que un 80% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 75% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 75% y 80% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% u 80% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 70% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 65% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 65% y 70% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% u 70% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 60% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 60% del eluato total. En otra forma de

realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 55% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 55% y 60% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% u 60% del eluato total. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0133] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 80% del eluato total. En una forma de realización específica, la

porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 75% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 75% y 80% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% u 80% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 70% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 65% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 65% y 70% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% u 70% del eluato total. En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 60% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 60% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un

50% y 55% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 55% y 60% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% u 60% del eluato total. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

d. Volumen del eluato total

[0134] En otra forma de realización particularmente bien adaptada para la elaboración a gran escala de composiciones de inmunoglobulinas, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen como volúmenes del pico de eluato con relación al tamaño de la columna de intercambio catiónico (por ejemplo, por un determinado número de volúmenes de columna).

Al predeterminar un volumen de eluato a recolectar en la porción de cabeza, es posible un control estrecho y reproducible del rendimiento de recuperación de inmunoglobulinas. Este método para definir las porciones de cabeza y de estabilización del eluato es de particular utilidad para procesos de elaboración que requieren de un rendimiento mínimo del paso y para procesos en los cuales la decisión se toma en base a sopesar el costo de rendimientos reducidos de inmunoglobulina con el beneficio de producir una composición con un contenido reducido de actividad anti-complemento (ACA). De esta manera, se puede recuperar de manera reproducible prácticamente el mismo rendimiento de inmunoglobulinas de una preparación a otra, independientemente de varianzas menores entre las corridas de elaboración. Según se demuestra en los Ejemplos 11 a 13, la aplicación de este esquema de recolección puede dar como resultado una recuperación de gran rendimiento de una composición de inmunoglobulina IgG con un contenido reducido de actividad anti-complemento.

[0135] En una forma de realización, el comienzo de la porción de cabeza está definido por una absorbancia basal. En algunas formas de realización, la recolección de la porción de cabeza comienza una vez que la absorbancia del pico de eluato atraviesa un primer umbral. En una forma de realización, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 0,5 AU. En una forma de realización específica, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 1,0 AU. En otra forma de realización específica, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 1,5 AU. En otra forma de realización específica, la

recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 2,0 AU. En aún otras formas de realización específicas, la recolección de la porción de cabeza comienza cuando la DO_{280} del eluato alcanza por lo menos 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más.

[0136] En algunas formas de realización, una vez iniciada la recolección de la porción de cabeza, se recolecta una cantidad predeterminada de volúmenes de columna antes de pasar a la recolección (o eliminación) de la porción de estabilización del eluato. En una forma de realización, no se recolectan más que 5 volúmenes de columna (CV) de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 4 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 3 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 2,7 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 2,5 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 2 CV de eluato en la porción de cabeza. En otra forma de realización, no se recolectan más que 1 CV de eluato en la porción de cabeza. En aún otras formas de realización, no se recolectan más que 0,5 CV, 0,6 CV, 0,7 CV, 0,8 CV, 0,9 CV, 1,0 CV, 1,1 CV, 1,2 CV, 1,3 CV, 1,4 CV, 1,5 CV, 1,6 CV, 1,7 CV, 1,8 CV, 1,9 CV, 2,0 CV, 2,1 CV, 2,2 CV, 2,3 CV, 2,4 CV, 2,5 CV, 2,6 CV, 2,7 CV, 2,8 CV, 2,9 CV, 3,0 CV, 3,1 CV, 3,2 CV, 3,3 CV, 3,4 CV, 3,5 CV, 3,6 CV, 3,7 CV, 3,8 CV, 3,9 CV, 4,0 CV, 4,1 CV, 4,2 CV, 4,3 CV, 4,4 CV, 4,5 CV, 4,6 CV, 4,7 CV, 4,8 CV, 4,9 CV, 5,0 CV, 5,1 CV, 5,2 CV, 5,3 CV, 5,4 CV, 5,5 CV, 5,6 CV, 5,7

CV, 5,8 CV, 5,9 CV, 6,0 CV o más volúmenes de columna de eluato en la porción de cabeza.

[0137] Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención provee un método para reducir la cantidad de actividad amidolítica en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) unir inmunoglobulinas IgG y actividad anti-complemento (es decir, contaminantes que tienen actividad anti-complemento) sobre una resina de intercambio catiónico; (b) opcionalmente lavar la resina de intercambio catiónico con las proteínas unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado para eliminar los contaminantes asociados sueltamente; (c) conducir un solo paso de elución de las inmunoglobulinas IgG y ACA; y (d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que 4 volúmenes de columna (CV) del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,5 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 y 4,0 CV del eluato total. En aún otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,5 CV del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende 0,5 CV, 0,6 CV, 0,7 CV, 0,8 CV, 0,9 CV, 1,0 CV, 1,1 CV, 1,2 CV, 1,3 CV, 1,4 CV, 1,5 CV, 1,6 CV, 1,7 CV, 1,8 CV, 1,9 CV, 2,0 CV, 2,1 CV, 2,2 CV, 2,3 CV, 2,4 CV, 2,5 CV, 2,6 CV, 2,7 CV, 2,8

CV, 2,9 CV, 3,0 CV, 3,1 CV, 3,2 CV, 3,3 CV, 3,4 CV, 3,5 CV, 3,6 CV, 3,7 CV, 3,8 CV, 3,9 CV, 4,0 CV, 4,1 CV, 4,2 CV, 4,3 CV, 4,4 CV, 4,5 CV, 4,6 CV, 4,7 CV, 4,8 CV, 4,9 CV, 5,0 CV, 5,1 CV, 5,2 CV, 5,3 CV, 5,4 CV, 5,5 CV, 5,6 CV, 5,7 CV, 5,8 CV, 5,9 CV o 6,0 CV del eluato total. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

[0138] En una forma de realización específica, la invención provee un método para reducir la cantidad de actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, donde dicho método comprende los pasos de: (a) poner una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico; (b) eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato; y (c) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato, en donde la porción de cabeza del eluato consiste en no más que 4 volúmenes de columna (CV) del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,0 CV del eluato total.

En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,0 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 CV y 3,5 CV del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,0 y 4,0 CV del eluato total. En aún otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre 2,5 CV y 3,5 CV del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende 0,5 CV, 0,6 CV, 0,7 CV, 0,8 CV, 0,9 CV, 1,0 CV, 1,1 CV, 1,2 CV, 1,3 CV, 1,4 CV, 1,5 CV, 1,6 CV, 1,7 CV, 1,8 CV, 1,9 CV, 2,0 CV, 2,1 CV, 2,2 CV, 2,3 CV, 2,4 CV, 2,5 CV, 2,6 CV, 2,7 CV, 2,8 CV, 2,9 CV, 3,0 CV, 3,1 CV, 3,2 CV, 3,3 CV, 3,4 CV, 3,5 CV, 3,6 CV, 3,7 CV, 3,8 CV, 3,9 CV, 4,0 CV, 4,1 CV, 4,2 CV, 4,3 CV, 4,4 CV, 4,5 CV, 4,6 CV, 4,7 CV, 4,8 CV, 4,9 CV, 5,0 CV, 5,1 CV, 5,2 CV, 5,3 CV, 5,4 CV, 5,5 CV, 5,6 CV, 5,7 CV, 5,8 CV, 5,9 CV o 6,0 CV del eluato total. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25

mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

V. Preparación del plasma pobre en crioprecipitados

[0139] El material de partida usado para preparar las composiciones de IgG concentradas generalmente consiste en plasma recuperado (es decir, plasma que ha sido separado de sangre completa *ex vivo*) o plasma en la fuente (es decir, plasma recolectado por plasmaféresis). 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, preferentemente entre -1°C y 6°C. Una vez que se ha descongelado el plasma congelado a baja temperatura, se realiza una centrifugación en frío (por ejemplo, ≤ 6ºC, preferentemente 2,5 ± 3,5°C) para separar los crioprecipitados sólidos del líquido sobrenadante. Como alternativa, el paso de separación puede realizarse por filtración en lugar de centrifugación. Después, el líquido sobrenadante (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. Por ejemplo, se puede adsorber uno o más factores sanguíneos del plasma pobre

en crioprecipitados antes de efectuar un enriquecimiento adicional de la solución que contiene inmunoglobulinas.

VI. Fraccionamiento del plasma pobre en crioprecipitados

[0140] Con el fin de preparar una composición de inmunoglobulina IgG, comúnmente se fraccionar un plasma pobre en crioprecipitados para separar las inmunoglobulinas deseadas de otras proteínas e impurezas que pudieran estar presentes. En el arte se conocen muchos métodos para el fraccionamiento de plasma, incluyendo fraccionamiento con alcohol (por ejemplo, etanol), precipitación por polímeros (por ejemplo, PEG), precipitación por ácidos y ésteres grasos (por ejemplo, caprilato), cromatografía y semejantes. Los ejemplos de estos procesos de fraccionamiento incluyen, en un sentido no limitativo, fraccionamientos de Cohn (*J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68(3): 459-475; *J. Am. Chem. Soc.* 72: 465-474 (1950)), fraccionamientos de Oncley (*J. Am. Chem. Soc.*, 1949, 71(2): 541-550), purificaciones de Deutsch (*J. Biol. Chem.* 164:109-118), purificaciones de Hoppe (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34):1749-1752), purificaciones de Falksveden (Patente de Suecia N°: 348942), purificaciones de Falksveden y Lundblad (*Methods of Plasma Protein Fractionation* 1980), purificaciones de Lebing (Vox Sang 2003 (84):193-201), purificaciones de Tanaka (*Braz J Med Biol Res* 2000 (33)37-30)), purificaciones de Teschner (Vox Sang, 2007 (92): 42-55), fraccionamientos de Nitschmann (*Helv. Chim. Acta* 37: 866-873), fraccionamientos de Kistler/Nitschmann (Vox Sang, 7: 414-424 (1962)), purificaciones de Barundern (Vox Sang, 7: 157-74 (1962)), purificaciones de Koblet (Vox Sang, 13:93-102 (1967)) un procedimiento de purificación divulgado en las Patentes de los EE.UU. N°: 5.122.373 ó 5.177.194,

procedimientos modificados del mismo y procedimientos de purificación similares o equivalentes conocidos en el arte, cuyas divulgaciones se incorporan por completo en la presente a modo de referencia, para todo fin.

[0141] En general, los métodos provistos en la presente son compatibles con cualquiera de los esquemas de purificación indicados precedentemente. Como tal, en una forma de realización, el plasma pobre en crioprecipitados se fracciona parcial o completamente de acuerdo con cualquiera de los esquemas de purificación mencionadas previamente. En una forma de realización específica, el plasma pobre en crioprecipitados se fracciona de acuerdo con uno o más de los pasos de fraccionamiento divulgados en las enseñanzas descritas previamente, para producir una composición de fraccionamiento intermedio. En una forma de realización más específica, el plasma pobre en crioprecipitados se fracciona para producir un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción II, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann o un precipitado modificado de los mismos.

[0142] En una forma de realización preferida, el plasma pobre en crioprecipitados se fracciona mediante uno o más pasos de precipitación por etanol. Los pasos de precipitación por etanol se pueden emplear para precipitar las inmunoglobulinas deseadas fuera de la solución, reteniendo al mismo tiempo por lo menos una proteína distinta de una inmunoglobulina en el sobrenadante o para precipitar por lo menos una proteína distinta de una inmunoglobulina fuera de la solución, reteniendo al mismo tiempo la inmunoglobulina deseada en el sobrenadante. Los métodos de

fraccionamiento de inmunoglobulinas en esta modalidad son bien conocidos en el arte. Los ejemplos de precipitados por etanol incluyen, en un sentido no limitativo, un precipitado de la Fracción I, un precipitado de las Fracciones I+II+III, un precipitado de las Fracciones II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y precipitados modificados de los mismos. En una forma de realización particularmente preferida, se enriquece el contenido de las inmunoglobulinas presentes en un plasma pobre en crioprecipitados mediante un proceso con etanol de cuatro pasos, que comprende un paso de precipitación de la Fracción I+II+III, un paso de precipitación de A, un paso de precipitación de B y un paso de precipitación de la Fracción II, como se describirá más adelante.

VII. Ejemplos de esquemas de fraccionamiento

[0143] Aunque el especialista podrá apreciar que se pueden utilizar muchos materiales de partida diferentes (por ejemplo, diferentes fracciones de plasma) para llevar a cabo los métodos provistos en la presente para reducir la actividad amidolítica (por ejemplo, el contenido del Factor XI y/o del Factor XIa) y/o la actividad anti-complemento (ACA), a continuación se proporciona un ejemplo de esquema de fraccionamiento. En el ejemplo de esquema de fraccionamiento se emplean cuatro reacciones de precipitación por etanol para preparar una precipitación de la Fracción II que se puede volver a suspender y luego utilizar como material de partida de los métodos provistos en la presente. La composición enriquecida de inmunoglobulina IgG resultante se puede enriquecer adicionalmente mediante un procesamiento corriente abajo usando técnicas tales como pasos de cromatografía de intercambio aniónico, ultra-/diafiltración, inactivación viral y/o eliminación y otros pasos de enriquecimiento

bien conocidos en el arte.

[0144] Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención provee un método para la elaboración de una composición de inmunoglobulina IgG, donde dicho método comprende los pasos de: (a) proveer una fracción de plasma pobre en crioprecipitados; (b) precipitar inmunoglobulinas de la fracción de plasma pobre en crioprecipitados en una primera reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitados a una concentración final de entre 17% y 23% (v/v) a un pH de entre 6,5 y 7,3 y a una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un primer precipitado y un primer sobrenadante; (c) resuspender las inmunoglobulinas presentes en el primer precipitado, formando así una primera suspensión; (d) precipitar las inmunoglobulinas de la primera suspensión en una segunda reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitados a una concentración final de entre 17% y 23% (v/v) a un pH de entre 6,8 y 7,6 y a una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; (e) resuspender las inmunoglobulinas presentes en el segundo precipitado, formando así una segunda suspensión; (f) precipitar las inmunoglobulinas de la segunda suspensión en una tercera reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitados a una concentración final de entre 14% y 20% (v/v) a un pH de entre 5,0 y 5,8 y a una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; (g) precipitar las inmunoglobulinas del tercer sobrenadante en una cuarta reacción de precipitación mezclando etanol con la fracción de plasma pobre en crioprecipitados a una concentración final de entre 22% y 28% (v/v) a un pH de

entre 6,7 y 7,5 y a una temperatura de entre -8°C y -2°C, formando así un cuarto precipitado y un cuarto sobrenadante; (h) resuspender el cuarto precipitado para formar una tercera suspensión; (i) poner la tercera suspensión en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y por lo menos una entre: (i) una fracción de FXI y/o FXIa, y (ii) una primera cantidad de actividad anti-complemento (ACA), a la resina de intercambio catiónico; (j) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción de cabeza y una porción de estabilización; y (k) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato. En una forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización específica, el pH de la primera solución es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH de la primera solución es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0. En otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 22 mS/cm. En aún otra forma de realización específica, la

solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm. En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. En una forma de realización específica, la resina de intercambio catiónico débil es una resina de carboximetilo (CM).

A. Esquema de fraccionamiento corriente arriba I

[0145] En un primer ejemplo de un esquema de purificación corriente arriba, se somete a un plasma que contiene inmunoglobulina IgG a fraccionamiento con alcohol (por ejemplo, fraccionamiento por etanol) como se describirá más adelante. En una forma de realización, este primer esquema de fraccionamiento corriente arriba incluye un paso de precipitación de la Fracción I+II+III, un paso de precipitación de la Fracción A y un paso de precipitación de la Fracción B antes del paso de precipitación de la Fracción II que finalmente provee el material de partida para los métodos de cromatografía de intercambio catiónico provistos en la presente para la reducción de actividad amidolítica (por ejemplo, Factor XI/XIa) y/o actividad anti-complemento (ACA).

[0146] Se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de condiciones de precipitación (por ejemplo, concentración de etanol, pH, temperatura, técnica de separación) para cada uno de los pasos de precipitación de la Fracción I+II+III, de la Fracción A, de la Fracción B y de la Fracción II descritos más adelante. Aún más, se contemplan métodos que comprenden todas las combinaciones de las condiciones de precipitación específicas con todos los posibles esquemas para definir y recolectar la porción de cabeza del eluato, como se describirá más adelante.

1. Precipitación de la Fracción I+II+III

[0147] En una forma de realización, la precipitación de la Fracción I+II+III se forma por adición de etanol a un plasma pobre en crioprecipitados a una concentración final de entre 17% y 23% (v/v) a un pH de entre 6,5 y 7,3. La mezcla se incuba luego bajo agitación a una temperatura de entre -8°C y -2°C. El precipitado resultante de la Fracción I+II+III se puede separar del sobrenadante de la Fracción I+II+III por centrifugación o filtración de la mezcla, que generalmente se efectúa en frío. La mayor parte del contenido de inmunoglobulinas está presente en el precipitado de la Fracción I+II+III, que se puede resuspender y enriquecer adicionalmente.

[0148] En una forma de realización específica, la concentración final de etanol en el paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 20 ± 3% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 20 ± 2% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 20 ± 1% (v/v). En aún otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 20% (v/v). En otra forma de realización adicional, la concentración final de etanol es de 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22% o 23% (v/v).

[0149] En una forma de realización específica, el pH del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 6,9 ± 0,4. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 6,9 ± 0,3. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 6,9 ± 0,2. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 6,9 ± 0,1. En aún otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 6,9. En aún otras formas de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2 ó 7,3.

[0150] En una forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de -5 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de -5 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de -5 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de -5°C. En aún otras formas de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I+II+III es de -8°C, -7°C, -6°C, -5°C, -4°C, -3°C o -2°C.

[0151] En una forma de realización específica, se ajusta el pH del plasma pobre en crioprecipitados en 6,9 ± 0,2 y se calcula que la concentración de alcohol es de un 20% (v/v) por la adición de una solución amortiguadora de resuspensión que contiene acetato de sodio trihidrato, ácido acético glacial y agua para inyecciones (pH 4,0) y alcohol etílico desnaturalizado (fórmula SDA-3A). La solución amortiguadora se agrega con la cantidad requerida de alcohol bajo mezclado exhaustivo. El alcohol se enfría hasta una temperatura de -15°C o más frío antes de su adición al plasma pobre en crioprecipitados. La solución amortiguadora y el alcohol se agregan al plasma mientras el tanque de suspensión se enfría hasta una temperatura de -5 ± 2°C. Después de haber completado la adición, se verifica el pH de la solución y se ajusta en 6,9 ± 0,2, si fuera necesario con una solución amortiguadora de pH 4,0 o una solución de bicarbonato de sodio. La suspensión resultante de la Fracción I+II+III se centrifuga luego para separar el precipitado del sobrenadante.

2. Precipitación de la Fracción A

[0152] Para un enriquecimiento mayor en contenido y pureza de IgG, en

una forma de realización, se resuspende un precipitado de la Fracción I+II+III y se conduce un segundo paso de precipitación (precipitación de la Fracción A). La precipitación de la Fracción A tiene lugar por adición de etanol a la suspensión de la Fracción I+II+III a una concentración final de entre 17% y 23% (v/v) a un pH de entre 6,8 y 7,6. La mezcla se incuba luego bajo agitación a una temperatura de entre -8°C y -2°C. El precipitado resultante de la Fracción A se puede separar del sobrenadante de la Fracción A por centrifugación o filtración de la mezcla, que generalmente se efectúa en frío. La mayor parte del contenido de inmunoglobulinas está presente en el precipitado de la Fracción A, que se puede resuspender y enriquecer adicionalmente.

[0153] En una forma de realización específica, la concentración final de etanol en el paso de precipitación de la Fracción A es de 20 ± 3% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 20 ± 2% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 20 ± 1% (v/v). En aún otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 20% (v/v). En otra forma de realización adicional, la concentración final de etanol es de 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22% o 23% (v/v).

[0154] En una forma de realización específica, el pH del paso de precipitación de la Fracción A es de 7,2 ± 0,4. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción A es de 7,2 ± 0,3. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción A es de 7,2 ± 0,2. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción A es de 7,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción A es de 7,2. En aún otras formas de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción A es de 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3,

7,4, 7,5 ó 7,6.

[0155] En una forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5°C. En aún otras formas de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -8°C, -7°C, -6°C, -5°C, -4°C, -3°C o -2°C.

[0156] En una forma de realización específica, el precipitado de la Fracción I+II+III se suspende en solución amortiguadora de resuspensión fría que contiene acetato de sodio trihidrato, ácido acético glacial y agua para inyecciones (pH 4,0) y se mezcla. La suspensión se diluye con WFI para obtener una concentración de proteínas calculada de 1,0 ± 0,3% (p/v). La agitación se continúa hasta que la suspensión sea homogénea. La solución se ajusta en un valor de pH de 7,2 ± 0,2 con solución amortiguadora (pH 4,0) o con fosfato disódico 0,25 M y se lleva a la concentración de alcohol calculada de 20% (v/v). El alcohol se enfría hasta una temperatura de -15°C o más frío antes de su adición a la solución. El alcohol frío se agrega mientras el tanque se enfría a -5 ± 2°C. Una vez completada la adición, se verifica el pH de la suspensión y se ajusta en 7,2 ± 0,2, si fuera necesario. El precipitado formado (denominado precipitado de la Fracción A) se filtra luego para separar el precipitado del sobrenadante.

3. Precipitación de la Fracción B

[0157] Para un enriquecimiento mayor en contenido y pureza de IgG, en

una forma de realización, se resuspende un precipitado de la Fracción A y se conduce un tercer paso de precipitación (precipitación de la Fracción B). La precipitación de la Fracción B tiene lugar por adición de etanol a la suspensión de la Fracción A a una concentración final de entre 14% y 20% (v/v) a un pH de entre 5,0 y 5,8. La mezcla se incuba luego bajo agitación a una temperatura de entre -8°C y -2°C. El precipitado resultante de la Fracción B se puede separar del sobrenadante de la Fracción B por centrifugación o filtración de la mezcla, que generalmente se efectúa en frío. La mayor parte del contenido de inmunoglobulinas está presente en el sobrenadante de la Fracción B, que se puede recuperar y enriquecer adicionalmente.

[0158] En una forma de realización específica, la concentración final de etanol en el paso de precipitación de la Fracción B es de 17 ± 3% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 17 ± 2% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 17 ± 1% (v/v). En aún otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 17% (v/v). En otra forma de realización adicional, la concentración final de etanol es de 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% o 20% (v/v).

[0159] En una forma de realización específica, el pH del paso de precipitación de la Fracción B es de 5,4 ± 0,4. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción B es de 5,4 ± 0,3. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción B es de 5,4 ± 0,2. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción B es de 5,4 ± 0,1. En aún otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción B es de 5,4. En aún otras formas de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción B es de 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5,

5,6, 5,7 ó 5,8.

[0160] En una forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -5°C. En aún otras formas de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción A es de -8°C, -7°C, -6°C, -5°C, -4°C, -3°C o -2°C.

[0161] En una forma de realización específica, el precipitado de la Fracción A se suspende en agua para inyecciones (WFI) fría y se agita por al menos una hora. Cuando el precipitado es exhaustivamente suspendido, se agrega una solución amortiguadora que contiene acetato de sodio. La agitación se continúa hasta que la suspensión sea homogénea. El pH se ajusta en 5,4 ± 0,2 con solución amortiguadora de pH 4,0 (109 g/l de acetato de sodio trihidrato, 240 g/l de ácido acético glacial y WFI) o fosfato disódico 0,25 M. La suspensión se diluye con WFI fría calculada para obtener una concentración de proteínas de 1,2 ± 0,3% (p/v). La agitación se continúa hasta que la suspensión sea homogénea. El contenido de alcohol se lleva a una concentración calculada en 17% (v/v) por adición de alcohol pre-enfriado a -15°C o menos. El alcohol frío se agrega mientras el tanque se enfría a –5 ± 2°C. Si fuera necesario, el pH se reajusta en 5,4 ± 0,2 con solución amortiguadora de pH 4,0 o fosfato disódico 0,25 M. El precipitado formado, el precipitado de la Fracción B, se separa por filtración usando un filtro de profundidad. El filtrado de la Fracción B (es decir, el sobrenadante) se

recupera para un enriquecimiento adicional.

B. Esquema de fraccionamiento corriente arriba II

[0162] En un segundo ejemplo de un esquema de purificación corriente arriba, se somete a un plasma que contiene inmunoglobulina IgG a fraccionamiento con alcohol (por ejemplo, fraccionamiento por etanol) como se describirá más adelante. En una forma de realización, este primer esquema de fraccionamiento corriente arriba incluye un paso de precipitación de la Fracción I y un paso de precipitación de la Fracción II+III antes del paso de precipitación de la Fracción II que finalmente provee el material de partida para los métodos de cromatografía de intercambio catiónico provistos en la presente para la reducción de actividad amidolítica (por ejemplo, Factor XI/XIa) y/o actividad anti-complemento (ACA).

[0163] Se contemplan métodos que contienen todas las combinaciones de condiciones de precipitación (por ejemplo, concentración de etanol, pH, temperatura, técnica de separación) para cada uno de los pasos de precipitación de la Fracción I, de la Fracción +II+III y de la Fracción II descritos más adelante. Aún más, se contemplan métodos que comprenden todas las combinaciones de las condiciones de precipitación específicas con todos los posibles esquemas para definir y recolectar la porción de cabeza del eluato, como se describirá más adelante.

1. Precipitación de la Fracción I

[0164] En una forma de realización, la precipitación de la Fracción I se forma por adición de etanol a un plasma pobre en crioprecipitados a una concentración final de entre 6% y 10% (v/v) a un pH de entre 6,7 y 7,3. La mezcla se incuba luego bajo agitación a una temperatura de entre -4°C y 2°C.

El precipitado resultante de la Fracción I se puede separar del sobrenadante de la Fracción I por centrifugación o filtración de la mezcla, que generalmente se efectúa en frío. La mayor parte del contenido de inmunoglobulinas está presente en el sobrenadante de la Fracción I, que se puede recuperar y enriquecer adicionalmente.

[0165] En una forma de realización específica, la concentración final de etanol en el paso de precipitación de la Fracción I es de 8 ± 2% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 8 ± 1% (v/v). En aún otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 8% (v/v). En otra forma de realización adicional, la concentración final de etanol es de 6%, 7%, 8%, 9% o 10% (v/v).

[0166] En una forma de realización específica, el pH del paso de precipitación de la Fracción I es de 7,0 ± 0,4. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I es de 7,0 ± 0,3. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I es de 7,0 ± 0,2. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I es de 7,0 ± 0,1. En aún otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I es de 7,0. En aún otras formas de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción I es de 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2 ó 7,3.

[0167] En una forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I es de -1 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I es de -1 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I es de -1 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I es de -1°C. En aún otras formas de

realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción I es de -4°C, -3°C, -2°C, -1°C, 0°C, 1°C o 2°C.

[0168] En una forma de realización específica, el plasma pobre en crioprecipitados se ajusta en un valor de pH de 7,0 ± 0,1 y a una concentración de alcohol calculada del 8% (v/v). Las soluciones usadas para ajustar el pH y las concentraciones de alcohol se agregan bajo mezclado exhaustivo. Se disminuye la temperatura de la reacción de precipitación y se mantiene en -1 ± 1°C. La suspensión de la Fracción I resultante se centrifuga o filtra luego para separar el precipitado del sobrenadante.

2. Precipitación de la Fracción II+III

[0169] Para un enriquecimiento adicional del contenido y la pureza de IgG, en una forma de realización se usa un sobrenadante de la Fracción I como material para un segundo paso de precipitación (precipitación de la Fracción II+III). La precipitación de la Fracción II+III tiene lugar por adición de etanol al sobrenadante de la Fracción I a una concentración final de entre 22% y 28% (v/v) a un pH de entre 6,7 y 7,3. La mezcla se incuba luego bajo agitación a una temperatura de entre -10°C y -4°C. El precipitado resultante de la Fracción II+III se puede separar del sobrenadante de la Fracción II+III por centrifugación o filtración de la mezcla, que generalmente se efectúa en frío. La mayor parte del contenido de inmunoglobulinas está presente en el precipitado de la Fracción II+III, que se puede resuspender y enriquecer adicionalmente.

[0170] En una forma de realización específica, la concentración final de etanol en el paso de precipitación de la Fracción II+III es de 25 ± 3% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 25 ± 2% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 25 ± 1%

(v/v). En aún otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 25% (v/v). En otra forma de realización adicional, la concentración final de etanol es de 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27% o 28% (v/v).

[0171] En una forma de realización específica, el pH del paso de precipitación de la Fracción II+III es de 7,0 ± 0,4. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II+III es de 7,0 ± 0,3. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II+III es de 7,0 ± 0,2. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II+III es de 7,0 ± 0,1. En aún otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II+III es de 7,0. En aún otras formas de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II+III es de 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3 ó 7,4.

[0172] En una forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II+III es de -7 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II+III es de -7 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II+III es de -7 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II+III es de -7°C. En aún otras formas de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II+III es de -10°C, -9°C, -8°C, -7°C, -6°C, -5°C o -4°C.

[0173] En una forma de realización específica, el sobrenadante de la Fracción I se ajusta en un valor de pH de 7,0 ± 0,1 y a una concentración de alcohol calculada del 25% (v/v). Las soluciones usadas para ajustar el pH y las concentraciones de alcohol se agregan bajo mezclado exhaustivo. Se disminuye la temperatura de la reacción de precipitación y se mantiene en -6 ±

2°C. La suspensión de la Fracción II+III resultante se centrifuga o filtra luego para separar el precipitado del sobrenadante.

C. Precipitación de la Fracción II

[0174] Para un enriquecimiento adicional en contenido y pureza de IgG, en una forma de realización, se conduce un cuarto (según el esquema de fraccionamiento corriente arriba I) o tercer (según el esquema de fraccionamiento corriente arriba II) paso de precipitación por alcohol (precipitación de la Fracción II). La precipitación de la Fracción II se efectúa ajustando el pH de un filtrado de la Fracción B o una suspensión del precipitado de la Fracción II+III a un valor entre 6,7 y 7,5 y agregando etanol a una concentración final de entre 22% y 28% (v/v). La mezcla se incuba luego bajo agitación a una temperatura de entre -13°C y -2°C. El precipitado resultante de la Fracción II se puede separar del sobrenadante de la Fracción B por centrifugación o filtración de la mezcla, que generalmente se efectúa en frío. La mayor parte del contenido de inmunoglobulinas está presente en el precipitado de la Fracción II, que se puede resuspender y enriquecer adicionalmente.

[0175] En una forma de realización específica, la concentración final de etanol en el paso de precipitación de la Fracción II es de 25 ± 3% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 25 ± 2% (v/v). En otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 25 ± 1% (v/v). En aún otra forma de realización, la concentración final de etanol es de 25% (v/v). En otra forma de realización adicional, la concentración final de etanol es de 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27% o 28% (v/v).

[0176] En una forma de realización específica, el pH del paso de

precipitación de la Fracción II es de 7,1 ± 0,4. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II es de 7,1 ± 0,3. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II es de 7,1 ± 0,2. En otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II es de 7,1 ± 0,1. En aún otra forma de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II es de 7,1. En aún otras formas de realización, el pH del paso de precipitación de la Fracción II es de 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 ó 7,5.

[0177] En una forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -5 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -5 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -5 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -5°C. En otra forma de realización específica, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -10 ± 3°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -10 ± 2°C. En otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -10 ± 1°C. En aún otra forma de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -10°C. En aún otras formas de realización, la temperatura del paso de precipitación de la Fracción II es de -13, -12, -11, -10, -9, -8°C, -7°C, -6°C, -5°C, -4°C, -3°C o -2°C.

[0178] En una forma de realización específica, el pH del filtrado de la Fracción B se ajusta en 7,1 ± 0,2 usando una solución 1,0 M de bicarbonato de sodio. Se agrega alcohol adicional con mezclado para llevar la concentración calculada a 25% (v/v). El pH se verifica y se reajusta, si fuera necesario, en 7,3

± 0,2 usando bicarbonato de sodio 1 M o solución amortiguadora de pH 4,0. La suspensión se agita por al menos dos horas a una temperatura de -5 ± 2°C después de completar la adición del alcohol. Una vez completada la agitación, el pH se reajusta en 7,3 ± 0,2, si fuera necesario. La suspensión se centrifuga y se separa el precipitado, el precipitado de la Fracción II.

D. Cromatografía de intercambio catiónico

[0179] Para un enriquecimiento adicional de la composición de inmunoglobulinas, en una forma de realización se puede resuspender un precipitado de la Fracción II en agua o en una solución amortiguadora de fuerza iónica baja y luego se puede someter a cromatografía de intercambio catiónico. En una forma de realización, el precipitado de la Fracción II se resuspende en agua o solución amortiguadora de baja fuerza iónica a un pH inferior a 6,0. Típicamente, el pH del precipitado de la Fracción II en resuspensión es de 5,2 ± 0,2 y la conductividad de la suspensión es baja, típicamente de no más de 1 mS/cm. La suspensión de la Fracción II se filtra luego para eliminar el material no solubilizado antes de cargarla sobre una resina de intercambio catiónico, equilibrada a un pH inferior a 6,0. Después de cargar las inmunoglobulinas sobre la resina de intercambio catiónico (por ejemplo, una columna de intercambio catiónico), la resina se puede lavar con una solución amortiguadora de lavado que tiene un pH inferior a 6,0. Para eluir las inmunoglobulinas, la resina de intercambio catiónico se pone en contacto luego con una solución amortiguadora de elución que tiene una conductividad de por lo menos 15 mS/cm (por ejemplo, con una concentración de sales de por lo menos 150 mM de NaCl o una sal equivalente) y un pH mayor que 7,0. En una forma de realización específica, el precipitado de la Fracción II en

suspensión es sometido a tratamiento con un solvente y detergente (S/D) antes de conducir la cromatografía de intercambio catiónico. Aunque se usa un precipitado de la Fracción II resuspendido del ejemplo de esquema de fraccionamiento descrito en la presente como material de partida para los métodos de intercambio catiónico provistos en la presente, se podrá apreciar que se puede utilizar cualquier composición de inmunoglobulinas derivada de plasma (es decir, fracción) que contiene inmunoglobulinas IgG y actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) y/o actividad anti-complemento (ACA) en los métodos provistos en la presente.

[0180] Se ha encontrado que los niveles altos de actividad amidolítica (por ejemplo, FXI y/o FXIa) y/o de actividad anti-complemento (ACA) co-eluyen con IgG de la resina de intercambio catiónico. La incapacidad para separar cantidades significativas de estas impurezas de las inmunoglobulinas deseadas da como resultado una composición final de IgG con una gran actividad amidolítica y/o una gran actividad anti-complemento. Dado el mayor riesgo de eventos tromboembólicos que han sido atribuidos a una gran actividad amidolítica en las preparaciones farmacéuticas de inmunoglobulinas, y las reacciones adversas que se han asociado con una actividad anti-complemento, persiste la necesidad en el campo de la eliminación de impurezas que contribuyan a la actividad amidolítica (por ejemplo, FXI/FXIa) y/o a la actividad anti-complemento (ACA) presente en muchos productos de IgG. Ventajosamente, se ha encontrado que cuando se usa una solución amortiguadora que tiene un pH superior a 7,0 para eluir inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico, la actividad amidolítica y la actividad anti-complemento (ACA) solamente eluye en la porción de estabilización del eluato.

Notablemente, la elución de actividad amidolítica y ACA en la porción de estabilización del eluato se corresponde con un cambio en el pH del eluato, desde menos de 6,0 hasta por encima de 7,0. Como tal, la porción de cabeza del eluato contiene una gran concentración de inmunoglobulinas y una baja concentración de actividad amidolítica y ACA, en tanto la porción de estabilización del eluato tiene una menor concentración de inmunoglobulina y una mayor actividad amidolítica y ACA. Por lo tanto, en formas de realización preferidas de los métodos provistos en la presente, la porción de cabeza del eluato de intercambio catiónico se recolecta separadamente de la porción de estabilización del eluato.

[0181] En determinadas formas de realización, la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil. Los ejemplos de resinas de intercambio catiónico débiles incluyen aquellas con un ligando de ácido carboxílico, por ejemplo, resinas de carboximetilo (CM). En una forma de realización preferida, la resina de intercambio catiónico usada en los métodos provistos en la presente es una resina de carboximetilo, por ejemplo, CM-Sepharose.

[0182] En una forma de realización, el precipitado de la Fracción II se resuspende con agua fría o una solución amortiguadora de baja fuerza iónica a un pH de entre 4,8 y 5,6. En una forma de realización específica, el pH del agua o de la solución amortiguadora usada para la resuspensión es de 5,2 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH del agua o de la solución amortiguadora usada para la resuspensión es de 5,2 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH del agua o de la solución amortiguadora usada para la resuspensión es de 5,2 ± 0,1. En aún otra forma de realización

específica, el pH del agua o de la solución amortiguadora usada para la resuspensión es de 5,2. En aún otras formas de realización, el pH del agua o de la solución amortiguadora usada para la resuspensión es de 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0.

[0183] En una forma de realización, la resina de intercambio catiónico se pre-equilibra en un valor de pH de entre 4,6 y 5,6. En una forma de realización específica, la resina se pre-equilibra en un valor de pH de entre 4,6 y 5,5. En otra forma de realización específica, la resina se pre-equilibra a un pH de 5,0 ± 0,4. En otra forma de realización específica, la resina se pre-equilibra a un pH de 5,0 ± 0,3. En otra forma de realización específica, la resina se pre-equilibra a un pH de 5,0 ± 0,2. En otra forma de realización específica, la resina se pre-equilibra a un pH de 5,0 ± 0,1. En otra forma de realización específica, la resina se pre-equilibra a un pH de 5,0 ± 0,4. En aún otras formas de realización, la resina se pre-equilibra a un pH de 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 ó 6,0.

[0184] En una forma de realización, después de cargar una suspensión clarificada de la Fracción II sobre la resina de intercambio catiónico, la resina se lava con una solución amortiguadora que tiene una conductividad suficientemente baja de modo que las inmunoglobulinas no eluyen de la resina y un pH de entre 5,1 y 5,9. En una forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5 ± 0,1. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,5. En aún otras formas de

realización, el pH de la solución amortiguadora de lavado es de 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, o 6,0.

[0185] En una forma de realización, el pH de la solución amortiguadora de elución es mayor que 7,5. En otra forma de realización, el pH de la solución amortiguadora de elución es de entre 7,4 y 8,2. En una forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,3. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,2. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8 ± 0,1. En otra forma de realización específica, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,8. En aún otras formas de realización, el pH de la solución amortiguadora de elución es de 7,0, 7,1, 7,2, 7,36, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 ú 8,5.

[0186] En una forma de realización específica, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de por lo menos 10 mS/cm. En una forma de realización preferida, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de por lo menos 15 mS/cm. En otra forma de realización preferida, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de por lo menos 20 mS/cm. En una forma de realización específica, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de entre 10 mS/cm y 40 mS/cm. En otra forma de realización, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de entre 15 mS/cm y 30 mS/cm. En otra forma de realización, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de entre 20 mS/cm y 30 mS/cm. En otra forma de realización, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de entre 25 mS/cm y 30 mS/cm. En aún otras

formas de realización, la conductividad de la solución amortiguadora de elución es de aproximadamente 5 mS/cm, o de aproximadamente 6 mS/cm, 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17 mS/cm, 18 mS/cm, 19 mS/cm, 20 mS/cm, 21 mS/cm, 22 mS/cm, 23 mS/cm, 24 mS/cm, 25 mS/cm, 26 mS/cm, 27 mS/cm, 28 mS/cm, 29 mS/cm, 30 mS/cm, 31 mS/cm, 32 mS/cm, 33 mS/cm, 34 mS/cm, 35 mS/cm, 36 mS/cm, 37 mS/cm, 38 mS/cm, 39 mS/cm, 40 mS/cm o mayor.

[0187] En una forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 80% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 80% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 70% y 75% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 75% y 80% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79% u 80% del eluato total.

[0188] En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 70% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende

entre un 50% y 70% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 60% y 65% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 65% y 70% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69% u 70% del eluato total.

[0189] En otra forma de realización, la porción de cabeza (es decir, la fracción recolectada o agrupada de interés) del eluato no comprende más que un 60% del eluato total. En una forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 60% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 50% y 55% del eluato total. En otra forma de realización específica, la porción de cabeza del eluato comprende entre un 55% y 60% del eluato total. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato comprende un 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59% u 60% del eluato total.

[0190] En otra forma de realización, las porciones de cabeza y de estabilización del eluato se definen por el pH de la solución. En una forma de realización, la porción de cabeza es el eluato con un pH no mayor que 7,0. En otra forma de realización, la porción de cabeza es el eluato con un pH no mayor que 6,5. En otra forma de realización, la porción de cabeza es el eluato con un pH no mayor que 6,0. En otra forma de realización, la porción de cabeza es el eluato con un pH no mayor que 5,5. En otra forma de realización, la porción de cabeza es el eluato con un pH no mayor que 5,0. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza es el eluato con un pH no mayor

que 7,0, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6,0, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0 o menos.

[0191] En una forma de realización, la porción de cabeza del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del punto en el cual la DO_{280} del eluato cae por debajo de 2,0 AU. En otra forma de realización, la porción de cabeza del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del punto en el cual la DO_{280} del eluato cae por debajo de 1,5 AU. En otra forma de realización, la porción de cabeza del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del punto en el cual la DO_{280} del eluato cae por debajo de 1,0 AU. En otra forma de realización, la porción de cabeza del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del punto en el cual la DO_{280} del eluato cae por debajo de 0,5 AU. En aún otras formas de realización, la porción de cabeza del eluato se define como la fracción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico antes del punto en el cual la DO_{280} del eluato cae por debajo de 2,0 AU, 1,9 AU, 1,8 AU, 1,7 AU, 1,6 AU, 1,5 AU, 1,4 AU, 1,3 AU, 1,2 AU, 1,1 AU, 1,0 AU, 0,9 AU, 0,8 AU, 0,7 AU, 0,6 AU, 0,5 AU, 0,4 AU, 0,3 AU, 0,2 AU, 0,1 AU o menos. En determinadas formas de realización, la porción de cabeza del eluato se define además como la porción del eluato que eluye de la resina de intercambio catiónico después que la DO_{280} del eluato se eleva por encima de un umbral, por ejemplo, de 0,1 AU, 0,2 AU, 0,3 AU, 0,4 AU, 0,5 AU, 0,6 AU, 0,7 AU, 0,8 AU, 0,9 AU, 1,0 AU, 1,1 AU, 1,2 AU, 1,3 AU, 1,4 AU, 1,5 AU, 1,6 AU, 1,7 AU, 1,8 AU, 1,9 AU, 2,0 AU o más.

E. Ultrafiltración/Diafiltración (UF/DF)

[0192] Las composiciones de IgG se pueden concentrar además por ultrafiltración/diafiltración. En una forma de realización, la composición de IgG se puede concentrar por ultrafiltración hasta una concentración de proteínas de entre 2% y 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 menos kDa. En una forma de realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO no mayor que 50 kDa.

[0193] Como se describe en la publicación de Patente de los EE.UU. N°: 2010/0330071, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad a modo de referencia para todo fin, se puede usar una membrana de canales abiertos con un post-lavado y formulación cercana al final del proceso de producción diseñado específicamente para duplicar aproximadamente en las composiciones resultantes de IgG la concentración de proteínas (200 mg/ml) en comparación con las IVIGs del arte (por ejemplo, GAMMAGARD® LIQUID) sin afectar el rendimiento y la capacidad de almacenamiento. La mayoría de las membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente no permiten obtener 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.

[0194] Una vez completado 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 agente estabilizante y amortiguador es glicina a una concentración apropiada, por ejemplo de entre 0,20 M y 0,30 M, o entre 0,22 M y 0,28 M, o entre 0,24 M y 0,26 mM, o a una concentración de 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, la solución amortiguadora de diafiltración contiene glicina 0,25 M.

[0195] Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 3 veces el volumen del concentrado original, o al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más veces el volumen del concentrado original. La solución de IgG se puede concentrar hasta una concentración final de proteínas de entre 3% y 25% (p/v), o entre 3% y 7%, o entre 6% y 18% (p/v), o entre 7% y 16% (p/v), o entre 8% y 14% (p/v), o entre 9% y 12%, o hasta una concentración final de 5% o 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% o mayor. En una forma de realización, se logra una concentración final de proteínas de por lo menos un 23% sin agregar la fracción de post-lavado a la solución concentrada. En otra forma de

realización, se logra una concentración final de proteínas de por lo menos un 24% sin agregar la fracción de post-lavado a la solución concentrada. En aún otra forma de realización, se logra una concentración final de proteínas de por lo menos un 25% sin agregar la fracción de post-lavado a la solución concentrada. Típicamente, al final del proceso de concentración, el pH de la solución será de aproximadamente entre 4,6 y 5,1.

[0196] En un ejemplo de forma de realización, el pH de la composición de IgG se ajusta en 5,2 ± 0,2 usando ácido clorhídrico 1 M y se concentra hasta 5 ± 1 g % de proteínas por ultra-filtración (100 kDa o menos de límite de corte del peso molecular nominal). El concentrado es sometido luego a dia-filtración con una solución de dia-filtración (NaCl 0,02 M, PEG 0,05% (p/v)). El dia-filtrado se enfría a 5 ± 2°C. La concentración de solución amortiguadora-Tris de la solución se ajusta en 0,025 M usando Tris 2,0 M y el pH se vuelve a ajustar en 7,8 ± 0,2.

F. Cromatografía de intercambio aniónico

[0197] En una forma de realización, la proteína se carga luego sobre una columna equilibrada de flujo rápido ANX Sepharose® 4 para eliminar los contaminantes derivados de plasma. Una vez completada la carga, la columna se lava con solución amortiguadora de equilibrio (Tris 25 mM, NaCl 20 mM, pH 7,8 ±0,2). Se agrupa la parte eluída (solución de IgG) de la columna de los pasos de carga y lavado.

G. Inactivación y/o eliminación de virus

[0198] En determinadas formas de realización, los métodos provistos en la presente para la preparación de una composición enriquecida en inmunoglobulinas incluirá además por lo menos uno, preferentemente por lo

menos dos, más preferentemente por lo menos tres, pasos de inactivación o eliminación viral. 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).

[0199] Los pasos de inactivación o eliminación viral se pueden realizar con cualquier fracción intermedio de inmunoglobulina generada durante el proceso de elaboración. Por ejemplo, en una forma de realización, el paso de inactivación o eliminación viral se puede realizar con una suspensión de la Fracción I+II+III, una suspensión de la Fracción A, un filtrado de la Fracción B, una suspensión de la Fracción II, un eluato de intercambio catiónico, un eluato de intercambio aniónico y semejantes.

[0200] En una forma de realización, el paso de inactivación o eliminación viral se realiza con una suspensión de la Fracción II. En una forma de realización preferida, la suspensión de la Fracción II es sometida a un tratamiento con solvente y detergente (S/D).

1. Tratamiento con solvente/detergente (S/D)

[0201] Con el fin de inactivar los diversos contaminantes virales que

pudieran estar presentes en los productos derivados del plasma, se somete uno o más intermediarios de elaboración de inmunoglobulina a un tratamiento con solvente-detergente (S/D). En una forma de realización preferida, se resuspended un precipitado de la Fracción II y se trata con S/D. Los métodos para tratar fracciones derivadas del plasma con detergentes son conocidos en la técnica (puede hallarse una revisión en Pelletier JP *et al.*, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(1): 205-42). En general, se podrá usar cualquier tratamiento con S/D convencional en combinación con los métodos que se proveen en la presente. Por ejemplo, a continuación se provee un ejemplo de un protocolo para un tratamiento con S/D.

[0202] En resumen, se agrega Triton X-100, Tween-20 y tri(n-butil)fosfato (TNBP) al filtrado del PptG clarificado, en concentraciones finales de aproximadamente 1,0%, 0,3% y 0,3%, respectivamente. Luego se agita la mezcla a una temperatura de entre aproximadamente 18ºC y aproximadamente 25ºC durante al menos aproximadamente una hora.

[0203] En una forma de realización, los reactivos de S/D (por ejemplo, Triton X-100, Tween-20 y TNBP) se agregan por rociado en lugar de una adición en forma fluida. En otras formas de realización, los reactivos de detergente se pueden agregar como sólidos a la solución de intermediarios de inmunoglobulina, que se está mezclando para asegurar una distribución rápida de los componentes S/D. En determinadas formas de realización, es preferible agregar los reactivos sólidos esparciéndolos sobre un área superficial deslocalizada del filtrado, de modo que no haya una concentración local excesiva, como la que ocurre en la adición en forma fluida. En otra forma de realización, se efectúa una mejora del proceso bombeando una solución que

contiene inmunoglobulinas en un tanque donde los reactivos SD ya están presentes, ya sea en forma concentrada o diluida.

2. Nanofiltración

[0204] Con el fin de reducir aun más la carga viral de la composición de inmunoglobulinas que se provee en la presente, se puede someter una fracción de intermediarios de inmunoglobulina a una nanofiltración usando un dispositivo de nanofiltración apropiado. En determinadas formas de realización, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño promedio de poro de entre 15 nm y 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros apropiados para este uso incluyen, en un sentido no limitativo, 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 un tamaño de poro promedio de entre aproximadamente 15 nm y 72 nm, o de entre aproximadamente 19 nm y 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 del mismo.

[0205] Opcionalmente, la ultrafiltración/diafiltración puede realizarse para concentrar aún más el nanofiltrado. En una forma de realización, se usa una membrana de canales abiertos con un post-lavado y formulación cercanos al final del proceso de producción diseñado específicamente que dan como resultado una composición de inmunoglobulinas de gran concentración.

[0206] Después de la nanofiltración, el filtrado se puede concentrar aún más por ultrafiltración y/o la composición amortiguadora se puede ajustar por diafiltración. En una forma de realización, el nanofiltrado puede concentrarse

por ultrafiltración hasta obtener una concentración de proteínas de entre aproximadamente 0,5% 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 150 kDa o menor o igual a aproximadamente 140, 130, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o menos kDa. En una forma de realización, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO no mayor que 50 kDa.

3. Incubación a pH bajo

[0207] En determinadas formas de realización, se puede tratar una solución que contiene inmunoglobulinas para reducir o inactivar la carga viral de la composición. En una forma de realización, esto se logra ajustando el pH de la composición en un pH bajo, por ejemplo, menor o igual a aproximadamente 6,0, y con una posterior incubación durante por lo menos una semana aproximadamente antes de liberar la composición. En una forma de realización preferida, el pH de la solución a granel se ajusta a un valor menor o igual a aproximadamente 5,5 antes de la incubación. En una forma de realización más preferida, el pH de la solución se ajusta en un valor menor o igual a 5,0 antes de la incubación. En determinadas formas de realización, el pH de la solución se disminuye a un valor menor o igual a aproximadamente 6,0 o menor o igual a aproximadamente 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0 o menos antes de la incubación.

[0208] En determinadas formas de realización, la solución se incuba luego por al menos una semana, o por lo menos 2, 3, 4 o más semanas, o

durante por lo menos 1, 2, 3 o más meses. En formas de realización preferidas, la composición se incuba a una temperatura superior a 20°C o superior a 25°C o superior a 30°C. En formas de realización particulares, la composición se incuba a una temperatura de 20°C, o 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C o más.

4. Liofilización y tratamiento con calor

[0209] En aún otras formas de realización, la presente invención provee composiciones de inmunoglobulinas liofilizadas, que se liofilizaron de acuerdo con métodos conocidos en el arte. La actividad viral de estas composiciones liofilizadas, que pudieron haber pasado previamente por otro pasos de inactivación o eliminación viral tales como tratamiento con S/D o nanofiltración, se puede reducir aún más mediante tratamiento con calor de la composición liofilizada. Los tratamientos con calor para la inactivación de cargas virales en factores sanguíneos son bien conocidos en el arte (por ejemplo, véase, Piszkiewicz *et al.*, Thromb Res. julio de 1987, 15;47(2): 235-41; Piszkiewicz *et al.*, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989;(56): 44-54; Epstein y Fricke, Arch Pathol Lab Med., marzo de 1990; 114(3): 335-40).

H. Formulación

[0210] Una vez completado el paso de diafiltración , la concentración de proteínas de la solución se ajusta con la solución amortiguadora de diafiltración en una concentración final de entre aproximadamente 3% y aproximadamente 20% (p/v), o entre 3% y 7%, o entre aproximadamente 6% y aproximadamente 18% (p/v), o entre aproximadamente 7% y aproximadamente 16% (p/v), o entre aproximadamente 8% y aproximadamente 14% (p/v), o entre aproximadamente

9% y aproximadamente 12%, o en una concentración final de aproximadamente 5%, o 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% o mayor. En una forma de realización preferida, la concentración final de proteínas de la solución es de entre aproximadamente 9% y aproximadamente 11%, más preferiblemente de aproximadamente 10%.

[0211] La solución formulada en bruto también se esteriliza filtrándola a través de una membrana de filtro con poros con un tamaño absoluto no mayor que aproximadamente 0,22 micrones, por ejemplo, de aproximadamente 0,2 micrones. Después, la solución se coloca de manera aséptica en los recipientes finales para sellarla de manera apropiada, y se toman muestras para evaluarlas.

[0212] En una forma de realización, la concentración de la composición de IgG también se ajusta en aproximadamente 10,2 ± 0,2% (p/v) con el amortiguador de diafiltración. El pH se ajusta a un valor de entre aproximadamente 4,4 y aproximadamente 4,9, si fuera necesario. Finalmente, la solución se filtra en forma estéril y se incuba por tres semanas a aproximadamente 30°C.

[0213] En un ejemplo de una forma de realización, la solución de IgG resultante se estabiliza con NaCl (máximo de 0,15 M), glicina (máximo de 0,3 M), glucosa (máximo de 0,11 M) y albúmina humana (máximo de 3 mg/ml). El pH se ajusta en 7,0 ± 0,2 usando ácido clorhídrico 1 M. La solución se concentra luego por ultrafiltración hasta la concentración deseada y el pH se vuelve a ajustar en 7,15 ± 0,1 usando ácido clorhídrico 1 M o hidróxido de sodio 1 M. La solución a granel se filtra en forma estéril usando un filtro con un

tamaño de poro de 0,2 micrones o equivalente.

[0214] La solución estéril de IgG se puede disponer asépticamente en un recipiente, tapar para la liofilización, congelar, liofilizar, sellar bajo condiciones asépticas y tapar.

VIII. Ejemplos

[0215] Entre otras ventajas, los Ejemplos 1 a 7 demuestran que: (1) la elución por pasos de inmunoglobulinas de una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, CM-Sepharose) da como resultado una distribución bimodal de las proteínas, donde la actividad amidolítica (PL-1) eluye después de las IgG, permitiendo así eliminar la actividad amidolítica con una pérdida mínima del rendimiento de IgG; (2) la elución de la actividad amidolítica (PL-1) de la resina de intercambio catiónico (por ejemplo, CM-Sepharose) se correlaciona, y probablemente sea causada por, un cambio de pH en la columna CM durante la elución de acuerdo con los métodos provistos en la presente; (3) la cantidad de proteína cargada sobre una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, CM-Sepharose) no afecta la eliminación de la actividad amidolítica (PL-1) sobre un rango de por lo menos entre 60 y 120 mg de proteína por ml de resina; (4) el monitoreo del pH a la salida de la columna y la detención de la elución cuando se manifiesta el aumento conduce a una eliminación parcial de la actividad amidolítica (PL-1), probablemente porque ya se ha afectado el equilibrio del pH en la parte superior de la columna; (5) se puede reducir significativamente la actividad amidolítica con una pérdida mínima en el rendimiento de IgG (≤ 10%) por recolección de una agrupación de elución inicial menor que 3 CV; como tal, el monitoreo del volumen de un paso de elución con CM-Sepharose es un método simple para reducir significativamente la actividad amidolítica de una

composición de inmunoglobulinas preparada de acuerdo con los métodos provistos en la presente; y (6) por recolección del "primer pico" de un paso de elución de CM-Sepharose, se puede obtener una composición que tiene una menor concentración de agregados de IgG, una menor actividad PKA, una menor actividad PL-1, una mayor concentración de monómeros de IgG y una distribución más deseable de subclases de IgG.

[0216] Además, los Ejemplos 8 y 9 demuestran por lo menos que (1) las proteínas que causan FXIa y un TGA elevado se pueden separar por cromatografía CM partiendo la parte del último 25% del eluato; (2) las ventajas descritas previamente se pueden replicar en procesos de elaboración a gran escala; y (3) los eluatos de intercambio catiónico (es decir, CM-Sepharose) producidos en procesos de elaboración a gran escala se pueden agrupar monitoreando la DO, por ejemplo el eluato se puede recolectar en una primera agrupación hasta que la DO del eluato cae por debajo de 2,0, proporcionando así una separación significativa de las proteínas indeseadas que causan valores elevados de FXIa y TGA.

Ejemplo 1

[0217] Este ejemplo describe la distribución de indeseadas proteínas que causan niveles elevados de TGA, FXIa, y valores más bajos de NAPTT en una composición de la fracción II de inmunoglobulinas preparada de acuerdo con un fraccionamiento por alcohol modificado de Kistler-Nitschmann. Estas impurezas se pueden separar durante la elución de un paso de cromatografía de intercambio catiónico (por ejemplo, cromatografía de flujo rápido en CM Sepharose).

[0218] Este ejemplo demuestra una reducción significativa en el

contenido amidolítico (por ejemplo, FXI y/o FXIa) durante la elución de una cromatografía de intercambio catiónico. El método da como resultado un producto final de inmunoglobulinas que contiene significativamente menos actividad FXIa y TGA. Esta reducción se logra con un fraccionamiento específico del paso del eluato CM, que separa efectivamente la actividad amidolítica (presente en la porción de estabilización del eluato) de la fracción principal de IgG (que se encuentra en la porción de cabeza del eluato). Este ejemplo muestra que al dividir el eluato de intercambio catiónico en las porciones de cabeza y de estabilización, se separan las proteínas traza indeseables del volumen principal de contenido de IgG. Aún más, este ejemplo demostró que este proceso es efectivo y económicamente viable para una elaboración a gran escala.

[0219] Brevemente, el precipitado de la Fracción II se preparó de la siguiente manera. Después de la crio-precipitación del plasma humano agrupado, se formó un precipitado de la Fracción I+II+III por precipitación con alcohol 20% a pH 6,9. Después de resuspender el precipitado I+II+III, se agrega alcohol a una concentración final de 20% a pH de 7,2, para formar el precipitado A. La separación del precipitado A se efectuó por centrifugación. La Fracción I+III (también denominada precipitado de la suspensión B) se forma por precipitación de un precipitado A en suspensión con alcohol 17%. El precipitado se recupera por filtración o centrifugación. Luego se procesa el filtrado B en suspensión para formar la Fracción II, que contiene la fracción de proteínas plasmáticas de gamma globulina (por ejemplo, IgG) parcialmente purificadas.

[0220] Después se trata una suspensión clarificada de la Fracción II con

una mezcla de solvente-detergente (SD) y se carga sobre una columna ff CM Sepharose. Después de lavar los reactivos SD residuales, se eluye la fracción de IgG unida a la resina. A continuación, la solución de inmunoglobulinas se ultra-/diafiltra y luego se carga sobre un intercambiador aniónico para eliminar las impurezas traza. Después de otro paso de concentración a la formulación final le puede seguir una liofilización.

[0221] El precipitado de la Fracción II se disolvió luego en agua fría a 4°C y pH 5,2 ± 0,2. Después de una clarificación por filtración CWSS, la solución se ajustó para el tratamiento SD. La concentración de proteínas se ajustó en 2% y la temperatura durante la incubación SD se mantuvo en el rango de entre 20°C y 25°C. La solución de proteínas se cargó luego sobre una columna de flujo rápido CM-Sepharose equilibrada (solución amortiguadora de equilibrio: acetato de sodio 0,025 M, pH 5,0 ± 0,2). Después de la carga, la columna se lavó con 30 volúmenes de columna de solución amortiguadora de acetato (acetato de sodio 0,01 M. pH 5,5 ± 0,2), para lavar los reactivos SD, antes de eluir la proteína adsorbida con solución amortiguadora de elución (NaCl 0,25 M, glicina 0,2 M, PEG 3350 0,1%, Tris 25 mM, pH 8,00). La recolección de la primera parte del eluato (E1) comenzó a una DO de 400 mAU y se detuvo después de exactamente 2,7 volúmenes de columna (Figura 1). La segunda fracción (E2) del pico de elución se recolectó cuando la DO cayó nuevamente a 400 mAU. Las fracciones eluidas se procesaron luego por separado por el resto del proceso.

[0222] Después se ajustaron las composiciones E1 y E2 en pH de 5,2 y se ultra-/diafiltraron contra solución amortiguadora de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 0,05%) para concentrarlas hasta un 5% de proteínas (p/v). Se

agregó Tris 0,025 M a las composiciones y el pH se ajustó en 7,7. Las Fracciones de IgG se cargaron luego sobre una columna equilibrada de flujo rápido ANX-Sepharose que fue equilibrada con solución amortiguadora (Tris 0,025 M, NaCl 0,02 M, pH 7,7). El eluato ANX resultante se recolectó y se suplementó con NaCl 8,5 g/l, glicina 16,5 g/l, glucosa anhídrida 21,7 g/l y albúmina 1 g/l (20%). Luego se ajustó el pH y las composiciones E1 y E2 se concentraron a 10% (p/v) de proteína por ultrafiltración. Después de la concentración, las soluciones concentradas se suplementan nuevamente con NaCl y glicina (pero no albúmina) y el pH se ajusta en 7,1, si fuera necesario, antes de la filtración estéril.

[0223] En la Figura 1 se provee una cromatografía que muestra la absorbancia (mAU), conductividad y el pH del paso de cromatografía. Como se puede observar, la elución en un solo paso con la solución amortiguadora de elución descrita previamente da como resultado a la elución de dos picos. Notablemente, con la adición de la solución amortiguadora de elución, el pH del eluato cae significativamente a medida que el primer pico sale de la columna, y luego aumenta marcadamente con la elución del segundo pico. Según se describe, los picos de elución se separaron por recolección de 2,7 volúmenes de columna en una primera fracción E1 (a la izquierda de la línea vertical que se muestra en la Figura 1) y una segunda fracción (a la derecha de la línea vertical que se muestra en la Figura 1).

[0224] Las fracciones eluidas (E1 y E2) se procesaron luego por separado para producir una preparación final de inmunoglobulinas, como se describirá más adelante. Para tal fin, se ajustó el pH de las Fracciones E1 y E2 en 5,2 y las muestras se diafiltraron contra solución amortiguadora de

diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 0,05%) para concentrar la composición en una concentración final de proteínas del 5%. Después de la diafiltración, se agregó Tris 0,025 M a cada solución de proteínas y el pH se ajustó en 7,7. Las fracciones de IgG se cargaron luego sobre una columna equilibrada de flujo rápido ANX-Sepharose (solución amortiguadora de equilibrio de Tris 0,025 M, NaCl 0,02 M pH 7,7) y se recolectó la fracción de eluato. El eluato ANX se suplementó luego con NaCl 8,5 g/l, glicina 16,5 g/l, glucosa anhídrida 21,7 g/l y albúmina 1 g/l (20%). El pH de la solución se ajusta luego en 7,00 y la muestra de inmunoglobulinas se concentra hasta 10% de proteínas por ultrafiltración. Después de la concentración, se agrega nuevamente NaCl, glicina y glucosa anhídrida y el pH se ajusta en 7,1, si fuera necesario, antes de la filtración estéril.

[0225] Para caracterizar el paso cromatográfico, se determinó el balance de masas, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1, Balance de masas del paso de enriquecimiento cromatográfico-CM. Prácticamente un 10% de las proteínas totales se encontró en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento que tiene lugar cuando la composición agrupada se detiene después de 2,7 volúmenes de columna de eluato.

Tabla 1. Balance de masas del paso de enriquecimiento cromatográfico-CM.

	TPUV (%)	Proteínas (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
IFracción II dis..	6,99	150,07	100,00	3,93
CWSS	6,33	149,74	99,78	3,92
CM E1	2,97	136,27	90,80	3,57
CM E2	1,04	16,40	10,93	0,43
E1 ANX D/N	2,56	92,96	61,94	2,43
E1 ANX 2M	0,87	11,25	7,50	0,29
E1 FC	4,76	76,31	50,85	2,00
E2 ANX D/N	2,71	12,56	8,37	0,33
E2 ANX 2M	0,78	1,02	0,68	0,03
E2 FC	4,77	8,21	5,47	0,21

[0226] Los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución CM fueron analizados luego por su distribución de tamaño molecular, actividad anti-complementaria, actividad amidolítica usando tanto PL-1 como TGA como sustratos, actividad FXIa y actividad NAPTT. Los resultados se muestran en la Tabla 2, Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales E1 y E2 y Tabla 3, Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 y E2. La caracterización bioquímica de los recipientes finales derivados de la primera y la segunda parte de la fracción IgG eluída reveló que la primera parte de la elución está esencialmente libre de FXIa y otras proteínas indeseables que causan valores elevados de TGA y menores de NAPTT. Por el contrario, las actividades FXIa y amidolítica están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido de agregados y oligodímeros también es mayor. Notablemente, el valor de ACA en la primera parte del eluato es muy bajo, en tanto la segunda parte del eluato presenta un valor mucho mayor.

Tabla 2. Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales E1 y E2.

HPLC	Polímeros	Oligo/dímeros	Monómeros	Fragmentos
E1 FC	0.20 %	4.66 %	93.13 %	2.01 %
E2 FC	2.82 %	9.09 %	85.95 %	2.15 %

Tabla 3. Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 y E2.

	PKKA	TGA	FXIa	ACA	PL-1	NAPTT
	PKKA IU/ml	% de plasma normal	mU/ml FXIa	Unidades CH50 consumidas / %	nmol/ml min	(FXI Plasma)
E1 FC	< 4	96,87	<0,04	16,9 / 16,6 %	< 10	> 5 mg
E2 FC	5,9	256,41	2,14	48,2 / 58,7 %	< 10	> 5 mg

[0227] En conclusión, la división de la elución de la columna ff CM Sepharose da como resultado dos fracciones y permite la elaboración de composiciones de IgG sustancialmente libres de FXIa.

Ejemplo 2

[0228] Con el fin de reducir la cantidad de actividad amidolítica presente en las preparaciones de inmunoglobulinas de elaboración a escala, se investigaron las condiciones usadas para eluir y fraccionar la cromatografía de intercambio catiónico. Los detalles de estas investigaciones se proveen más adelante.

[0229] Se condujo una serie de experimentos para encontrar las soluciones adecuadas para reducir/eliminar la actividad amidolítica durante el proceso corriente abajo de acuerdo con el método de producción de Gammagard SID que se describe en la presente. Brevemente, la pasta de la fracción de Cohn se disolvió en agua fría a 4°C y pH 5,2 ± 0,2. Después de una clarificación por filtración CWSS, las muestras se filtraron en forma estéril y se guardaron a 4°C o bien se diluyeron con agua hasta una concentración de proteínas del 2% para su procesamiento inmediato. La solución se llevó luego a 20-25°C y se incubó por 1 hora con una mezcla de solvente/detergente

(Triton X-100 1%, Tween 80 0,3%; TNBP 0,3%) antes de cargar la solución de proteínas sobre una columna de flujo rápido CM-Sepharose equilibrada (solución amortiguadora de equilibrio: Acetato Na 25 mM, pH 5,0 ± 0,2). Después de la carga, la columna se lavó con solución amortiguadora de acetato (Acetato Na 0,01 M, pH 5,5 ± 0,2) y la IgG adsorbida se eluye con solución amortiguadora de elución (NaCl 0,25 M, glicina 0,2 M, PEG 3350 0,1%, Tris 25 mM, pH 7,8). Durante las corridas de ff CM Sepharose, se monitorearon los siguientes parámetros para fraccionar el eluato CM (en un punto definido): DO 280; pH; y volumen de elución en volúmenes de columna (CV). Después, los eluatos se ultra/diafiltraron con solución amortiguadora de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 0,05%) o se usaron inmediatamente para los análisis. Este paso de concentración se realizó con el fin de medir la actividad amidolítica a valores de proteínas que también se corresponden con una composición del recipiente final del 10%.

[0230] Durante la elución, el eluato rápidamente alcanzó el valor de conductividad de la solución amortiguadora de elución CM. Sin embargo, según se muestra en la Figura 2, el pH del eluato medido a la salida de la columna inicialmente cayó desde 5,5, como en la solución amortiguadora de lavado, hasta por debajo de 5,0 (4,3 - 4,8) y permaneció sin cambio para los primeros 4 CV, a pesar del hecho que la solución amortiguadora de elución tenía un pH de 7,8. Se observó un aumento en el pH hasta aproximadamente 7,8 al final de la recolección del eluato. El monitoreo de la DO 280 a la salida de la columna muestra que este cambio en el pH corresponde a la liberación de un segundo pico, donde se detecta la mayor parte de la actividad amidolítica (medida con el ensayo PL-1).

Ejemplo 3

[0231] Para una investigación adicional del fenómeno de elución bimodal de CM-Sepharose y el cambio de pH observados en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, se recolectaron fracciones de elución individuales en otro experimento de cromatografía de flujo rápido en CM-Sepharose. Brevemente, se condujo una cromatografía de flujo rápido en CM-Sepharose como se describió previamente, con fracciones recolectadas y analizadas por separado antes de agrupar las fracciones A – N y concentrarlas por ultrafiltración. El material de partida para el paso cromatográfico era la pasta de la Fracción II de Cohn (P25001ivLE; FIX y AT-III adsorbida). La columna CM-Sepharose se equilibró con solución amortiguadora que tiene un pH de 5,2 y el lavado se realizó a un pH de 5,7. La velocidad de flujo del paso cromatográfico se mantuvo en 0,64 cm/min.

[0232] Después del cambio de pH, hay una cantidad creciente de actividad amidolítica (PL-1) en las fracciones. Aún en la agrupación concentrada se observa una reducción de la actividad amidolítica. El hecho que la actividad PL1 sea detectable después de la ultra-/diafiltración se debe ya sea a la dilución en el eluato CM o a la generación del mismo durante la concentración.

[0233] Según se muestra en la Tabla 4, Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose, las fracciones que eluyen con un pH inferior a 5,5 (fracción A-N) contenían concentraciones mucho menores de actividad amidolítica en comparación con las que eluyen a valores de pH más altos (fracciones O y P). La cuantificación de la actividad amidolítica muestra que eluyó más actividad en las fracciones O y P que en todas las fracciones A-N

combinadas. Después del cambio de pH, se encontró una cantidad creciente de actividad amidolítica (PL-1) en las fracciones. Aún en la agrupación concentrada se observa una reducción de la actividad amidolítica. El hecho que la actividad PL1 fuera detectable después de la ultra-/diafiltración se debe ya sea a la dilución en el eluato CM o a la generación del mismo durante la concentración.

Tabla 4. Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose.

Muestra	Eluato en volumen de columna CV	pH	Volumen (corregido) g	Proteína conc. %	Proteína (corregido) g	Recuperación en pasos de proteínas %	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/ml.min	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/ min por g de proteína
Pasta resusp.			1349	5,4	73,00	100,0	14,5	268
Filtrado CWSS			1480	4,7	68,97	94,5	14,4	309
Fracción A	0,26	5,6	245	0,04	0,10	0,1	<10	
Fracción B	0,26	4,8	247	2,17	5,36	7,3	<10	
Fracción C	0,27	4,6	255	6,69	17,09	23,4	<10	
Fracción D	0,27	4,6	256	5,55	14,22	19,5	<10	
Fracción E	0,27	4,5	256	4,21	10,78	14,8	<10	
Fracción F	0,28	4,7	270	2,99	8,08	11,1	<10	
Fracción G	0,26	4,6	252	2,15	5,41	7,4	<10	
Fracción H	0,26	4,7	245	1,49	3,66	5,0	<10	
Fracción I	0,29	4,7	278	0,99	2,76	3,8	<10	
Fracción J	0,30	4,7	287	0,67	1,92	2,6	<10	
Fracción K	0,27	4,7	258	0,51	1,32	1,8	<10	
Fracción L	0,26	4,7	251	0,43	1,08	1,5	<10	
Fracción M	0,27	4,7	257	0,37	0,95	1,3	<10	
Fracción N	0,28	4,9	267	0,39	1,04	1,4	<10	
Fracción O	0,34	5,5	324	0,52	1,69	2,3	28,2	5423
Fracción P	0,29	7,5	276	0,34	0,94	1,3	29,6	8706
Fracción Q	0,28	7,8	270	0,01	0,03	0,0	<10	
Eluato A-N CM			3616	1,91	69,06	94,6	<10	
A-N después de UF/DF			996	7,00	69,70	95,5	12,7	181

Ejemplo 4

[0234] Para una definición adicional de los límites de elución de actividad amidolítica de la resina CM-Sepharose ff, se condujo otro experimento, como el que se describió previamente, excepto que los eluatos CM se recolectaron en fracciones definidas por un límite de pH. Específicamente, los eluatos CM se recolectaron hasta un pH predefinido (4,3, 4,8, 6,0, 7,5), monitoread a la salida

de la columna. En este experimento, el material de partida para el paso cromatográfico era pasta de la Fracción II de Cohn (P25001ivLE; FIX y AT-III adsorbida), como en el Ejemplo 3. La columna CM-Sepharose se equilibró a un pH de 4,8 y se lavó a un pH de 5,3. Las fracciones de eluato se ultra-/diafiltraron y se ajustó el pH con Tris antes del análisis. En este experimento, el pH del eluato cayó a 4,1 al comienzo del paso de elución. El análisis de las fracciones de eluato recolectadas se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose.

Muestra	Eluato en volumen de columna CV	Proteína conc. %	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/ml.min	Actividad amidolítica (PL-1) nmol/ min por g de proteína
Pasta resusp.		5,7	14,4	251
Filtrado CWSS		4,9	14,1	287
Eluato CM (pH4.3)	4,88(4,38)	2,29	<10	
después de UF/DF		7,42	12.0	162
Eluato CM (pH4.8)	4,49	2,66	<10	
después de UF/DF		6,57	12.7	193
Eluato CM(pH6.0)	5,21	2,11	<10	
después de UF/DF		7,20	14,1	196
Eluato CM (pH7.5)	6,43	1,71	<10	
después de UF/DF		6,71	15,8	235

Ejemplo 5

[0235] A continuación, se determinó si una reducción en la cantidad de proteínas por unidad de resina de CM-Sepharose mejoraría aún más la separación de picos que se muestra en la Figura 2. Para evaluarlo, se condujo una serie de corridas cromatográficas en CM-Sepharose ff con cargas decrecientes de proteínas, que variaban en un rango desde 118 mg de proteína por ml de resina hasta 57 mg/proteína por ml de resina. Al igual que en el Ejemplo 2, el material de partida para el experimento era la pasta de la fracción

II de Cohn de la vía II; P24701IV; que incluye eliminación de FIX, FVII y ATIII del plasma pobre en crioprecipitados por adsorción (Tabla 6). La resina se equilibró a pH 5,2 y el paso de lavado se condujo a pH 5,7. Los eluatos de CM-Sepharose se agruparon como en el Ejemplo 2, en una primera parte (el primer pico) y una segunda parte (el segundo pico). En la Figura 2 se provee un ejemplo de cromatografía, en donde la primera agrupación terminar y la segunda agrupación comienza cuando la absorbancia UV del eluato sale a una DO_{280} = 1,6 ± 0,2 aproximadamente entre los dos picos.

Tabla 6. Análisis del material de partida (vía II de la pasta de la fracción II de Cohn; P24701IV).

Muestra	Volumen ((corregido)) g	Proteína ((corregido)) g	Recuperación %	Act. amidolítica t. (PL-1) nmol/ml min	Act. amidolítica . (PL-1) nmol/min.g de proteína
COHN II resusp.	1001	75	100	24.3	325
Filtrado CWSS	1083	74	98	22.5	331
Filtrado estéril	1067	72	96	22.5	335

[0236] Según se muestra en la Tabla 7, Análisis de purificaciones cromatográficas de CM-Sepharose realizadas con cargas variables de proteínas, la reducción de la carga de proteínas en la resina no mostró ningún efecto sobre la separación de los picos, pero tenía un efecto sobre la recuperación. De manera coherente con los resultados presentados en los ejemplos previos, hay niveles muy bajos de actividad amidolítica en las primeras agrupaciones de eluato de cada corrida cromatográfica.

Tabla 7. Análisis de las purificaciones cromatográficas de CM-Sepharose realizadas con cargas variables de proteínas.

mg de proteína/ ml de medio	muestra	eluato en volumen de columna	Concentración de proteínas %	recuperación %	actividad amidolítica (PL-1) nmol/ml.min
118	(primera parte) del eluato CM	2,7	3,5	81,5	< 10
	segunda parte del eluato CM	4,8	0,3	13,5	
Después de UF/DF			8,49		< 10
110	(primera parte) del eluato CM	2,3	4,0	78,1	< 10
	segunda parte del eluato CM	5,1	0,5	19,6	
Después de UF/DF			7,18		< 10
80	(primera parte) del eluato CM	2,8	2,25	72,4	< 10
	segunda parte del eluato CM	3,5	0,6	24,7	
Después de UF/DF			7,06		< 10
72	(primera parte) del eluato CM	2,7	2,05	76,7	< 10
	segunda parte del eluato CM	4,4	0,4	23,1	
Después de UF/DF			5,62		< 10
57	(primera parte) del eluato CM	2,3	1,71	67,0	< 10
	segunda parte del eluato CM	4,8	0,4	27,9	
Después de UF/DF			3,88		< 10

Ejemplo 6

[0237] Para una validación adicional de los hallazgos experimentales descritos previamente, las purificaciones cromatográficas en CM-Sepharose se efectuaron con velocidades de flujo y esquemas de agrupación de elución variables. Brevemente, se procesó una pasta de la fracción II de Cohn con un alto contenido de actividad amidolítica (100 nmol/ml.min a 6% de proteínas) como se describe en la presente en la fracción de cromatografía ANX precedente. Para todas las corridas de CM-Sepharose, el eluato se recolectó cuando el UV empezó a aumentar y se detuvo después de ya sea 3 CV o

después de 4 CV.

[0238] Se realizaron tres purificaciones cromatográficas en CM Sepharose de la siguiente manera. Las fracciones de eluato recolectadas se concentraron como se describe en la presente y luego se concentraron adicionalmente para evitar valores PL-1 por debajo del límite de detección para el ensayo PL-1.

[0239] Primera corrida: La resina CM-Sepharose se lavó y equilibró a una velocidad de flujo de 1 cm/min. La velocidad de flujo de los pasos de carga, lavado y elución de la proteína se mantuvo constante en 0,64 cm/min. Se recolectaron 3 volúmenes de columna (3 CV) de eluato en la agrupación principal.

[0240] Segunda corrida: La resina CM-Sepharose se lavó y equilibró a una velocidad de flujo de 1,2 cm/min. La velocidad de flujo del paso de carga de la proteína era de 0,64 cm/min. La velocidad de flujo del paso de lavado era de 0,64 cm/min para los primeros 1,2 volúmenes de columna (CV) y de 1,8 cm/min para los siguientes 28,8 CV. El paso de elución se condujo a 0,64 cm/min. Se recolectaron 3 volúmenes de columna (3 CV) de eluato en la agrupación principal.

[0241] Tercera corrida: La resina CM-Sepharose se lavó y equilibró a una velocidad de flujo de 1,2 cm/min. La velocidad de flujo del paso de carga de la proteína era de 0,64 cm/min. La velocidad de flujo del paso de lavado era de 0,64 cm/min para los primeros 1,2 volúmenes de columna (CV) y de 1,8 cm/min para los siguientes 28,8 CV. El paso de elución se condujo a 0,64 cm/min. Se recolectaron 4 volúmenes de columna de eluato en la agrupación principal.

[0242] La agrupación principal de cada corrida cromatográfica en CM-Sepharose se concentró y se analizó por la actividad amidolítica (PL-1), la concentración total de proteínas y el perfil de HPLC. Según se muestra en la Tabla 8, Análisis de purificaciones cromatográficas de CM-Sepharose realizadas con velocidades de flujo y volúmenes de recolección de eluato variables, el aumento de la velocidad de flujo en el paso de lavado dio como resultado cantidades menores de actividad amidolítica en la agrupación principal (compárense la Corrida 1 con la Corrida 2). La recolección de 4 CV, en lugar de 3 CV, proporcionó un rendimiento de proteínas totales nominal (2,55 g/l de plasma versus 2,5 g/l de plasma; compárense la Corrida 3 con la Corrida 2); sin embargo, fue de más del doble de la cantidad total de actividad amidolítica presente en la composición final (384,7 PL-1 nmol/min·g de proteína versus 188,5 PL-1 nmol/min·g de proteína). La agrupación de 4 CV también aumentó el contenido de agregados en la composición final de inmunoglobulinas (0,52% versus 0,12%; compárese la Corrida 3 con la Corrida 2). Notablemente, el contenido amidolítico y de agregados final de la composición preparada en la Corrida 2 es coherente con lo observado previamente (Véase, la Tabla 2, Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales E1 y E2, Tabla 4, Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose y Tabla 5, Análisis de las fracciones de elución en ff CM-Sepharose).

[0243] **Tabla 8.** Análisis de las purificaciones cromatográficas en CM-Sepharose realizadas con velocidades de flujo de lavado y volúmenes de recolección de eluato variables.

		1. Corrida	2. Corrida	3. Corrida
Rendimiento de proteínas		2,36	2,5	2,55
Valor de proteínas %		8,12	7,48	9,28
PL-1 nmol/ml.min		27,5	14,1	35,7
PL-1 nmol/min.g protein		338,7	188,5	384,7
HPLC	Agregados	0,18	0,12	0,52
	Oligo/dímeros	5,84	5,74	6,38
	Monómeros	93,88	94,10	92,98
	fragmentos	0,09	0,04	0,12

Ejemplo 7

[0244] Para demostrar que los resultados provistos previamente se podían llevar a escala hasta una escala de elaboración industrial, se procesaron 360 g del material de partida de la Fracción II de Cohn igual que en los experimentos anteriores. Se recolectaron 2,9 CV de CM-Sepharose en una primera agrupación y el balance del eluato se recolectó en una segunda agrupación. Las agrupaciones de eluato resultantes se procesaron luego en una composición de recipiente final, como se describe en la presente, adecuado para su administración a un individuo. Este procesamiento adicional incluyó cromatografía ANX, ultra-/diafiltración y liofilización de la formulación final. Luego se analizaron las características bioquímicas de cada preparación final y los resultados se muestran en la Tabla 9, Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 (primera parte de la elución; 2,9 CV) y E2 (segunda parte de la elución; > 2,9 CV).

Tabla 9. Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 (primera parte de la elución; 2,9 CV) y E2 (segunda parte de la elución; > 2,9 CV).

		Eluato CM después del procesamiento corriente abajo	
		Primera parte de la elución	Segunda parte de la elución
Valor de proteínas %		4,90	3,95
IgG g/L		48,3	36,3
IgA g/L		0,006	0,0002
Subclases de IgG	IgG 1	71,9	71,4
	IgG 2	21,0	16,4
	IgG 3	4,6	10,8
	IgG 4	2,5	1,4
HPLC	Agregados	0,07	0,06
	Oligo/dímeros	4,59	10,76
	Monómeros	94,81	87,86
	fragmentos	0,52	1,32
Electroforesis CA			
	Albúmina	1,2	2,3
	α/β globulina		0,2
	γ globulina	98,8	97,5
ACA (C'H 50)		25,4	26,5
PKA IE/ml		<0,6	41,2
PL-1 nmol/ml.min		19,7	728,6
PL-1 nmol/min.g protein		402,0	18446,6

[0245] Según se muestra en la Tabla 9, Comparación de la caracterización bioquímica de los dos recipientes finales E1 (primera parte de la elución; 2,9 CV) y E2 (segunda parte de la elución; > 2,9 CV), la composición final derivada de la primera parte de la elución de CM-Sepharose contenía 50 veces menos actividad amidolítica que la composición final derivada de la segunda parte de la elución de CM-Sepharose (402 nmol de PL-1/min·g de proteína versus 18,446,6 nmol de PL-1/min·g de proteína). La composición final derivada de la primera parte de la elución de CM-Sepharose también contenía menos albúmina (1,2% versus 2,3%), α/β globulina (no detectado versus 0,2%), actividad PKA (< 0,6 IE/ml versus 41,2 IE/ml) e IgG 3 (4,6% versus 10,8%) en comparación con la composición final derivada de la segunda

parte de la elución de CM-Sepharose. Además, la composición derivada de la primera parte de la elución de CM-Sepharose presentaba un contenido de monómero de IgG mucho mayor (94,81% versus 87,86%) que la composición final derivada de la segunda parte de la elución de CM-Sepharose.

Ejemplo 8

[0246] Para una validación adicional de los resultados provistos previamente, se preparó una porción de pasta de la Fracción II (RI10XD142; precipitado A centrifugado) de acuerdo con los métodos provistos en la presente. La pasta se resuspendió luego y se cargó sobre una columna de intercambio catiónico de CM-Sepharose como se describe en la presente y se eluyó según se describió previamente. El eluato (volumen total: 4743 ml) se dividió en una primera fracción que contiene 75% del eluato total (3530 ml) y una segundo fracción que contiene 25% del eluato total (1213 ml). Ambas primera y segunda fracciones de eluato de CM-Sepharose fueron procesadas luego en el recipiente final como se describe en la presente y después se analizaron la actividad FXIa, TGA, NAPTT y amidolítica (PL-1), los agregados IgG y el contenido ACA. Los resultados se proveen en la Tabla 10, Caracterización bioquímica de la primera y segunda fracción de elución de CM-Sepharose. De manera coherente con los resultados provistos anteriormente, la separación del eluato de CM-Sepharose en una primera y segunda agrupación da como resultado una reducción de la actividad FXIa y TGA en la preparación final de inmunoglobulinas.

Tabla 10. Caracterización bioquímica de la primera y segunda fracción de elución de CM-Sepharose.

Ensayo	Unidades	Primera parte del eluato CM	Segunda parte del eluato CM

TGA	% de plasma normal	96,87	256,41
F-XIa específico	mU/ml	<0,04	2,14
NAPTT	mg	<5	<5
Actividad amidolítica (PL-1)	nmol/ml min	<10	<10
PKA	IE/ml	<4	5,9
MSD	% de agregados	0,20	2,82
ACA	%	16,6	58,7

Ejemplo 9

[0247] Para una evaluación adicional de la posibilidad de aumentar la escala de los métodos provistos en la presente, se monitoreó un eluato de CM-Sepharose de un proceso de elaboración a gran escala por el contenido de proteínas, pH y actividad FXIa. Brevemente, se procesaron aproximadamente 19.000 l de plasma pobre en crioprecipitados, como se describe en la presente, para formar aproximadamente 220 kg de pasta de la fracción II, que contiene aproximadamente 70 kg de proteína. La pasta de la fracción II se resuspendió y se cargó sobre una columna de CM-Sepharose a escala de elaboración, se lavó y se eluyó según se describió previamente. Se recolectó una muestra del eluato y se analizó después de cada CV (aproximadamente 350 l) de elución. Según se muestra en la Tabla 11, Caracterización bioquímica de muestras del eluato de CM-Sepharose tomadas después de la elución de cada volumen de columna, solamente se observan valores elevados de FXIa al final de la elución de CM-Sepharose, después de los cambios de pH del eluato. La concentración de proteínas del eluato se monitoreó a una DO_{280} y la primera parte de la elución se recolectó y agrupó hasta que la DO_{280} caía por debajo de 2,0.

Luego se recolectó la segunda parte de la elución y se agrupó por separado hasta que la DO_{280} cayó por debajo de 0,2. Después se analizó la primera y la segunda agrupación de eluato y se compararon, según se muestra en la Tabla 12, Caracterización bioquímica de la primera y segunda agrupación de elución de CM-Sepharose. Notablemente, se encontró un 98% del rendimiento de IgG en la primera parte del eluato de CM y un 2% del rendimiento de IgG en la segunda parte del eluato CM. Por consiguiente, al terminar la recolección de una agrupación de elución de CM-Sepharose después que la DO_{280} del eluato cae por debajo de 2,0, se puede eliminar una cantidad significativa de TGA y de actividad FXIa de la preparación, minimizando al mismo tiempo la pérdida del rendimiento de IgG.

Tabla 11. Caracterización bioquímica de muestras del eluato de CM-Sepharose tomadas después de la elución de cada volumen de columna.

Muestra (columna 1 de CM-Sepharose)	Volumen del eluato (l)	DO	pH a la salida de la columna*	TPU V (g/dl)	FXIa (mU/g)
LE08L008 1CV	355	> 2	4,37	6,57	0,61
LE08L008 2CV	706	> 2	4,28	1,67	2,40
LE08L008 3CV	1069	> 2	4,27	0,90	4,44
LE08L008 4CV	1408	> 2	7,48	0,65	86,55
LE08L008 5CV	1753	> 2	8,18	0,19	101,07
LE08L008 6CV	2106	0,85	8,28	0,06	86,24
LE08L008 7CV	2451	0,26	8,34	0,00	n.d.

Tabla 12. Caracterización bioquímica de la primera y segunda agrupación de elución de CM-Sepharose.

Ensayo	Unidades	Primera parte del eluato CM	Segunda parte del eluato CM (después de una DO de 2)
TGA	% de plasma de referencia a 2,4 mg/ml	144,64	366,65
F-XIa	IgG mU/g	12,53	Actividad tipo factor XIa muy elevada; no se puede evaluar cuantitativamente ya que el producto también contiene actividades FXa y/o FIXa

Ejemplo 10

[0248] Para evaluar aún más los métodos divulgados para reducir el contenido amidolítico de una composición de inmunoglobulinas, se condujo un segundo experimento a gran escala usando un precipitado de la Fracción II como material de partida. Brevemente, el precipitado de la Fracción II se preparó como se describe en el Ejemplo 1, excepto que la separación del precipitado A se realizó por filtración, en lugar de centrifugación.

[0249] El precipitado de la Fracción II fue sometido a cromatografía catiónica de CM, como se describe en el Ejemplo 1. Al igual que en el Ejemplo 1, el eluato CM se recolectó en dos agrupaciones, una porción de cabeza (E1) que contiene a la masa del contenido de IgG y una porción de estabilización (E2) que contiene la mayor parte de la actividad amidolítica. La recolección de la primera parte del eluato (E1) comenzó a una DO de 400 mAU y se detuvo después de exactamente 2,7 volúmenes de columna. La segunda fracción (E2) del pico de elución se recolectó cuando la DO cayó nuevamente a 400 mAU. Las fracciones eluidas se procesaron luego por separado por el resto del proceso. El balance de masas para el proceso de purificación se muestra en la Tabla 13, Balance de masas para la segunda purificación a gran escala a partir

del precipitado de la Fracción II.

Tabla 13. Balance de masas para la segunda purificación a gran escala a partir del precipitado de la Fracción II.

	TPUV (%)	Proteínas (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Fracción II dis.	6,14	126,72	100,00	3,02
CWSS	5,50	124,50	98,24	2,96
CM E1	2,96	108,73	85,80	2,59
CM E2	0,90	16,02	12,64	0,38
E1 ANX D/N	2,74	94,82	74,82	2,26
E1 ANX 2M	0,94	10,20	8,05	0,24
E1 EB	4,99	96,20	75,92	2,29
E2 ANX D/N	2,70	13,26	10,46	0,32
E2 ANX 2M	0,95	1,20	0,94	0,03
E2 EB	5,42	11,81	9,32	0,28

[0250] Al igual que en el Ejemplo 1, prácticamente el 10% de las proteínas totales se encuentra en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento confirmada si la elución se detenía después de 2,7 volúmenes de columna

[0251] Los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) fueron analizados por la distribución de tamaño molecular, actividad anti-complementaria, actividad amidolítica con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la Tabla 14, Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales y en la Tabla 15, Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales.

Tabla 14. Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales

HPLC	Polímeros	% de oligo/dímeros	Monómeros	Fragmentos
E1 FC	0,24 %	5,18 %	93,21 %	1,36 %
E2 FC	4,42 %	9,60 %	84,55 %	1,44 %

Tabla 15. Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales

	PKKA	TGA	FXIa	ACA	SN13a	NAPTT
	PKKA IU/ml	% de plasma normal	FXIa mU/ml	Unidades C'H50 consumidas / %	FXIa mU/ml	(FXI de plasma)
E1 FC	< 4	102,76	<0,04	7,9 / 9,7 %	< 0,375	> 5 mg
E2 FC	<4	119,75	0,09	52,4 / 63,7 %	3,23	> 5 mg

[0252] La caracterización bioquímica de los recipientes finales derivados de la primera y la segunda parte de la fracción IgG eluída reveló que la primera parte de la elución está esencialmente libre de FXIa y otras proteínas indeseables que causan valores elevados de TGA y menores de NAPTT. Por el contrario, las actividades FXIa y amidolítica están enriquecidas en la segunda parte, donde los contenidos de agregados y oligo/dímeros también son mayores, aún si la separación de la suspensión A se efectúa por filtración. Notablemente, el valor ACA en la primera parte del eluato es aún menor, en tanto el valor de ACA en la segunda parte del eluato es más alto.

[0253] En este experimento, donde se usa filtración para la separación de la suspensión A en el proceso corriente arriba, el FXIa residual en la segunda parte de la elución es mucho menor y el valor de TGA del recipiente final de esta parte de elución se encuentra en el rango normal.

[0254] Tomado conjuntamente con el Ejemplo 1, la división de la elución de la columna ff CM Sepharose en dos fracciones (E1 y E2) permite la elaboración de una composición de IgG que está sustancialmente libre de FXIa. Esto se cumple para ambas opciones de separación para la fracción A (es decir, centrifugación y filtración), aunque el FXIa es significativamente menor si la separación del precipitado A se efectúa por filtración.

Ejemplo 11

[0255] Este ejemplo demuestra la conveniencia de los métodos de la presente para la separación de actividades procoagulantes por cromatografía de intercambio catiónico en procesos de elaboración a gran escala diseñados para la producción de composiciones de inmunoglobulinas para una administración por vía subcutánea. El material de partida de este experimento era un precipitado de la Fracción II formado a partir de plasma de una fuente humana agrupada recolectado en Europa, que se crio-precipitó y usó para recuperar anti-trombina III (ATIII) por adsorción.

[0256] Brevemente, después de la crio-precipitación y adsorción de ATIII, el fraccionamiento con alcohol frío comienza con la separación de fibrinógeno y factores de coagulación residuales (por ejemplo, Factor XIII) por medio de la precipitación de un precipitado de la Fracción I a 8% de alcohol y pH 7,0. La concentración de alcohol en el sobrenadante se ajusta en un 25% con el fin de precipitar la fracción II+III y para separar la albúmina. Después de la resuspensión del precipitado II+III, se agrega alcohol hasta un 12% a un pH de ~5,2 para formar el precipitado III. Después de la separación del precipitado III, se agregan 0,04 g DEAE Sephadex / g de proteína, la solución se filtra a través de filtros de profundidad Cuno 90 y la fracción II de Cohn que contiene la fracción de gamma globulina purificada se precipita con 25% de alcohol a pH neutro.

[0257] El precipitado de la fracción II se disuelve en agua fría a 4°C y pH 5,2 ± 0,2. Después de clarificación por filtración CWSS, la solución se ajusta para el tratamiento SD en una concentración de proteínas del 2%. La temperatura durante la incubación SD se mantiene en el rango de entre 20 y

25°C. La solución de proteínas se cargó sobre una columna de flujo rápido CM-Sepharose equilibrada (solución amortiguadora de equilibrio: acetato de sodio 0,025 M, pH 5,0 ± 0,2). Después de la carga, la columna se lava con 30 volúmenes de columna de solución amortiguadora de acetato (acetato de sodio 0,01 M. pH 5,5 ± 0,2), para lavar los reactivos SD, antes de eluir la proteína adsorbida con solución amortiguadora de elución (NaCl 0,25 M, glicina 0,2 M, PEG 3350 0,1%, Tris 25 mM, pH 8,00). La recolección de la primera parte del eluato (E1) comienza a una DO de 400 mAU y se detuvo después de exactamente 2,7 volúmenes de columna. La segunda fracción (E2) del pico de elución se recolecta cuando la DO cayó nuevamente a 400 mAU. Las fracciones eluidas se procesan por separado en la masa final de acuerdo con los siguientes pasos.

[0258] El pH de la fracción del eluato se ajusta en 5,2 y luego se produce la concentración hasta un 5%, la diafiltración contra solución amortiguadora de diafiltración (NaCl 0,02 M, PEG 3350 0,05%) y la subsiguiente concentración hasta un 10% de proteínas. Se agrega 0,055 g de glicina / g de proteína a la solución y el pH se ajusta en 7,0 antes de una filtración estéril.

[0259] El cromatograma de los pasos de lavado y elución del intercambio catiónico se muestra en la Figura 3. La línea 1 muestra la absorbancia UV, la línea 2 la conductividad y la línea 3 el pH a la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nm indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna ff CM Sepharose. El pH a la salida de la columna comienza a aumentar justo después del comienzo de la re-elevación de la absorbancia de UV durante la elución. En este punto se separaron las dos fracciones de eluato (F4 y F5, denominadas E1 y E2 en la

presente). El balance de masas para la corrida de purificación corriente abajo se muestra en la Tabla 16, Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la Fracción II.

Tabla 16. Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la Fracción II.

	TPUV (%)	Proteínas (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Fr II dis.	4,94	179,45	100,00	3,58
CWSS	2,70	169,46	94,43	3,38
CM E1	2,78	148,05	82,50	2,95
CM E2	0,85	21,04	11,72	0,42
Masa de E1	13,25	127,60	71,11	2,54
Masa de E2	13,15	20,32	11,32	0,41

[0260] Prácticamente un 15% de las proteínas totales se encuentra en la segunda parte del pico de elución (E2). Esta es la pérdida de rendimiento debido a la terminación de la recolección de E1 después de 2,7 volúmenes de columna. Los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) fueron analizados por la distribución de tamaño molecular, actividad anti-complementaria, actividad amidolítica con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la Tabla 17, Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales y en la Tabla 18, Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales.

Tabla 17. Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales.

HPLC	**Polímeros**	**% de oligo/dímeros**	**Monómeros**	**Fragmentos**
Masa de E1	0,47 %	5,92 %	93,61 %	-
Masa de E2	6,33 %	8,50 %	83,97 %	1,20 %

Tabla 18. Comparación de las características adicionales de los dos

recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	ACA	SN13a	NAPTT
	PKKA IU/ml	% de plasma normal	FXIa ng/ml	%	FXIa mU/ml	(FXI de plasma)
Masa de E1	< 4	118,34	0,095	44	<0,39	> 10 mg
Masa de E2	16,5	109,11	0,23	57	167	> 10 mg

[0261] La primera parte del eluato CM (E1) dio como resultado una masa final con un contenido menor de agregados, dímeros y fragmentos, con un bajo contenido de FXIa, con un resultado de TGA cercano al del plasma normal, con una actividad PKA y amidolítica media con SN-13 debajo del límite de detección y sin una NAPTT abreviada. Las actividades FXIa, PKKA y tipo FXIa están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido de polímeros, fragmentos y oligo/dímeros de IgG también es mayor. Notablemente, el valor ACA en la porción de cabeza del eluato (E1) es menor que en la porción de estabilización del eluato (E2).

Ejemplo 12

[0262] Para una evaluación adicional de los métodos divulgados para reducir el contenido amidolítico de una composición de inmunoglobulinas, se condujo otro experimento a gran escala usando un precipitado de la Fracción II como material de partida. Brevemente, el precipitado de la Fracción II se preparó como se describe en el Ejemplo 11, excepto que el material de partida para este experimento era un precipitado de la Fracción II formado a partir de un plasma de una fuente humana agrupado recolectado en Europa, que se crio-precipitó y usó para recuperar FEIBA y anti-trombina III (ATIII) por adsorción. Por lo demás, la cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose y el procesamiento corriente abajo se condujo como se describe en

el Ejemplo 11.

[0263] El cromatograma de los pasos de lavado y elución del intercambio catiónico se muestra en la Figura 4. La línea 1 muestra la absorbancia UV, la línea 2 la conductividad y la línea 3 el pH a la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nm indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna ff CM Sepharose. El pH a la salida de la columna comienza a aumentar justo después del comienzo de la re-elevación de la absorbancia de UV durante la elución. En este punto se separaron las dos fracciones de eluato (F4 y F5, denominadas E1 y E2 en la presente). El balance de masas para la corrida de purificación corriente abajo se muestra en la Tabla 19, Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la Fracción II.

[0264] **Tabla 19**. Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la Fracción II.

	TPUV (%)	Proteínas (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Fr II dis.	5,09	174,15	100,00	4,03
CWSS	2,98	168,81	96,93	3,91
CM E1	2,69	143,69	82,51	3,33
CM E2	0,94	21,28	12,22	0,49
Masa de E1	9,28	127,68	73,32	2,96
Masa de E2	9,63	19,95	11,46	0,46

[0265] Al igual que en el Ejemplo 11, prácticamente el 15% de las proteínas totales se encuentra en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento debido a la terminación de la recolección de E1 después de 2,7 volúmenes de columna. Los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución de CM (E1 y E2) fueron analizados por la distribución de tamaño molecular, actividad anti-complementaria, actividad

amidolítica con el sustrato SN13a y con los ensayos de TGA, FXIa y NAPTT.

[0266] Los resultados se muestran en la Tabla 20 y en la Tabla 21.

Tabla 20. Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales.

HPLC	Polímeros	% de oligo/dímeros	Monómeros	Fragmentos
Masa de E1	0,54 %	4,95 %	94,49 %	0,02 %
Masa de E2	6,49 %	6,71 %	85,18 %	1,62 %

Tabla 21. Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	ACA	SN13a	NAPTT
	PKKA IU/ml	% de plasma normal	FXIa ng/ml	%	FXIa mU/ml	(FXI de plasma)
Masa de E1	< 4	114,34	0,081	57	1,15	> 10 mg
Masa de E2	34,2	157,18	3,208	59	276	> 10 mg

[0267] La caracterización bioquímica de las masas estabilizadas derivadas de la primera y la segunda parte de la fracción de IgG eluída reveló que la primera parte de la elución está esencialmente libre de FXIa y de otras proteínas indeseables que causan valores elevados de TGA y abreviados de NAPTT, en tanto las actividades PKKA, FXIa y tipo FXIa están enriquecidas en la segunda parte, donde el contenido de fragmentos, polímeros y oligo/dímeros de IgG también es mayor. Los valores de ACA no difieren significativamente en las masas de la primera parte y la segunda parte del eluato. Los resultados confirman en general los hallazgos del Ejemplo 11.

Ejemplo 13

[0268] Para una evaluación adicional de los métodos divulgados para reducir el contenido amidolítico de una composición de inmunoglobulinas, se condujo otro experimento a gran escala usando un precipitado de la Fracción II

como material de partida. Brevemente, el precipitado de la Fracción II se preparó como se describe en el Ejemplo 11, excepto que el material de partida para este experimento era un precipitado de la Fracción II formado a partir de un plasma de una fuente humana agrupado recolectado en los EE.UU., que se crio-precipitó y usó para recuperar FEIBA y anti-trombina III (ATIII) por adsorción. Por lo demás, la cromatografía de intercambio catiónico en CM-Sepharose y el procesamiento corriente abajo se condujo como se describe en el Ejemplo 11.

[0269] El cromatograma de los pasos de lavado y elución del intercambio catiónico se muestra en la Figura 5. La línea 1 muestra la absorbancia UV, la línea 2 la conductividad y la línea 3 el pH a la salida de la columna. La densidad óptica a 280 nm indica una separación parcial de dos fracciones durante la elución de la proteína de la columna ff CM Sepharose. El pH a la salida de la columna comienza a aumentar justo después del comienzo de la re-elevación de la absorbancia de UV durante la elución. En este punto se separaron las dos fracciones de eluato (F4 y F5, denominadas E1 y E2 en la presente). El balance de masas para la corrida de purificación corriente abajo se muestra en la Tabla 22, Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la Fracción II.

[0270] **Tabla 22.** Balance de masas para la purificación a gran escala de IgG a partir del precipitado de la Fracción II.

	TPUV (%)	Proteínas (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Fr II dis.	4,02	125,70	100,00	3,09
CWSS	2,31	120,19	95,62	2,95
CM E1	2,73	104,01	82,74	2,55
CM E2	0,85	18,20	14,48	0,45
Masa de E1	9,33	91,11	72,49	2,24

	TPUV (%)	Proteínas (g)	Rendimiento (%)	Rendimiento (g/l de plasma)
Masa de E2	9,01	16,35	13,00	0,40

[0271] Al igual que en el Ejemplo 11, prácticamente el 15% de las proteínas totales se encuentra en la segunda parte del pico de elución. Esta es la pérdida de rendimiento debido a la terminación de la recolección de E1 después de 2,7 volúmenes de columna. Los recipientes finales preparados a partir de las dos fracciones de elución CM (E1 y E2) fueron analizados nuevamente por la distribución de tamaño molecular, actividad anti-complementaria, PKKA, actividad tipo FXIa con el sustrato SN13a y con ensayos TGA, FXIa y NAPTT. Los resultados se muestran en la Tabla 23, Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales y en la Tabla 24, Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales.

Tabla 23. Comparación de la distribución del tamaño molecular de los dos recipientes finales.

HPLC	Polímeros	% de oligo/dímeros	Monómeros	Fragmentos
Masa de E1	0,67 %	5,29 %	94,03 %	-
Masa de E2	6,48 %	8,92 %	83,74 %	0,86 %

Tabla 24. Comparación de las características adicionales de los dos recipientes finales.

	PKKA	TGA	FXIa	ACA	SN13a	NAPTT
	PKKA IU/ml	% de plasma normal	FXIa ng/ml	%	FXIa mU/ml	(FXI de plasma)
Masa de E1	< 4	109,53	0,080	44	1,23	> 10 mg
Masa de E2	54,6	148,17	1,652	60	203	> 10 mg

[0272] La caracterización bioquímica de las masas finales confirmó los resultados de los Ejemplos 11 y 12. La primera parte de la elución (E1) está

esencialmente libre de FXIa y de otras proteínas indeseables que causan valores elevados de TGA y abreviado de NAPTT, en tanto las actividades FXIa y amidolítica están enriquecidas en la segunda parte (E2), donde el contenido de fragmentos, polímeros y oligo/dímeros también es mayor aún cuando la separación de la suspensión A se efectúa por filtración. Notablemente, el valor de ACA en la masa estabilizada de la primera parte del eluato es nuevamente menor que en la masa de la segunda parte del eluato.

[0273] Tomados conjuntamente, los resultados provistos en los ejemplos anteriores demuestran que la división del eluato de una columna ff CM Sepharose en dos fracciones permite la elaboración de una composición de inmunoglobulinas sustancialmente libre de actividades procoagulantes. Esto se cumple para fuentes variables de plasma (UE y EE.UU.) y esquemas variables de procesamiento corriente arriba.

[0274] Las pérdidas de producto determinadas para las preparaciones de inmunoglobulinas descritas en los Ejemplos 11 a 13 son mayores que las observadas en los Ejemplos 1 a 10. En los Ejemplos 11 a 13, la división del pico de eluato después de 2,7 volúmenes de columna da como resultado una pérdida de aproximadamente un 15% de las proteínas totales. Dado que el cambio de pH del eluato tuvo lugar posteriormente en los Ejemplos 11-15, un corte de elución en un momento posterior debería mejorar el rendimiento global, sin comprometer significativamente la separación de actividades procoagulantes.

[0275] Los datos que se mostraron previamente demuestran que la división de un eluato de una cromatografía de intercambio catiónico constituye un método robusto para la producción de composiciones de inmunoglobulinas

con actividades procoagulantes sustancialmente reducidas.

[0276] Se comprenderá 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, los especialistas en la técnica podrán 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 en su totalidad y para todo propósito a modo de referencia.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir el contenido del Factor XI (FXI) y/o del Factor XIa (FXIa) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende los pasos de:

(a) proveer una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y FXI y/o FXIa;

(b) poner la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y por lo menos una fracción de FXI y/o FXIa a la resina de intercambio catiónico;

(c) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción de cabeza y una porción de estabilización; y

(d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato,

en donde la porción de cabeza del eluato no comprende más que un 80% del eluato.

2. El método de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO

PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, CARACTERIZADO PORQUE además comprende un paso de lavado de la resina de intercambio catiónico que contiene las inmunoglobulinas y FXI y/o FXIa unidos a la misma con una solución amortiguadora de lavado que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad menor que 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en el paso (c).

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADO PORQUE la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil.

6. El método de la reivindicación 5, CARACTERIZADO PORQUE la resina de intercambio catiónico débil es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5.

8. El método de la reivindicación 7, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende un pH de 8,0 ± 0,2.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM.

10. El método de la reivindicación 9, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 240 y 260

mM.

11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 100 mM y 300 mM.

12. El método de la reivindicación 11, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 175 mM y 225 mM.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, CARACTERIZADO PORQUE la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 70% del eluato.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 7,0 separadamente de eluato con un pH de más de 7,0.

15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 6,5 separadamente de eluato con un pH de más de 6,5.

16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 6,0 separadamente de eluato con un pH de más de 6,0.

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 5,5 separadamente de eluato con un pH de más de 5,5.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 5,0 separadamente de eluato con un pH de más de 5,0.

19. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende monitorear el pH del eluato.

20. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato comprende los subpasos de:

(i) monitorear la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280});

(ii) comenzar la recolección cuando la DO_{280} del eluato se eleva por encima de un primer umbral de DO_{280} de por lo menos 50 mAU; y

(iii) terminar la recolección cuando la DO_{280} del eluato cae por debajo de un segundo umbral de DO_{280} no menor que 500 mAU.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE el segundo umbral de DO_{280} no es menor que 1 AU.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20, CARACTERIZADO PORQUE el segundo umbral de DO_{280} no es menor que 2 AU.

23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 22, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0.

24. El método de la reivindicación 23, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de 5,5 ± 0,2.

25. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, CARACTERIZADO PORQUE menos que un 50% del FXI y/o del FXIa unidos a la resina de intercambio catiónico en el paso (b) está presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d).

26. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE menos que un 25% del FXI y/o del FXIa unidos a la resina de intercambio catiónico en el paso (b) está presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d).

27. El método de la reivindicación 25, CARACTERIZADO PORQUE menos que un 10% del FXI y/o del FXIa unidos a la resina de intercambio catiónico en el paso (b) está presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d).

28. El método de la reivindicación 25 ó 27, CARACTERIZADO PORQUE la cantidad de FXI y/o FXIa se determina mediante un ensayo de actividad amidolítica usando un sustrato específico de FXIa.

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, CARACTERIZADO PORQUE la composición de inmunoglobulinas derivada

de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la fracción de plasma en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.

30. El método de la reivindicación 29, CARACTERIZADO PORQUE la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la Fracción II en suspensión.

31. Un método para reducir la actividad anti-complemento (ACA) en una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende los pasos de:

(a) proveer una composición de inmunoglobulinas derivada de plasma que comprende inmunoglobulinas IgG y una primera cantidad de ACA;

(b) poner la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma en contacto con una resina de intercambio catiónico dispuesta en una columna de cromatografía bajo las condiciones de una primera solución que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad no mayor que 11 mS/cm para unir las inmunoglobulinas IgG y por lo menos una fracción de la primera cantidad de ACA a la resina de intercambio catiónico;

(c) eluir las inmunoglobulinas IgG de la resina de intercambio catiónico poniendo la resina de intercambio catiónico en contacto con una solución amortiguadora de elución que comprende un pH de por lo menos 7,5 y una conductividad de por lo menos 15 mS/cm para formar un eluato que comprende una porción de cabeza y una porción de estabilización; y

(d) recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la

porción de estabilización del eluato,

en donde la porción de cabeza del eluato no comprende más que un 80% del eluato.

32. El método de la reivindicación 31, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 20 mS/cm.

33. El método de la reivindicación 31 ó 32, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende una conductividad de por lo menos 25 mS/cm.

34. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, CARACTERIZADO PORQUE además comprende un paso de lavado de la resina de intercambio catiónico que contiene las inmunoglobulinas y ACA unidas a la misma con una solución amortiguadora de lavado que comprende un pH no mayor que 6,0 y una conductividad menor que 11 mS/cm antes de eluir las inmunoglobulinas de la resina de intercambio catiónico en el paso (c).

35. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, CARACTERIZADO PORQUE la resina de intercambio catiónico es una resina de intercambio catiónico débil.

36. El método de la reivindicación 35, CARACTERIZADO PORQUE la resina de intercambio catiónico débil es una resina de intercambio catiónico de carboximetilo.

37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5.

38. El método de la reivindicación 37, CARACTERIZADO PORQUE

la solución amortiguadora de elución comprende un pH de 8,0 ± 0,2.

39. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 38, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 200 y 300 mM.

40. El método de la reivindicación 39, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende cloruro de sodio entre 240 y 260 mM.

41. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 40, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 100 mM y 300 mM.

42. El método de la reivindicación 41, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de elución comprende glicina entre 175 mM y 225 mM.

43. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 42, CARACTERIZADO PORQUE la porción de cabeza del eluato consiste en no más que un 70% del eluato.

44. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 7,0 separadamente de eluato con un pH de más de 7,0.

45. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 6,5 separadamente de eluato con un

pH de más de 6,5.

46. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 6,0 separadamente de eluato con un pH de más de 6,0.

47. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 5,5 separadamente de eluato con un pH de más de 5,5.

48. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 43, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende recolectar eluato con un pH no mayor que 5,0 separadamente de eluato con un pH de más de 5,0.

49. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 48, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato separadamente de la porción de estabilización del eluato comprende monitorear el pH del eluato.

50. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 49, CARACTERIZADO PORQUE el paso de recolectar la porción de cabeza del eluato comprende los subpasos de:

(i) monitorear la densidad óptica del eluato a 280 nm (DO_{280});

(ii) comenzar la recolección cuando la DO_{280} del eluato se eleva por

encima de un primer umbral de DO_{280} de por lo menos 50 mAU; y

(iii) terminar la recolección cuando la DO_{280} del eluato cae por debajo de un segundo umbral de DO_{280} no menor que 500 mAU.

51. El método de acuerdo con la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el segundo umbral de DO_{280} no es menor que 1 AU.

52. El método de acuerdo con la reivindicación 50, CARACTERIZADO PORQUE el segundo umbral de DO_{280} no es menor que 2 AU.

53. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 34 a 52, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de entre 5,0 y 6,0.

54. El método de la reivindicación 53, CARACTERIZADO PORQUE la solución amortiguadora de lavado comprende un pH de 5,5 ± 0,2.

55. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 54, CARACTERIZADO PORQUE la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a).

56. El método de la reivindicación 55, CARACTERIZADO PORQUE la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es por lo menos un 25% menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas

derivada de plasma provista en el paso (a).

57. El método de la reivindicación 55, CARACTERIZADO PORQUE la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es por lo menos un 50% menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a).

58. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 57, CARACTERIZADO PORQUE la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción de estabilización del eluato recolectado en el paso (d).

59. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que un 50% de la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción de estabilización del eluato recolectado en el paso (d).

60. El método de la reivindicación 58, CARACTERIZADO PORQUE la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, presente en la porción de cabeza del eluato recolectado en el paso (d) es menor que un 25% de la concentración de ACA, con relación a la concentración de inmunoglobulina IgG, en la porción de estabilización del eluato recolectado en el paso (d).

61. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 60, CARACTERIZADO PORQUE la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la fracción de plasma en suspensión seleccionado del grupo que consiste en un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, un precipitado B de Kistler-Nitschmann y un precipitado modificado de los mismos.

62. El método de la reivindicación 61, CARACTERIZADO PORQUE la composición de inmunoglobulinas derivada de plasma provista en el paso (a) es un precipitado de la Fracción II en suspensión.

P.P. BAXTER INTERNATIONAL INC.

P.P. BAXTER HEALTHCARE S.A.

MÉTODO PARA REDUCIR EL POTENCIAL TROMBOEMBÓLICO DE UNA COMPOSICIÓN DE INMUNOGLOBULINA DERIVADA DE PLASMA

RESUMEN

Métodos para reducir la actividad amidolítica y anti-complemento (ACA) de una composición de inmunoglobulina a través del uso de cromatografía de intercambio catiónico. En una forma de realización específica, la invención provee métodos para reducir el contenido de Factor XI y/o Factor XIa y/o ACA en una composición de inmunoglobulina por recolección la porción principal de un eluato de intercambio catiónico. La presente invención también provee una composición de inmunoglobulina con niveles reducidos de actividad amidolítica, Factor XI y/o Factor XIa y/o ACA.

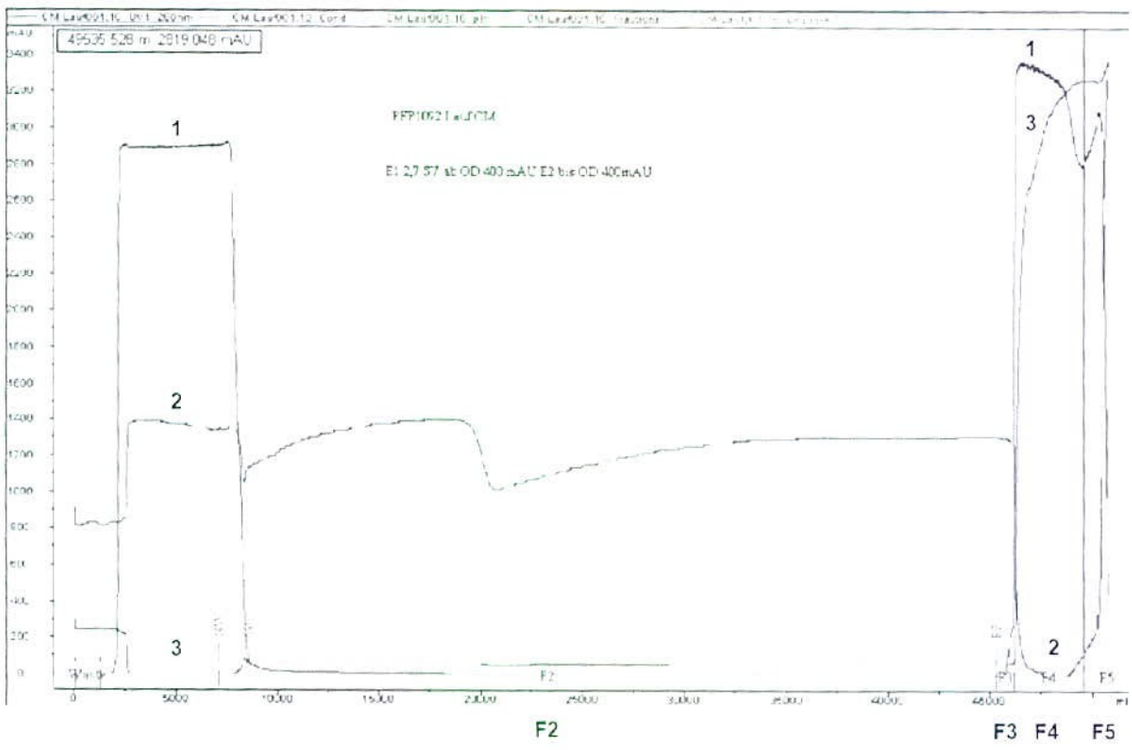


FIG. 1

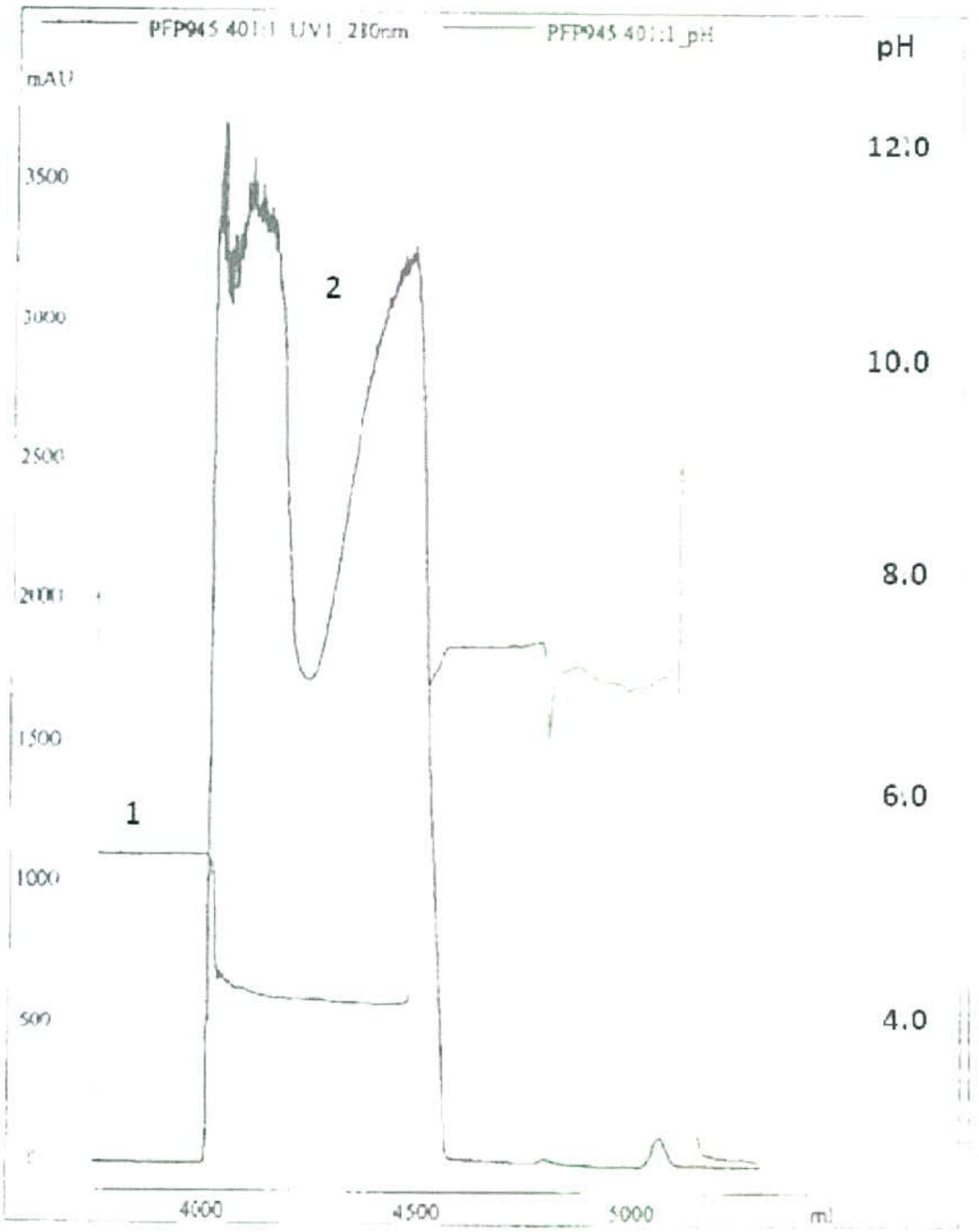

PFP945 401:1 UV1_280nm
PFP945 401:1_pH
mAU
pH
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
1
2
4000
4500
5000
ml

FIG. 2

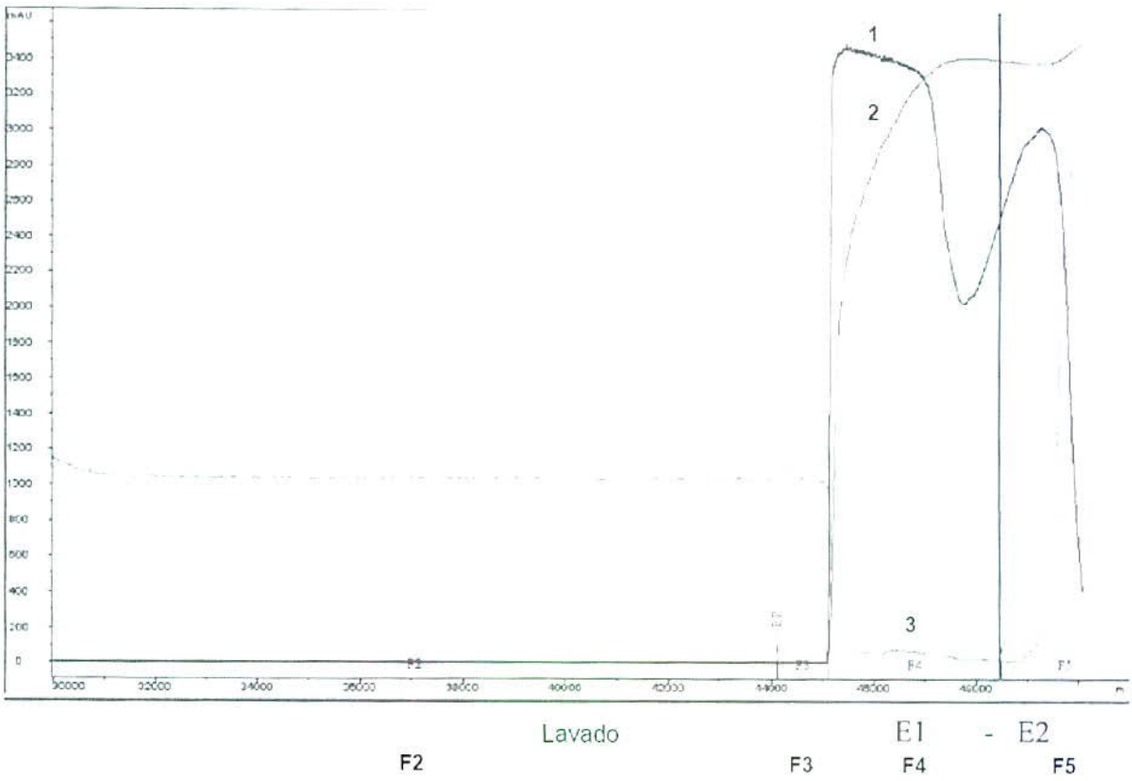

mAU
3400
3200
3000
2800
2600
2400
2200
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1
2
3
30000
32000
34000
36000
38000
40000
42000
44000
46000
48000
50000
ml
Lavado
E1 - E2
F2
F3
F4
F5

FIG. 3

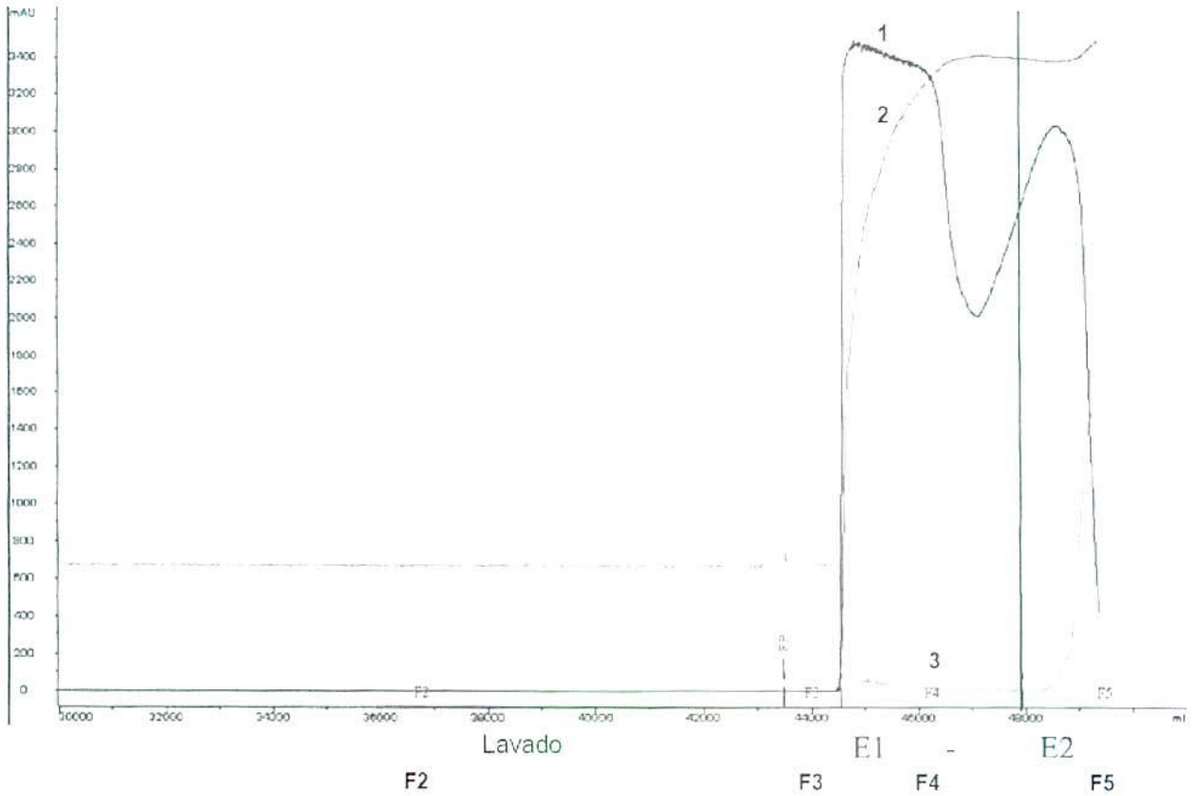

mAU
1
2
3
F2
F3
F4
F5
ml
Lavado
E1 - E2

FIG. 4

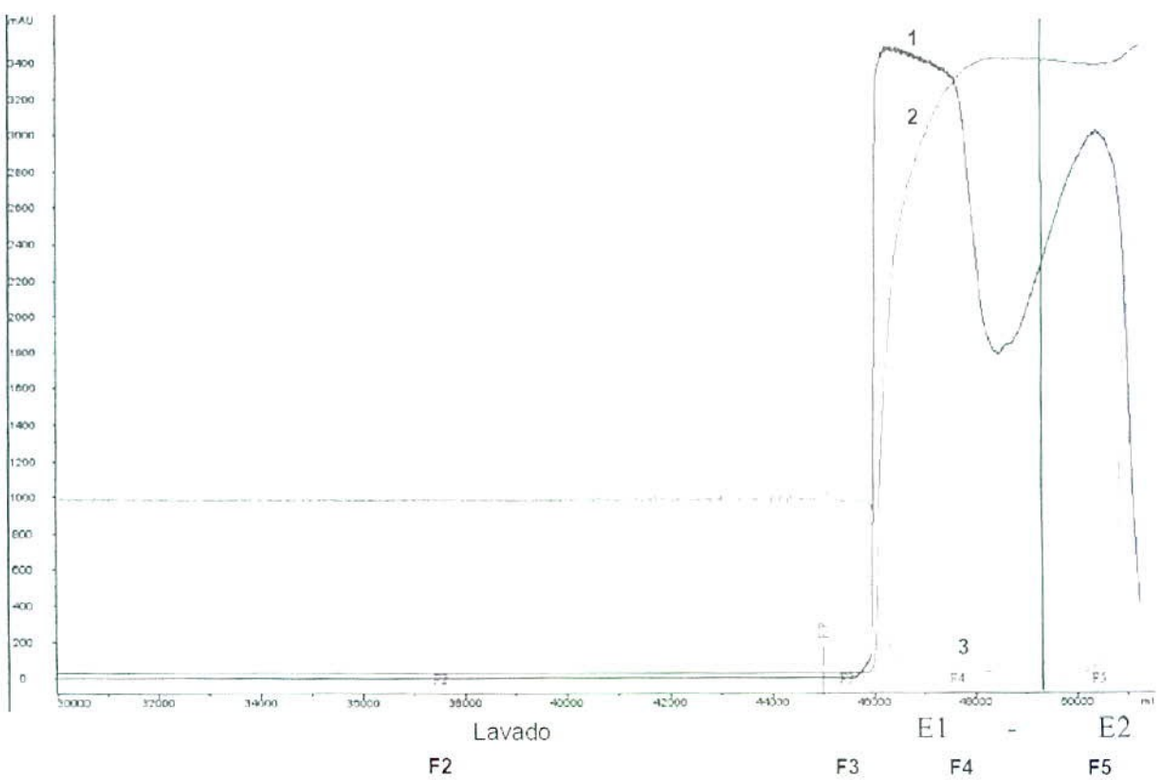

mAU
1
2
3
F2
F3
F4
F5
ml
Lavado
E1 - E2

FIG. 5

179

Notaría Sexta 6

DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C.

COPIA NUMERO 13

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

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

ICONTEC
CERTIFICADO DE GESTION DE LA CALIDAD
CERTIFICADO SC 3510-1
PRESTACION DEL SERVICIO PUBLICO NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000

IQNet

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA SEXTA

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

7 700004 347349

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 (6°) ———— 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 Usaquen, **NIDIA OSORIO LOPEZ**, T.P.A. No.73.366,

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

PAPEL DE USO EXCLUSIVO DEL PROTOCOLO NOTARIAL . NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

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

18

STATE OF ILLINOIS

SECRETARY OF STATE

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

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

- 4 MAR. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.

182

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, D – COLOMBIA

REPRESENTACION

REPRESENTATION

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

BAXTER INTERNATIONAL INC.

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

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 Círculo 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 nuestro representante en todos los asuntos de Propiedad Industrial, con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

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 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.

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.

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,

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

© CAVELIER ABOGADOS

OFFICIAL SEAL
MARCELA L MARONNO
NOTARY PUBLIC - STATE OF ILLINOIS
MY COMMISSION EXPIRES 08/28/12

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 D.C.

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

Marcia L Harding
(Signature)
NOTARY PUBLIC
My Commission expires 06/28/ 2010

© CAVELIER ABOGADOS

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

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PUESTO A LA VISTA
BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
- 4 MAR. 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

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)

1. Country: .....
   This public document
2. has been signed by .....
3. acting in the capacity of .....
4. bears the seal/stamp of .....

Certified

5. at ..... 6. the .....
7. by .....
8. No. .....
9. Seal/stamp 10. 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

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

Subscribed and sworn before me, this 8 day of February 2010, a Notary Public in and for Cook 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 [illegible] 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.

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
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

Eduardo Calado N.
Eduardo Calado Noguera
TRADUCTOR OFICIAL
Inglés - Español - Inglés
Res. 541 de Febrero de 1976

137

2

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 secretaría 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.

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

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

Eduardo Cifuentes Muñoz
TRADUCTOR OFICIAL
Ley 1ª - Inciso
- de 1976



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2010 MAR 8 8:34

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

0106.07

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
AS FUNCIONES INDICADAS

185

01

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: 00920237

CERTIFICA:

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

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TENGO A LA VISTA BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA 4 MAR. 2010 AMPARO QUINTERO ARTURO NOTARIA 98

CERTIFICA :

QUE POR ESCRITURA PUBLICA NO. 0001000 DE NOTARIA [illegible] D.C. DEL 10 DE MARZO DE 1983 , INSCRITA EL [illegible] 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

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

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
[illegible]	[illegible]	[illegible]	BOGOTA D.C.	2005/08/26	00010008
[illegible]	[illegible]	[illegible]	BOGOTA D.C.	2007/07/24	00010841
[illegible]	[illegible]	[illegible]	BOGOTA D.C.	2009/10/21	00012243

CERTIFICA:

VIGENCIA: QUE LA SOCIEDAD NO SE HALLA DISUELTA. DURACION HASTA EL [illegible] DE 2024 .

CERTIFICA:

OBJETO: 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

CONFORME A LA SERIE DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE AL DE ANEXO QUE HE TENIDO A LA VISTA

BOGOTA D.C. 4 MAR 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIA

01

9023340

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 : GERMA... ERNESTO CAVELIER FRANCO, JORGE CAVELIER FRA... FRANCO, GUILLERMO CAVELIER FRANCO, ELENA ... ALEJANDRO CAVELIER FRANCO, BEATRIZ CAVELIE... CAVELIER FRANCO.

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
AMPARO QUINTERO ARTURO NOTARIA

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 ESTÁN AUTORIZADOS PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER TIEMPO, SIN PERJUICIO DE LAS DELEGACIONS CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR LOS PRESENTES

NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

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):

	IDENTIFICACION
REVISO	
RINCON [illegible]	C.C. 000000002877024

COMO NOTARIA 72 ESTA DE CIRCULO DE BOGOTA D.C. DA FE QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA. BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
4 MAR 2010
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA DOCE (E.)

CERTIFICA:

DE CONFORMIDAD CON LO ESTABLECIDO POR LA LEY 962 DE 2005, LOS ACTOS DE REGISTRO [illegible] QUEDAN EN FIRME CINCO (5) DIAS HABILES DESPUES [illegible] INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSO [illegible] EN LA NOTARIA DEBIDAMENTE.

* * * 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

187

01

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

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
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA BOGOTA

7 700004 347332

documento de representación otorgado el día once (11) de noviembre de 2009 - - - - - - - - por J. SMITH Abogado General de la Compañia 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.oo - - - - - - - IVA $ 16.497.oo - - - - - - - - -

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. 19.066.625 Bta

Representante legal CAVELIER ABOGADOS

REPUBLICA DE COLOMBIA Amparo Quintero NOTARIA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

AMPARO QUINTERO ARTURO

NOTARIO SEXTO (6°) DE BOGOTA D.C.

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

ES FIEL EL Y DECIMA TERCERA 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 7

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

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

ICONTEC
CERTIFICADO DE GESTION DE LA CALIDAD
CERTIFICADO SC 3980-1
PRESTACION DEL SERVICIO PUBLICO NOTARIAL
ISO 9001:2000
NTC-ISO 9001:2000

CERTIFIED IQNet MANAGEMENT SYSTEM

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA

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

EL MOLDE GRAFICAS LTDA - 2009

AA 42874273

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 CIRCULO 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

NOTARIA SEXTA BOGOTA

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO ALGUNO PARA EL USUARIO

ciudadanía número 79.524.634 de Bogotá, **ROSA MARGARITA SANTACRUZ**, T.PA. 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.**,

01

88226865

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 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 [illegible] DEL 10 DE OCTUBRE DE 1984, INSCRITA EL 15 DE NOVIEMBRE DE [illegible] 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, DESPACHO CONSTA QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

18 ENE. 2010

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA SEXTA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

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 [illegible] CIVIL Y COMERCIAL, Y SOCIEDAD, ASI COMO [illegible] ACTIVIDADES DIFERENTES DE LAS ACTIVIDADES CIENTIFICAS, GREMIALES O PROFESIONALES SIN ANIMO DE LUCRO.

CONSTITUYE COPIA TOMADA DEL ORIGINAL QUE REPOSA EN ESTA NOTARIA DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA ANTERIOR COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA. BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA

18 ENE. 2010

NOTARIA

CERTIFICA:

CAPITAL Y SOCIOS: $10,000.00 DIVIDIDO EN 10,000.00 CUOTAS CON VALOR [illegible] CADA UNA, DISTRIBUIDO ASI :

[illegible] SOCIO CAPITAL STA. $)

ASOCIACION CAVELIER DEL DERECHO N.I.T. 000008001722568

01

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
TCTALES
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 ESTÁN [illegible] PARA EJERCER LA REPRESENTACIÓN DE LA SOCIEDAD EN CUALQUIER [illegible] DE LAS DELEGACIONS CONFERIDAS A LOS ORGANOS CREADOS POR [illegible] ESTATUTOS

COMO NOTARIA DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C. HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA QUE APARECE EN EL DOCUMENTO ADJUNTO ES IGUAL A LA QUE HE TENIDO A LA VISTA. BOGOTA D.C. REPUBLICA DE COLOMBIA
18 ENE. 2010
AMPARO QUINTERO ARTEAGA NOTARIA 68 DEL CIRCULO DE BOGOTA

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 [illegible] DEL LIBRO XIII, FUE (RON) NOMBRADO (S):

NOMBRE IDENTIFICACION

DIRECTOR (REPRESENTANTE LEGAL DE LA ASOCIACIÓN CAVELIER DEL DERECHO)

NOTARIA SESENTA Y OCHO DE BOGOTA

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 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 SIGUIENTES A LA FECHA DE INSCRIPCION, SIEMPRE QUE NO SEAN OBJETO DE RECURSO ALGUNO POR VIA GUBERNATIVA.

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

EL SECRETARIO DE LA CAMARA DE COMERCIO,

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
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

193

01

68226887

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

Joaquin Esteban R

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
AMPARO QUINTERO ARTEAGA
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

194

STATE OF ILLINOIS

SECRETARY OF STATE

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

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

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
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a Nº 72-35
BOGOTA, D.C. 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 Círculo de Bogotá, domiciliada en Bogotá D.C., con matrícula mercantil No. 00820237 y NIT 860041367-3, domiciliada en la Carrera 4a Nº 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,

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 Nº 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 contendous, 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

© CAVELIER ABOGADOS

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
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

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

Nota:

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 might 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 Blekhman Notary Public

AIDA BLEKHMAN
OFFICIAL SEAL
Notary Public, State of Illinois
My Commission Expires
September 30, 2010

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

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.

196

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

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

AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

Baxter Healthcare SA
P.O. Box / 8010 Zurich / Switzerland
T +41 44 878 60 00 F +41 44 878 65 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

NOTARIAT WALLISELLEN Kt. Zürich

APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Confederación Suiza, Cantón de Zurich
   Confederação Suiça, 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 provisto do sello/carimbo de (da)
   Notariat Wallisellen
   .....
   Certificado
5. En/em 8030 Zurich/Zurique
6. El/no día 18. Dez. 2009
7. Por la Cancillería del Estado del Cantón de Zurich
   pela Chancelaria de Estado do Cantão de Zurique
   Con el número/sob o N.º 228751008
   Sello/timbre/selo — Firma/Assinatura
   D. Brennwald

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

197

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 BLEKHMAN, notario público

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

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 BLEKHMAN
3. quien actúa en su calidad de NOTARIO PÚBLICO, COMISIONADO
4. lleva el sello/estampilla del estado de ILLINOIS

CERTIFICADO

5. Chicago, Illinois 6. el 16 de no
7.
8. por el secretario de estado, estado de I
9. No. C09TJ20887

Eduardo Calado N.

COMO NOTARIA SEXTA DEL CIRCULO DE BOGOTÁ 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
AMPARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.

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 de IGNACIO MARTINEZ DE LECEA NOAIN, nacionalidad: español, en Zurich, conocido mío personalmente MWANAJUMA PIETRINA LUGOGO, nacionalidad: Seuzach, identificado con su pasaporte



Eduardo Calado M.

Quienes aparecon 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

CONSULADO 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 QUINTERO ARTURO NOTARIA

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

Eduardo Cabello Magliera
TRADUCTOR OFICIAL

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

8. Con el número 28675/2009

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 Calad...

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

EDUARDO CALADO
EMBAJADA REPUBLICA FED.
DOCUMENTO RESERVADO
LEGALIZACIONES VARIAS

152191

2010 JAN 14 A 9:49

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

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
ALVARO QUINTERO ARTURO
NOTARIA

EL MOLDE GRAFICAS LTDA - 2009

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.oo -

IVA 16% $ 20.133.oo -

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

ENMENDADO: "140" SI VALE.

NOTARIA GENERAL DE BOGOTA

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO ALGUNO PARA EL USUARIO

CARLOS ALBERTO GALLÓN GIRALDO

C.C. 19.066.428 Bta

TEL. 2116402

Representante Legal de **CAVELIER ABOGADOS**





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

BRL. POD GEN. CAVELIER BAXTER/10.-

200

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

COPIA QUE EXPIDO 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. 10 DE FEBRERO DE 2010

RESOLUCION 01 DE 2008

POR LA NOTARIA SEXTA DE BOGOTA D.C.

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arcila
NOTARIA
NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ

AMPARO QUINTERO ARCILA
NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

CAVELIER
ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA B, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 381 9560

Señora Directora

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

Solicitante : **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

Poder conferido el : 18/01/2010

Yo, OSCAR CORREA, obrando en mi calidad de apoderado principal del solicitante arriba mencionado, atentamente manifiesto a Usted y sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona de la doctora LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, Abogada con Tarjeta Profesional N° 23.555, para continuar con el trámite de la patente del asunto de la referencia.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Directora,

OSCAR CORREA
T.P.A. No. 71.027
C.C. No.79.524.634 de Bogotá

Acepto:

LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. N. 23.555
C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

Colo 13936-843-001-9
DVF/vgc

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA

RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

Bogotá, D.C. 10 FEB 2011

Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,
NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
BOGOTÁ, D.C.

Compareció(ron)

Quien(es) exhibió(eron) la(s) C.C.

Y declaró(aron) que la(s) firma(s) que aparece(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y que el contenido del mismo es cierto.

En constancia se firma esta diligencia.

REPÚBLICA DE COLOMBIA
Amparo Quintero Arturo
NOTARIA
NOTARÍA SEXTA DE BOGOTÁ

202

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

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0030277

Bogotá D.C., Marzo 19 de 2014 - 08:18:44

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	195891286	19/03/2014	18.679.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	515.000.00	515.000.00
				$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-060700- -00000-0000
Fecha: 2014-03-20 16:29:16 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 204

COW 13436 - 841 - 061 5

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:

22) Fecha de solicitud:

(30) Prioridad (31) *Prioridad* (32) *Fecha* (33) *País*
61/527,974 2011/08/26 US

(51) Int Cl: C07K 016/006

(71)Solicitante(s) BAXTER INTERNATIONAL INC
Y BAXTER HEALTHCARE S.A.

(72) Inventor(es) WOLFGANG TESCHNER
Y OTROS

(74) Apoderado: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

(85) Fecha limite inicio fase nacional: 2014/03/26
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 2012/08/27
No. de solicitud PCT/US2012/052567

(87) Publicación internacional
Fecha: 2013/03/07
N° publicación: *WO 2013/033042 A1*

(54) Titulo: **MÉTODO PARA REDUCIR EL POTENCIAL TROMBOEMBÓLICO DE UNA COMPOSICIÓN DE INMUNOGLOBULINA DERIVADA DE PLASMA**

Resumen:

Métodos para reducir la actividad amidolítica y anti-complemento (ACA) de una composición de inmunoglobulina a través del uso de cromatografía de intercambio catiónico. En una forma de realización específica, la invención provee métodos para reducir el contenido de Factor XI y/o Factor XIa y/o ACA en una composición de inmunoglobulina por recolección la porción principal de un eluato de intercambio catiónico. La presente invención también provee una composición de inmunoglobulina con niveles reducidos de actividad amidolítica, Factor XI y/o Factor XIa y/o ACA.

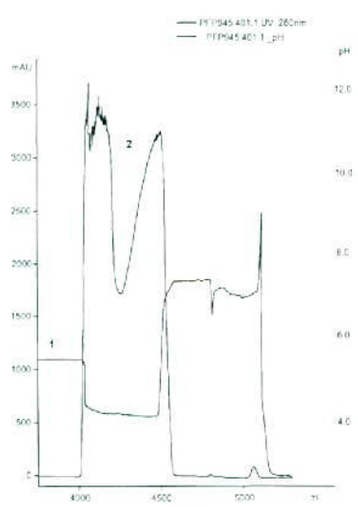


FIG. 2

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 14-060700- -00000-0000

Fecha 2014-03-20 16:29:16 Dep 2020 DIR NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 204

ES 204

00

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODEL

- ☐ 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 INVENCIÓN 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 ☐