

# CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE UN PREPARADO DE GAMMAGLOBULINA SUBCUTÁNEA

## Biochemical characterization of subcutaneous gamma globulin

Adriana I. Oviedo<sup>1</sup>, Noelia Bosio<sup>1</sup>, Romina Rodríguez<sup>1</sup>, Hugo A. Guglielmone<sup>1,2</sup>, María E. Bernardi<sup>1</sup>, María S. Vitali<sup>1</sup>

### RESUMEN

Antecedentes. La GAMMASUB UNC elaborada en el Laboratorio de Hemoderivados - Universidad Nacional de Córdoba, es un medicamento genérico inyectable, cuyo principio activo es la inmunoglobulina normal humana, purificada a partir de una mezcla de donantes de plasma, que posee un amplio espectro de anticuerpos, y es empleada en la terapia de sustitución de anticuerpos en adultos y niños. El presente estudio tiene por objetivo analizar las características fisicoquímicas, biológicas y de seguridad viral en los concentrados de inmunoglobulinas para administración subcutánea, y compararlas con las de un producto comercial disponible en el mercado nacional. Materiales y métodos. Tres lotes de GAMMASUB UNC y dos lotes de producto comercial fueron evaluados de acuerdo a requerimientos regulatorios. Resultados. Las formulaciones analizadas poseen características similares como integridad del fragmento Fc, presencia de todas las subclases de IgG, distribución molecular; niveles bajos de hemaglutininas como también bajas concentraciones de las sustancias procoagulantes, responsables de la mayoría de los eventos tromboembólicos. La ausencia de marcadores virales, la incorporación de un método específico de inactivación viral y el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Fabricación y Control durante la elaboración de las inmunoglobulinas demuestran la seguridad de los concentrados con respecto a la transmisión viral. Discusión. El estudio de caracterización de GAMMASUB UNC demostró que la calidad del producto elaborado por el Laboratorio de Hemoderivados cumple con requerimientos de calidad internacionales como el producto comercial de origen extranjero disponible en el mercado nacional.

**Palabras claves:** gammaglobulina subcutánea; trombogenicidad; propiedades fisicoquímicas; seguridad biológica.

### ABSTRACT

Background. Subcutaneous gamma globulin (GAMMASUB UNC) manufactured in Laboratorio de Hemoderivados - Universidad Nacional de Córdoba, is a generic injectable protein solution whose active principle is human normal immunoglobulin, purified from a pool of plasma donors, which has a broad spectrum of antibodies, and is used in antibody substitution therapy in adults and children in agammaglobulinemia and hypogammaglobulinemia, common variable or combined severe immunodeficiency, and indicated for prophylaxis after exposure to hepatitis A virus by intramuscular route. The main of this study is to analyze the physical-chemical and biological properties and viral safety characteristics of Immunoglobulin concentrates for subcutaneous administration, compared with a commercial product available in national market. Materials and method: Three batches of GAMMASUB UNC and two batches of other commercial sources were evaluated according to regulatory requirement. The analyzed products have similar characteristics such as: integrity of the Fc fragment, presence of all IgG subclasses, molecular distribution, and low levels of haemagglutinins as well as low concentrations of procoagulant substances, responsible for the most thromboembolic events. Absence of viral markers, the incorporation of a specific viral inactivation method and compliance with Good Manufacturing and Control Practices during manufacture of immunoglobulins, demonstrates the safety of the concentrates with respect to viral transmission. Discussion: The GAMMASUB UNC characterization study shows that the quality of a product manufactured by Laboratorio de Hemoderivados meets international quality requirement such as the commercial product from foreign origin available in national market.

**Key words:** subcutaneous gammaglobulin; thrombogenicity; physical and chemical properties; biological safety.

ARCHIVOS DE ALERGI A E INMUNOLOGÍA CLÍNICA 2018;49(2):81-85

## INTRODUCCIÓN

Los concentrados de inmunoglobulinas (Igs) derivados del plasma humano han sido empleados desde hace más de cinco décadas como terapia de reemplazo en pacientes que padecen inmunodeficiencias (ID)<sup>1</sup>. Inicialmente, la vía intramuscular (im) fue la más utilizada, pero debido a los efectos adversos que producía, surgieron nuevas formulaciones que permitieron disponer de concentrados de Igs para ser administrados por la vía intravenosa (iv)<sup>2</sup>. La implementación de esta vía dio origen a nuevas aplicaciones terapéuticas y efectivas como en las ID severas, en enfermedades hematológicas e inflamatorias, en desórdenes neuromusculares, en enfermedades autoinmunes e infecciosas, y en otras que requieren dosis elevadas de Igs provocando menor cantidad de efectos adversos que los detectados con la vía im<sup>3</sup>.

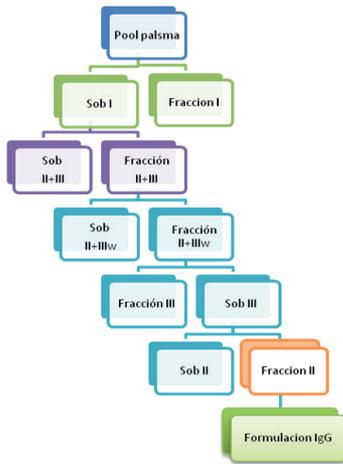
1. Área Desarrollo de Productos y Procesos, Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

2. Departamento de Bioquímica Clínica (CIBICI-CONICET), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Correspondencia: Adriana I. Oviedo, Área Desarrollo de Productos y Procesos; Laboratorio de Hemoderivados, Universidad Nacional de Córdoba. Av Valparaíso s/n. Ciudad Universitaria, X5000HRA Córdoba, Argentina. Te: 0351 433-4122; Fax: 0351 433-4124. Email: aoviedo@hemo.unc.edu.ar

Todos los autores declaran ser empleados de Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba.

Recibido: 21/06/2018 | Aceptado: 14/07/2018



**Figura 1.** Proceso de elaboración de GAMMASUB UNC. Sob: sobrenadante.

A partir de los años '90, se consideró la vía subcutánea (sc) como una alternativa válida de administración para el tratamiento de las ID y desde entonces su uso se ha ido incrementado debido a las ventajas que posee con respecto a las otras vías de administración<sup>4,5</sup>. A través de estudios clínicos, tanto en niños como en adultos, se detectó una menor incidencia de efectos adversos sistémicos, se demostró su eficacia y seguridad<sup>6</sup>, y al evitar el acceso venoso, se hizo posible la administración domiciliaria, evitando la presencia de personal especializado y la permanencia en centros asistenciales<sup>7</sup>. Es importante destacar que se detectaron concentraciones de IgG en sangre más estables y persistentes en el tiempo que las obtenidas con la infusión iv; y generalmente, los efectos adversos estuvieron relacionados con el sitio de inyección<sup>8</sup>.

El Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba (H-UNC) desarrolló GAMMASUB UNC, un concentrado de IgG de administración sc, teniendo en cuenta la demanda nacional de este medicamento y considerando la amplia experiencia en la elaboración de concentrados de Igs, eficaces y seguros, tanto para administración im como iv<sup>9</sup>.

El método de elaboración empleado para la producción de estos medicamentos está basado en el fraccionamiento alcohólico en frío de Cohn-Oncley (Figura 1)<sup>10,11</sup> a partir de una mezcla de plasma humano y la IgG purificada a partir de ella, y cumple con los parámetros de calidad requeridos a nivel nacional e internacional y con las Buenas Prácticas de Fabricación y Control (BPFyC)<sup>12,13</sup>.

El presente estudio tiene por objetivo analizar las características fisicoquímicas, biológicas y de seguridad viral mediante técnicas *in vitro* en los concentrados de GAMMASUB UNC y compararlas con las de un producto comercial con características de calidad similares<sup>14</sup>.

**TABLA I.** Caracterización bioquímica y funcional.

Parámetro	GAMMASUB (n=3)*	Comercial (n=2)*	Criterio de aceptación
Proteínas totales (g%)	16,1±0,2	16,3±1,0	16,0±1,6
pH	6,47±0,03	7,01±0,03	5,0-7,2
Distribución molecular			
• M+D (%)	97,56±0,05	97,56±0,05	≥85
• Polímeros (%)	2,44±0,05	2,44±0,05	≤10
• Fragmentos (%)	ND	ND	
Distribución de subclases IgG			
• IgG <sub>1</sub> (%)	64,2±2,6	60,5 ± 3,5	IgG <sub>1</sub> 60,0 (37-96) <sup>a</sup>
• IgG <sub>2</sub> (%)	30,0±1,9	28,5 ± 3,5	IgG <sub>2</sub> 6,0 (17-55) <sup>a</sup>
• IgG <sub>3</sub> (%)	4,5±0,7	9,0 ± 0,1	IgG <sub>3</sub> 6,3 (3,3-11,8) <sup>a</sup>
• IgG <sub>4</sub> (%)	1,1±0,3	2,0 ± 0,2	IgG <sub>4</sub> 4,3 (0,6-12,3) <sup>a</sup>
IgA (mg%)	0,36±0,02	0,20 <sup>b</sup>	<100
Función Fc (%)	94,0±9,8	105 <sup>b</sup>	≥60
Anti-VHA (UI/ml)	133±21	182 ± 28	≥100
Anticuerpos anti-trestreptolisina O (AELO) (UI/ml)	1089±176	1000 + 283	>500 UI/ml

n: número de lotes analizados. ND: no detectable. M+D: monómeros más dímeros.  
<sup>a</sup>Rango. <sup>b</sup>Resultado de un solo lote. \* Resultados promedio de los lotes analizados.

## MATERIALES Y MÉTODO

### MÉTODO DE ELABORACIÓN

GAMMASUB UNC fue elaborado a partir de plasma de donantes voluntarios, que se controla individualmente en los Bancos de Sangre de origen para marcadores serológicos virales y re-analizados en el H-UNC. La mezcla de plasma, proveniente de más de 1000 donantes sanos<sup>15</sup>, es procesada por precipitación alcohólica y se incluye como método de inactivación viral específico el calentamiento a 60°C durante 10 hs (pasteurización). El producto final es formulado a una concentración proteica de 160 g por litro y previo a su envasado aséptico es filtrado con membranas esterilizantes.

### MUESTRAS

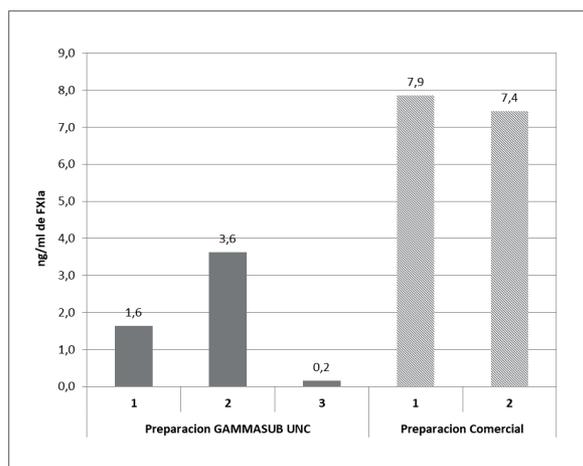
Se evaluaron tres lotes de GAMMASUB UNC al 16% en sus tres presentaciones (3, 10 y 20 ml) y dos lotes de un producto comercial formulado al 16% en una única presentación.

### MÉTODOS DE CONTROL

Las formulaciones se controlaron con los métodos analíticos requeridos en las monografías de Farmacopea Europea 8<sup>va</sup> Edición (FE)<sup>16-18</sup> y además, para completar la caracterización, se emplearon técnicas descritas en otras farmacopeas<sup>19,20</sup>, pero no exigidas para la liberación del producto.

### CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FUNCIONAL

El aspecto de la solución proteica de las preparaciones de Igs



**Figura 2.** Resultados de FXIa en GAMMASUB y comercial (ng/ml).

fue evaluado mediante inspección visual y la determinación del pH se realizó de acuerdo al método 2.2.3 de FE. Mediante el método de Gornall, 2.5.9 de FE, se determinó la concentración de proteínas, empleando como material de referencia una solución de albúmina sérica humana valorada frente al *Bovine Serum Albumin (Standard Reference Material 927d)* (NIST). La distribución molecular (monómeros, dímeros, polímeros y fragmentos de IgG) fue analizada por cromatografía de exclusión (HPLC) según el método 2.2.29 de FE y la composición proteica se analizó por electroforesis zonal en acetato de celulosa, acorde al método 2.2.31 de FE, frente al estándar, *Human Immunoglobulin for Electrophoresis BRP batch 2* (EDQM), que contiene entre 75,7% y 80,9% del total de proteínas con una movilidad electroforética que se corresponde con inmunoglobulina.

Las subclases de IgG y el contenido de Inmunoglobulina A (IgA) fueron cuantificadas mediante técnica de inmunodifusión radial comercial, *IgG Subclass COMBI - SD RID (The Binding Site)*, y *Diffu-Plate Inmunoglobulina A* (Argentina), respectivamente (método 2.7.1 FE).

La integridad del fragmento Fc de las Igs se evaluó de acuerdo al método 2.7.9 de FE, comparativamente con las preparaciones de referencia, *Human Immunoglobulin BRP Code: H09990000 Batch 3* (función Fc intacta) y *Human Immunoglobulin pepsin treated Code: DSP068* (Fc alterada).

Las hemaglutininas anti-A y anti-B, y los títulos de anti-D, fueron determinados por el método de aglutinación directo, de acuerdo a los métodos 2.6.20 y 2.6.26 de FE, respectivamente.

#### DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS

La concentración de anticuerpos Anti Virus de la Hepatitis A (Anti-VHA), se evaluaron por un método de inmunoquimioluminiscencia según 2.6.26 de FE

**TABLA 2.** Factores de la coagulación expresados en UI/ml.

Factores de la coagulación	GAMMASUB (n=3)*	Comercial (n=1)	Control negativo
FII	0,008	0,01	0,007
FVII	0,006	0,008	0,006
FVIII	0,002	0,006	0,004
FIX	0,001	0,001	0,001
FX	ND	0,006	ND
FXI	0,004	0,95	0,004

\*Promedio de los 3 lotes ND: no detectable.

con el *kit* comercial de ARCHITECT HAVAb-IgG-ABBOTT (Abbott, Argentina).

La determinación de anticuerpos anti estreptolisina O (AELO) se realizó mediante una técnica *in vitro* de inhibición de la hemaglutinación con un *kit* comercial (Wiener Lab SAIC, Rosario, Argentina).

#### CONTROL DE ÁCIDO NUCLEICO VIRAL (ANV) Y MARCADORES VIRALES

La seguridad de las Igs fueron evaluadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR *in house*) analizando la presencia del ANv del virus de la hepatitis C (VHC), de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del virus de la hepatitis B (VHB)<sup>21-24</sup>.

Los marcadores serológicos, antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (AgHBs), anticuerpos contra VHC y anticuerpos contra VIH1/2, se analizaron por inmunoquimioluminiscencia con el *kit* comercial de ARCHITECT-ABBOTT, en *minipools* de plasma y pool de partida (2.7.1 FE).

#### ESTUDIOS DE TROMBOGENICIDAD

Como pruebas globales de hemostasia se realizaron la determinación de trombina, midiendo el tiempo de coagulación de plasma normal (6 h a 37°C y 24 h a t.a.), y de factores activados, empleando el Tiempo de Tromboplastina no-activado (NAPTT) según 2.6.22 de FE.

Además, se analizaron las cantidades residuales de factores II, VII y X de la coagulación con métodos coagulométricos en equipos ACL (Instrumentation Laboratory, Parsipany, USA), empleando el tiempo de protrombina (TP) y factores VIII, IX y XI, a través del tiempo de tromboplastina parcialmente activada (APTT)<sup>25</sup>. La actividad del factor XIa (FXIa) se determinó aplicando un método cromogénico (Biophen Hyphen Biomed, Francia).

## RESULTADOS

Los resultados de la caracterización *in vitro* de los 3 lotes de GAMMASUB UNC y de los 2 lotes de producto comercial se muestran en la **Tabla 1**, en la cual se informan los promedios  $\pm$  desviación estándar de los parámetros analizados.

El título de hemaglutininas anti-A y anti-B fue 1/2 para los 3 lotes producidos en H-UNC y resultaron negativas para los 2 lotes del producto comercial, cumpliendo todas las preparaciones con el criterio de aceptación ( $< 1/64$ ). Los títulos de anti-D fueron negativos para todas las muestras analizadas, tanto GAMMASUB UNC como comerciales.

La concentraciones de los factores de la coagulación residuales, que pueden generar trombogenicidad, fueron menores a los límites de detección de las técnicas utilizadas (Tabla 2). Sin embargo, cuando se midieron los niveles de FXI y FXIa, estos fueron detectables en los lotes de la preparación comercial pero no en los productos GAMMASUB UNC (Figura 2).

Los resultados de NAPTT en las muestras analizadas fueron mayores al criterio de aceptación ( $\geq 150$  seg); a excepción de un lote de la preparación comercial que mostró tiempos de coagulación menores a 150 seg (Figura 3). No fue detectable la presencia de trombina en ninguna de las muestras, ya que no hubo coagulación en las condiciones estudiadas.

Los anticuerpos antivirales anti-VIH 1/2, anti-VHC y antígeno de superficie del VHB fueron negativos en todos los productos analizados, y los niveles de ANv por PCR resultaron no reactivos acorde a la sensibilidad de la técnica para cada virus en particular.

Los ensayos de toxicidad, esterilidad y pirógenos realizados en los lotes de GAMMASUB UNC, fueron satisfactorios, cumpliendo con los criterios de aceptación.

## CONCLUSIONES

En el estudio de caracterización de GAMMASUB UNC y del producto comercial de referencia, se detectaron atributos de calidad físicos, químicos y biológicos con características similares. Se demostró que la molécula de IgG se conserva intacta y estable, en todas las preparaciones, a través de la integridad del fragmento Fc, analizadas frente a un estándar de referencia, favoreciendo la flexibilidad normal de la molécula para cumplir las funciones biológicas específicas.

La concentración y distribución de todas las subclases de IgG fueron similares a las detectadas en el plasma humano normal<sup>27</sup>. La distribución molecular analizada por HPLC, demostró que GAMMASUB UNC y el producto comercial poseen el porcentaje de monómero más dímero y polímeros dentro de los criterios de aceptación definidos por FE, lo que evidencia la estabilidad de la molécula a través de los distintos pasos de purificación.

La concentración de anticuerpos Anti-VHA ( $\geq 100$  UI/mL) en ambas formulaciones (GAMMASUB UNC y comercial) es suficiente para utilizarlas como profilaxis contra el virus de la hepatitis A.

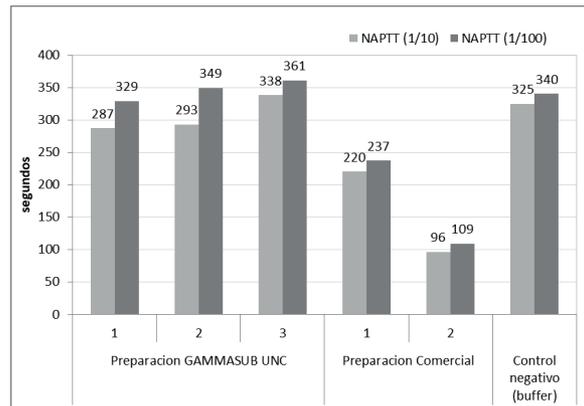


Figura 3. Prueba global de trombogenicidad empleando el NAPTT.

La seguridad de los concentrados de IgG, con respecto a la transmisión de infecciones virales se pone de manifiesto mediante la ausencia de marcadores serológicos y de los ácidos nucleicos virales analizados por PCR *in house*, la cual es una consecuencia del control serológico realizado en el plasma de partida, de la incorporación de métodos de inactivación viral y del cumplimiento de las BPFyC durante su elaboración.

En los últimos años fueron informados eventos tromboembólicos relacionados a la administración intravenosa y/o subcutánea de concentrados de inmunoglobulinas humanas, los que estarían asociados a la presencia de sustancias procoagulantes, principalmente al FXIa. En la evaluación de estos parámetros, se detectó una mayor concentración del FXIa en el producto comercial con respecto a GAMMASUB UNC<sup>28</sup>.

La concentración de IgA en todas las formulaciones analizadas se encontró dentro de los criterios de aceptación previamente establecidos por el fabricante<sup>29</sup>.

Cabe destacar que GAMMASUB UNC posee un amplio espectro de anticuerpos, contra agentes infecciosos característicos de la región, lo que lo hace más recomendable en la profilaxis y terapéutica de infecciones severas y recurrentes tanto en niños como en adultos<sup>30,31</sup>. Además, se controlaron, esterilidad, pirógenos y seguridad en cobayos y ratones (FA 7<sup>ma</sup> Ed), para completar las especificaciones de calidad establecidas en H-UNC.

Los atributos de calidad analizados en el estudio de caracterización demostraron que el nuevo medicamento GAMMASUB UNC mantiene todas sus propiedades y funciones biológicas intactas, cumple con los requerimientos regulatorios nacionales e internacionales y es comparable al producto comercial utilizado como referencia<sup>32,33</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal técnico del Área de Control de Calidad del Laboratorio de Hemoderivados UNC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Rodríguez Lozano A. Gammaglobulina: Aspectos históricos. *Acta Pediatr. Mex.* 2013, 34 (6): 319-322.
2. Dhainaut F, Guillaumat PO, Dibb H, Perret G, et al. In vitro and in vivo properties differ among liquid intravenous immunoglobulin preparations. *Vox Sang.* (2013) 104, 115-126.
3. Matamoros Florí N. El tratamiento con gammaglobulina humana. *Med. Clin. (Barc)* 1995; 104(11): 216-217.
4. Scheffler-Mendoza S. Gammaglobulina e inmunodeficiencias. *Acta Pediatr. Mex.* 2013, 34(6): 323-331.
5. Pleguezuelo D., Sanchez-Ramón S. New choices for treatment with subcutaneous immunoglobulins. *Med. Clin. (Barc)* 2017; 148 (2): 86-90.
6. Gardulf A. Immunoglobulin treatment for primary antibody deficiencies. Advantages of the subcutaneous route. *Biodrugs* 2007; 21(2):105-16.
7. Berger M. Subcutaneous immunoglobulin replacement in primary immunodeficiencies. *Clin Immunol* 2004; 112(1): 1-7.
8. Shapiro R. Why I use subcutaneous Immunoglobulin (SCIG). *J.Clin. Immunol.* 2013; 33 (Suppl 2):S95-S98.
9. AR034994B1 (10/06/2009). Título de Patente de Invención: Procedimiento para la elaboración de Inmunoglobulina G endovenosa y la Inmunoglobulina G humana obtenida.
10. Cohn E, Strong LE, Hughes D, Melin M et al. Preparations and properties of serum and plasma proteins. A systems for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946; 68(3):459-75.
11. Cohn E, Gurd FRN, Barnes BA, Brown RK, Liu CH et al. A system for the separation of the components of human blood: quantitative procedures for separation of protein components of human plasma. *J Am Chem Soc* 1950; 72(1): 465-474
12. Disposición ANMAT 2819/04. Lineamientos generales de Buenas Prácticas de Fabricación para Elaboradores, Importadores/Exportadores de Medicamentos.
13. FDA Guidance for Industry Process Validation: General Principles and Practices 2011.
14. Mersich C., et al. Biochemical characterization and stability of immune globulin intravenosa 10% liquid (Panzyga). *Biologicals* 45 (2017) 33-38.
15. Eur Ph Monograph on human plasma for fractionation (0853) 8<sup>th</sup> Ed.
16. Eur Ph Monograph on Human Normal Immunoglobulin (0338) 8<sup>th</sup> Ed.
17. Eur Ph Monograph on Human Normal Immunoglobulin for Subcutaneous administration 01/2015: 2788). Suppl. 8.3, 8<sup>th</sup> Ed.
18. Pharmeuropa 25.1 Draft Human Normal Immunoglobulin for Subcutaneous Administration.
19. Farmacopea Argentina 7<sup>ma</sup> Ed.
20. Pharmacopoeia United States 37th Ed.
21. Rodríguez Lombardi G., Oviedo A, Freytes F, Zarzur J, Guglielmo H, Vitali MS. Implementation of an 'in-house' PCR assay validated for the detection of hepatitis C virus RNA. *Transfus Med.* 2008; 18(5): 317-319.
22. Rodríguez Lombardi G., Oviedo A, Reyna L., Vitali MS, Genti Raimondi S. An internal control applied to RT-PCR detection of HCV and HIV-1 in human pooled plasma and plasma-derived medicinal products. *Biocell* 2015, 39 (2-3): 15-23.
23. Serie de Informes Técnicos de la OMS, Norma 840, Informe 43 (Ginebra 1994, 15.3 y 15.8, pag. 62-64).
24. EMA/CHMP/CUMP/QWP/70278/2012- Rev.1 Guideline on Process Validation.
25. Pharmaeuropa Vol. 23, 623 Official Announcement Rapid Implementation. n° 23, oct 2011.
26. Samuelsson A., towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 2001; 291: 484- 6.
27. Sisti A., Vitali S., Manfredi J., Zarzur J. Preparation of lyophilized intravenous immunoglobulin G: development and scale-up. *Vox Sanguinis* (2001) 80, 216-224.
28. Oviedo A, Bernardi ME, Guglielmo H, Vitali MS. Absence of in vitro Procoagulant Activity immunoglobulin Preparations due to Activated Coagulation Factors. *Transfus Med. Hemother.* 2015, 42(6): 397 – 402.
29. Rachid R, The role of anti-IgA antibodies in causing adverse reactions to gammaglobulin infusion in immunodeficient patients. *J. Allergy Clin Immunol.* 2012; 129(3):628-634.
30. Siegel J. The product: all intravenous immunoglobulins are not equivalent. *Pharmacotherapy* 2005; 25 (11 Pt 2): 78S-84S.
31. Abolhassani H, Sadaghiani MS, Aghamohammadi A, et al. Home-based Subcutaneous Immunoglobulin versus hospital-based intravenous immunoglobulin in treatment of primary antibody deficiencies: systematic review and meta analysis. *J. Clin. Immunol* (2012) 32: 1180-1192.
32. Sisti A., Vitali S., Manfredi J., Zarzur J. Inmunoglobulina G endovenosa: características de un medicamento elaborado en Argentina. *Archivos Argentinos de alergia e Inmunología clínica* 2000, vol.31 n°4.
33. Buchacher A, Kaar W. Intravenous immunoglobulin G from human plasma- purification concepts and important quality criteria. En: Production of plasma proteins for therapeutic use. Bertolini J, Gross N., Curling J. Editors. 1<sup>ra</sup> Ed. New Jersey: Wiley J. and Sons, Inc., 2013. pp. 185-206.