(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201500848 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.06.30

(22) Дата подачи заявки
2010.05.27

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
B01J 20/10 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ IgG-КОМПОЗИЦИИ ИЗ ПЛАЗМЫ

(31) **2010202125**
(32) **2010.05.26**
(33) **AU**
(62) **201291355; 2010.05.27**

(71) Заявитель:
БАКСТЕР ИНТЕРНЭШНЛ ИНК. (US); БАКСТЕР ХЕЛТКЭР С.А. (CH)

(72) Изобретатель:
Брукшвайгер Леопольд, Сфатос Соня, Нюрнбергер Юлиа, Тешнер Вольфганг, Буттервек Харальд Арно, Шварц Ханс-Петер, Гундингер Томас, Кельбль Бернхард, Граузенбургер Райнхард, Плевляковиц Азра (AT)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предлагаются усовершенствованные способы производства иммуноглобулиновых препаратов для внутривенного введения. Эти способы предлагают различные преимущества, такие как снижение потери IgG во время очистки и повышение качества готовых продуктов. В других аспектах в настоящем изобретении предлагаются водные и фармацевтические композиции, пригодные для внутривенного, подкожного и/или внутримышечного введения. В еще одних вариантах воплощения в настоящем изобретении предлагаются способы лечения заболевания или состояния, содержащие введение IgG-композиции, предложенной здесь.

201500848 A1

201500848 A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБОГАЩЕННОЙ IGG-КОМПОЗИЦИИ ИЗ ПЛАЗМЫ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Иммуноглобулиновые продукты из человеческой плазмы впервые были использованы для лечения иммунодефицита в 1952. Первоначально методами выбора были внутримышечное или подкожное введение Иммуноглобулина изотипа G (IgG). Для эффективного лечения различных заболеваний были необходимы введения больших количеств IgG, однако, были разработаны продукты для внутривенного введения, имеющие меньшие концентрации IgG (50 мг/мл). Как правило, иммуноглобулин для внутривенного введения (IVIG) содержит смешанные иммуноглобулины G (IgG) плазмы более чем тысячи доноров крови. Как правило, в них содержится более 95% немодифицированного IgG с интактными Fc-зависимыми эффекторными функциями, и лишь следовые количества иммуноглобулина A (IgA) или иммуноглобулина M (IgM), IVIG являются стерильными, очищенными IgG-продуктами, используемыми в основном для лечения трех основных категорий медицинских состояний: (1) иммунодефицитные состояния, такие как агаммаглобулинемия, сцепленная с X-хромосомой, гипогаммаглобулинемия (первичные иммунодефицитные состояния) и приобретенные состояния ослабленного иммунитета (вторичные иммунодефицитные состояния), характеризующиеся низкими уровнями антител; (2) воспалительные и аутоиммунные заболевания; и (3) острые инфекции.

[0002] В частности, у многих людей с первичными иммунодефицитными нарушениями отмечается нехватка антител, необходимых для противостояния инфекции. В определенных случаях для поддержки при этих иммунодефицитных состояниях могут осуществляться инфузии очищенного IgG, как правило, внутривенно (т.е. IVIG-терапия). Некоторые первичные иммунодефицитные состояния часто лечатся таким образом, включая Агаммоглобулинемию, сцепленную с X-хромосомой (XLA), вариабельный неклассифицируемый иммунодефицит (CVID), Гипер-IgM Синдром (HIM), Тяжелый Комбинированный Иммунодефицит (ТКИД) и некоторые недостаточности IgG-подкласса (Blaese and Winkelstein, J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007).

[0003] Хотя IVIG-терапия может быть очень эффективна для удержания под контролем первичных иммунодефицитных состояний, эта терапия лишь временно заменяет антитела, не производящиеся в организме, а не излечивает болезнь. Соответственно, пациенты, зависящие от IVIG-терапии, нуждаются в повторных дозах, как правило, раз в месяц в течение всей жизни. Эта необходимость обуславливает большой запрос в продолжительном производстве IVIG-композиций. Однако, в отличие от других биологических препаратов, получаемых экспрессией рекомбинантных ДНК-векторов *in vitro*, внутривенные иммуноглобулины выделяются из донорской человеческой крови и плазмы. Поэтому количество продуктов внутривенных имуноглобулинов не может быть увеличено простым повышением объема производства. А точнее,

количество доступных в продаже внутривенных иммуноглобулинов ограничено доступными источниками донорской человеческой крови и плазмы.

[0004] Несколько факторов влияют на нужду во внутривенных иммуноглобулинах, включая принятие IVIG-терапии, идентификацию дополнительных показаний, при которых IVIG-терапия эффективна, и повышение диагностики у пациентов состояний с назначением внутривенных иммуноглобулинов. Известно, что общая потребность во внутривенных иммуноглобулинах увеличилась более чем в четыре раза с 1990 г. и растет в настоящее время со скоростью приблизительно 7%–10% в год (Robert P., *Pharmaceutical Policy and Law*, 11 (2009) 359-367). К примеру, Австралийская Национальная Служба Крови сообщила о том, что потребность во внутривенных иммуноглобулинах увеличилась в Австралии на 10,6% в течение 2008-2009 фискального года (National Blood Authority Australia Annual Report 2008-2009).

[0005] В частности, из-за повышения общей потребности и колебаний в доступных поставках иммуноглобулиновых продуктов некоторые страны, включая Австралию и Англию, ввели программы управления спросом для обеспечения поставок при нехватке этих продуктов пациентам, наиболее нуждающимся в них.

[0006] Сообщалось о том, что в 2007 было фракционировано 26,5 млн. литров плазмы, было выделено 75,2 метрических тонн внутривенных иммуноглобулинов со средним выходом 2,8 граммов с литра (Robert P., выше). В том же отчете были приведены оценки того, что общий выход внутривенных иммуноглобулинов достигнет приблизительно 3,43 грамма с литра к 2012 г. Тем не менее, вследствие продолжающегося роста общей потребности во внутривенных иммуноглобулинах, прогнозируемого на уровне приблизительно 7%–13% в год между настоящим временем и 2015, для удовлетворения глобального спроса требуется дальнейшее повышение выхода внутривенных иммуноглобулинов.

[0007] Поставщиками внутривенных иммуноглобулинов используется ряд способов получения внутривенных иммуноглобулинов. Одна из общих проблем нынешних способов получения IVIG — значительная потеря IgG при процессе очистки, оцениваемая по меньшей мере в 30%–35% от общего содержания IgG в исходном материале. Одно из затруднений — обеспечить надлежащую инактивацию вирусов и отсутствие примесей, способных вызвать нежелательные реакции, при поднятии выхода IgG. На нынешних уровнях производства внутривенных иммуноглобулинов то, что может считаться небольшим повышением выхода, на самом деле, имеет большое значение. К примеру, на уровне производства 2007 года 2%-е повышение эффективности, равное дополнительным 56 миллиграммам с литра, дало бы дополнительные 1,5 метрические тонны внутривенных иммуноглобулинов.

[0008] В четвертом выпуске серии оригинальных работ о приготовлении и свойствах белков плазмы Cohn et al. (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475) впервые описали способы спиртового

фракционирования белков плазмы (способ 6), который позволяет выделять фракцию, обогащенную IgG, из человеческой плазмы. Несколькими годами позже Oncley et al. (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550) на основе способов Cohn разработали способ (способ 9), обеспечивавший выделение более чистого препарата IgG.

[0009] Хотя эти способы лежали в основании целой отрасли производства полученных из плазмы факторов крови, по ним не было возможно получать IgG-препараты с достаточно высокими концентрациями для лечения ряда иммунных заболеваний, включая синдром Кавасаки, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру и первичные иммунодефицитные состояния. В связи с этим были разработаны дополнительные способы, использующие различные техники, такие как ионообменная хроматография, для обеспечения большей чистоты и более высокой концентрации IgG-составов. Hoppe et al. (*Munch Med Wochenschr* 1967 (34): 1749-1752), Falksveden (Патент Швеции № 348942) и Falksveden и Lundblad (*Methods of Plasma Protein Fractionation* 1980) были одними из первых, кто предложил использовать ионообменную хроматографию для этой цели.

[0010] В различных современных способах используется этап осаждения, такой как каприлатное осаждение (Lebing et al, *Vox Sang* 2003 (84):193-201) и осаждение этанолом Фракции Cohn (I+)II+III (Tanaka et al., Braz J Med Biol Res 2000 (33) 37-30) вместе с колоночной хроматографией. Teschner et al. (Vox Sang, 2007 (92):42-55) недавно описали способ производства 10% IVIG-препарата, при котором вначале от объединенной плазмы отделяется криоосадок, а затем производится модифицированное фракционирование по Cohn-Oncley с холодным этанолом с последующими обработкой интермедиата растворителем/детергентом, ионообменной хроматографией, нанофильтрацией и, необязательно, ультрафильтрацией/диафильтрацией.

[0011] Тем не менее, несмотря на повышенные чистоту, безопасность и выход, обеспечиваемыми этими способами производства IgG, значительное количество IgG все еще утрачивается во время процесса очистки. К примеру, Teschner et al. сообщали о том, что по их способу достигается повышение выхода IgG на 65% (Teschner et al, выше). Как сообщалось на различных конференциях, посвященных препаратам плазмы, средние выходы крупномасштабного производства IgG, такого как у Baxter, CSL Behring, Upfront Technology, Cangene, Prometric BioTherapeutics, и Finnish Red Cross, вырьируются от приблизительно 61% до приблизительно 65% в конечном контейнере. Это означает, что по меньшей мере приблизительно треть IgG, присутствующего в объединенной фракции плазмы утрачивается при производственном процессе.

[0012] По этой причине существует необходимость в усовершенствованных и более эффективных способах производства IVIG-препаратов. Настоящее изобретение удовлетворяет этим и другим требованиям, предлагая способы производства IVIG, обеспечивающие выходы, по меньшей мере на 6–10% превышающие выходы, достигаемые в настоящее время, а также IVIG-композиции, полученные по ним.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0013] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы получения из плазмы обогащенных IgG-композиций (например, IVIG-композиций). Способы, предложенные здесь, выгодно отличаются тем, что они обеспечивают существенное улучшение в сравнении с нынешним состоянием в области способов производства IVIG-композиций. К примеру, способы, предложенные здесь, позволяют повысить выход IgG в финальной общей композиции без утраты чистоты, необходимой для внутривенного введения.

[0014] В одном аспекте предлагается способ получения из плазмы обогащенной IgG-композиции, включающий этапы: (а) осаждения криосупернатантной плазменной фракции на первом этапе осаждения при помощи приблизительно 6%–10%-го спирта при pH приблизительно 7,0–7,5 с получением первого осадка и первого супернатанта, (б) осаждения IgG из первого супернатанта на втором этапе осаждения при помощи приблизительно 20%–25%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением второго осадка, (в) ресуспендирования второго осадка с получением суспензии, (г) осаждения IgG из суспензии, полученной на этапе (в), на третьем этапе осаждения при помощи приблизительно 22%–28%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением третьего осадка, (д) ресуспендирования третьего осадка с получением суспензии, и (е) отделения растворимой фракции из суспензии, полученной на этапе (д) , с получением обогащенной IgG-композиции, отличающийся тем, что по меньшей мере один из первого этапа осаждения, второго этапа осаждения, третьего этапа осаждения включает добавление спирта путем распыления. В одном варианте воплощения спирт добавляется на первом этапе осаждения путем распыления. В ином варианте воплощения спирт добавляется на втором этапе осаждения путем распыления. В еще одном варианте воплощения спирт добавляется на третьем этапе осаждения путем распыления.

[0015] В определенных вариантах воплощения pH одного или более растворов может корректироваться добавлением изменяющего pH агента путем распыления. В родственных вариантах воплощения pH на по меньшей мере одном из первого этапа осаждения, второго этапа осаждения или третьего этапа осаждения достигается добавлением pH-модифицирующего раствора после добавления спирта или до и после добавления спирта, во время и после добавления спирта или до, во время и после добавления спирта. В еще одном родственном варианте воплощения pH на этапе осаждения может поддерживаться для полноты реакции осаждения длительным корректированием pH.

[0016] В одном определенном варианте воплощения pH на первом этапе осаждения корректируется после добавления спирта добавлением pH-модифицирующего агента путем распыления. В ином варианте воплощения pH на втором этапе осаждения корректируется после добавления спирта добавлением pH-модифицирующего агента путем распыления. В еще одном

варианте воплощения pH на третьем этапе осаждения корректируется после добавления спирта добавлением pH-модифицирующего агента путем распыления.

[0017] Дополнительно способы приготовления, предложенные здесь, могут, помимо этого, включать этап ионообменной хроматографии (например, анионообменной и/или катионообменной хроматографии), этап нанофильтрации, этап ультрафильтрации/диафильтрации или любой иной подходящей техники очистки для дальнейшего повышения чистоты или качества IVIG-препаратов.

[0018] В другом аспекте предлагается способ получения обогащенной IgG-композиции из плазмы, содержащий этапы: (а) корректирования pH криосупернатантной плазменной фракции до или приблизительно до 7,0, (б) корректирования концентрации этанола в криосупернатантной плазменной фракции этапа (а) до или приблизительно до 25% (об./об.) при температуре, между или равной приблизительно -7°C и приблизительно -9°C, с получением смеси, (в) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (б), (d) ресуспендирования осадка, полученного на этапе (в), в буфере, содержащем фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, равным или приблизительно равным 600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением суспензии, (д) смешивания тонко измельченного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией, полученной на этапе (г) , в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут, (е) фильтрования суспензии на фильтр-прессе с получением фильтрата, (ж) промывания фильтр-пресса по меньшей мере 3 мертвыми объемами фильтр-пресса буфера, содержащего фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, равным или приблизительно равным 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением промывного раствора, (з) смешивания фильтрата, полученного на этапе (е) , с промывным раствором, полученным на этапе (ж) , с получением раствора, и обработки раствора поверхностно-активным веществом, (и) доведения pH раствора, полученного на этапе (з) , до уровня в или приблизительно в 7,0 и добавления этанола до финальной концентрации, равной или приблизительно равной 25%, с получением осадка, (к) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (и) , (л) растворения осадка в водном растворе, содержащем растворитель или поверхностно-активное вещество, и выдерживания раствора по меньшей мере в течение 60 минут, (м) прохождения раствора с этапа (л) через катионообменную хроматографическую колонну и элюирования в элюат белков, абсорбированных в колонне, (н) прохождения элюата, полученного на этапе (м) , через анионообменную хроматографическую колонну для получения эффлюента, (о) прохождения эффлюента с этапа (н) через нанофильтр для получения нанофильтрата, (п) прохождения нанофильтрата, полученного на этапе (о) , через ультрафильтрационную мембрану для получения ультрафильтрата; и (р) диафильтрации ультрафильтрата, полученного на этапе (п) , против диафильтрационного буфера для получения диафильтрата с концентрацией белка между приблизительно 8% (в./об.) и приблизительно 12% (в/об.) с получением композиции концентрированного IgG.

[0019] В ином аспекте в настоящем изобретении предлагаются водные IgG-композиции, полученные способами, описанными здесь. В общем IgG-композиции имеют высокую чистоту (например, по меньшей мере 95%, 98%, 99% или большее содержание IgG), содержат белки в концентрациях приблизительно от 20 г/л приблизительно до 200 г/л и содержат чрезвычайно низкие уровни обычных загрязнителей IVIG, таких как IgG, IgM, Фибриноген, Трансферрин, антикардиолипиновые антитела, обладают низкой амидолитической активностью, активностью активатора прекалликреина и т. п.

[0020] В еще одном аспекте предлагаются фармацевтические IgG-композиции и составы, пригодные для использования в IVIG-терапии. Фармацевтические составы имеют высокую чистоту (например, по меньшей мере 98%, 99% или большее содержание IgG), содержат белки в концентрациях приблизительно от 20 г/л до приблизительно 200 г/л и содержат чрезвычайно низкие уровни обычных загрязнителей IVIG, таких как IgG, IgM, Фибриноген, Трансферрин, антикардиолипиновые антитела, обладают низкой амидолитической активностью, PKA и т. п. В общем фармацевтические композиции правильно составлены для внутривенного введения (например, для IVIG-терапии), подкожного введения иди внутримышечного введения.

[0021] В другом аспекте в настоящем изобретении предлагаются способы лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у людей, нуждающихся в этом, способы, включающие введение фармацевтической композиции, описанной здесь. Неограничивающие примеры заболеваний и состояний, которые могут лечиться или контролироваться способами, предложенными здесь, включают аллогенную пересадку костного мозга, хроническую лимфоцитную лейкемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), ВИЧ у детей, первичные иммунодефицитные состояния, болезнь Кавасаки, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП), пересадку почки реципиенту с высоким уровнем антител или от ABO-несовместимого донора, синдром хронической усталости, колит, вызванный Clostridiumdifficile, дерматомиозит и полимиозит, офтальмопатию Грейвса, синдром Гийена-Барре, мышечную дистрофию, миозит с включёнными тельцами, синдром Ламберта–Итона, красную волчанку, мультифокальную моторную нейропатию, множественный склероз (МС), тяжелую миастению, неонатальную аллоиммунную тромбоцитопению, инфекцию Парвовирусом B19, пузырчатку, послетрансфузионную пурпуру, отторжение трансплантата почки, самопроизвольный аборт/выкидыш, синдром мышечной скованности, опсоклонус Миоклонус, тяжелый сепсис и септический шок у критически больных взрослых, токсический эпидермальный некролиз, хронический лимфолейкоз, множественную миелому, агаммаглобулинемию, сцепленную с Х-хромосомой, гипогаммаглобулинемию, первичный иммунодефицит, рецидивирующе-ремиттирующий рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0022] **Фигура 1:** Концентрация IgG, определенная ELISA (▲) и нефелометрическим (•) способами, и общее содержание белка (■), присутствующее в фильтрате смыва Фракции II+III как функция количества мертвых объемов буфера, использованного для промывания фильтровального устройства после фильтрования.

[0023] **Фигура 2:** Средняя активность активатора прекалликреина в растворимых фракциях осадка G после экстракции и осветления при pH 3,8–5,0, при добавлении уксусной кислоты в присутствии и в отсутствие обработки Аэросилом (кремния диоксидом).

[0024] **Фигура 3:** Среднее содержание фибриногена в растворимых фракциях осадка G после экстракции и осветления при pH 3,8–5,0, при добавлении уксусной кислоты в присутствии и в отсутствие обработки Аэросилом (кремния диоксидом).

[0025] **Фигура 4:** Средняя амидолитическая активность в растворимых фракциях осадка G после экстракции и осветления при pH 3,8–5,0, при добавлении уксусной кислоты в присутствии и в отсутствие обработки Аэросилом (кремния диоксидом).

[0026] **Фигура 5:** Амидолитическая активность в растворимых фракциях Осадка G, экстрагированных и осветленных при pH 3,8–7,8 после инкубирования в течение двух недель при 4°C (♦) или в течение дополнительной недели при комнатной температуре (■).

[0027] **Фигура 6:** Активность активатора прекалликреина в растворимых фракциях Осадка G, экстрагированных и осветленных при pH 3,8–7,8.

[0028] **Фигура 7**: Разность в чистоте фильтрата модифицированной фракции II+III с обработкой высокодисперсным кремнеземом и без нее. Хроматограмма электрофореза на ацетате целлюлозы фильтрата модифицированной фракции II+III, **(A)** осветленного только фильтровальным порошком и **(B)** осветленного после обработки высокодисперсным кремнеземом.

[0029] **Фигура 8:** Сдвиг pH с 6,9 супернатанта Фракции II+III после добавления спирта-осадителя при крупномасштабном производстве IgG.

[0030] **Фигура 9:** Количество ледяной уксусной кислоты *versus* pH в экстракционном буфере осадка модифицированной Фракции II+III.

[0031] **Фигура 10:** Количество ледяной уксусной кислоты versus pH в пост-промывочном буфере фильтра суспензии модифицированной Фракции II+III.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[0032] При использовании здесь «антитело» обозначает полипептид, в большей степени кодируемый геном иммуноглобулина или генами иммуноглобулина, либо его фрагменты, которые специфически связываются с аналитом (антигеном) и распознают его. Распознанные гены иммуноглобулина включают гены каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эпсилон и мю константных областей, а также большое число вариабельных генов иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются на типы каппа и лямбда. Тяжелые цепи подразделяются на типы гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно.

[0033] Структурная единица примерного иммуноглобулина (антитела) составлена из двух пар полипептидных цепей, в каждой из пар имеется одна «легкая» (приблизительно 25 кДа) и одна «тяжелая» цепь (приблизительно 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет вариабельную область из приблизительно 100–110 или более аминокислот, в первую очередь, ответственную за распознавание антигена. Термины вариабельная легкая цепь (V_L) и вариабельная тяжелая цепь (V_H) обозначают эти легкую и тяжелую цепи, соответственно.

[0034] При использовании здесь термин «ультрафильтрация (УФ)» охватывает множество способов мембранной фильтрации, при которых гидростатическое давление продавливает жидкость через полупроницаемую мембрану. Суспендированные твердые частицы и растворенные высокомолекулярные молекулы удерживаются, в то время как вода и низкомолекулярные растворенные вещества проходят через мембрану. Этот процесс разделения часто используется для очистки и концентрирования растворов макромолекулярных (10^3-10^6 Да) веществ, в частности, белковых растворов. Доступны разные мембраны для ультрафильтрации, в зависимости от размера удерживаемых молекул. Ультрафильтрация, как правило, характеризуется размером пор мембран 1–1000 кДа и рабочими давлениями 0,01–10 бар и особенно пригодна для отделения коллоидных веществ типа белков от низкомолекулярных веществ типа сахаров и солей.

[0035] При использовании здесь термин «диафильтрация» проводится с теми же мембранами, что и ультрафильтрация, и представляет собой фильтрацию в тангенциальном потоке. При диафильтрации буфер вводится в рециркуляционный бак, а фильтрат удаляется из работы блока. В процессах, при которых продукт находится в ретентате (к примеру, IgG), диафильтрация вымывает компоненты продукта в фильтрат, обменивая буферы и понижая концентрацию нежелательных видов.

[0036] При использовании здесь термин «приблизительно» обозначает примерный интервал выше или ниже на 10% от указанной величины. К примеру, выражение «приблизительно 20%» охватывает интервал 18-22%.

[0037] При использовании здесь термин «смешивание» обозначает действие по вызыванию равного распределения двух или более раздельных соединений или веществ путем любого перемешивания. В результате «смешивания» в значении, используемом в данной заявке, не требуется полное равное распределение всех компонентов раствора или суспензии.

[0038] При использовании здесь термин «растворитель» охватывает любое жидкое вещество, способное растворять или диспергировать одно и более других веществ. Растворитель может быть неорганической природы, таким как вода, либо может быть органической жидкостью, такой как этанол, ацетон, метилацетат, этилацетат, гексан, петролейный эфир *и т.д.* При использовании термина «обработка растворителем/детергентом» растворитель обозначает органический растворитель *(например,* три-N-бутилфосфат), входящий в состав смеси растворителя и детергента, используемой для инактивации вирусов с липидной оболочкой, находящихся в растворе.

[0039] При использовании здесь термин «детергент» используется в данной заявке взаимозаменяемо с термином «сурфактант» или «поверхностно-активное вещество». Сурфактанты, как правило, являются амфифильными органическими соединениями, *т.е.* содержащими обе гидрофобные группы («хвосты») и гидрофильные группы («головные части»), которые делают сурфактанты растворимыми как в органических растворителях, так и в воде. Сурфактанты могут классифицироваться в зависимости от наличия формально заряженных групп в их головных частях. Неионные сурфактанты не имеют заряженных групп в их головных частях, а в ионных сурфактантах головные части несут суммарный заряд. Цвиттерионные сурфактанты содержат головную часть с двумя противоположно заряженными группами. Некоторые примеры обычных сурфактантов включают: анионные (основанные на сульфатном, сульфонатном или карбоксилатном анионах): перфтороктаноат (PFOA или PFO), перфтороктансульфонат (PFOS), натрия додецилсульфат (SDS), аммония лаурилсульфат и другие алкилсульфатные соли, натрия лауретсульфат (также известный как натрия лаурилового эфира сульфат или SLES), алкилбензолсульфаонат; катионные (основанные на катионах четвертичного аммония): цетилтриметиламмония бромид (CTAB), также называемый как гексадецилтриметиламмония бромид, и другие соли алкилтриметиламмония, цетилпиридиния хлорид (CPC), полиэтоксилированные жирные амины (POEA), бензалкония хлорид (BAC), бензетония хлорид (BZT); длинноцепочечные жирные кислоты и их соли: включая каприлат, каприловую кислоту, гептаноат, гексановую кислоту, гептановую кислоту, нонановую кислоту, декановую кислоту и т.д.; цвиттерионные (амфотерные): додецилбетаин; кокамидопропилбетаин; кокоамфоглицинат; неионные: алкилполи(этиленоксид), алкилфенолполи(этиленоксид), кополимеры поли(этиленоксида) и поли(пропиленоксид) (в продаже известны как Полоксамеры или Полоксамины), алкилполиглюкозиды, включая октилглюкозид, децилмальтозид, жирные спирты *(например,* цетиловый спирт и олеиновый спирт), кокамид MEA, кокамид DEA, полисорбаты (Твин 20, Твин 80 *и т.д.),* детергенты Тритон и додецилдиметиламина оксид.

[0040] При использовании здесь термин терапия со «внутривенными иммуноглобулинами» или «IVIG» относится в общем к терапевтическому способу внутривенного, подкожного или внутримышечного введения композиции IgG иммуноглобулинов пациенту для лечения количества состояний, таких как иммунодефицитные, воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания. IgG-иммуноглобулины, как правило, смешаны и приготовлены из плазмы. Могут использоваться целые антитела или фрагменты. IgG-иммуноглобулины могут находиться в больших концентрациях *(например,* более 10%) для подкожного введения или входить в состав для внутримышечного введения. Это особенно часто используется для специальных IgG-препаратов, изготовленных с превышающими средние титрами к специфическим антигенам *(например,* фактору Rho D, коклюшному токсину, столбнячному токсину, ботулиновому токсину, бешенству *и т.д.).* Для простоты обсуждения в данной заявке каждая IgG-композиция, составленная для подкожного или внутримышечного введения, также включена в термин «IVIG».

[0041] Под «терапевтически эффективным количеством или дозой» или «достаточным/эффективным количеством или дозой» понимается доза, которая производит эффекты, для которых она вводится. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет определена специалистом в области техники по известным методикам *(см., например,* Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и *Remington: The Science and Practice of Pharmacy,* 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0042] При использовании в данной заявке термин «распыление» обозначает способ доставки жидкого вещества в систему, *например,* во время этапа спиртового осаждения, такого как модифицированное фракционирование I по Cohn или этап осаждения II+III, в виде мелких капель или тумана из жидкого вещества. Распыление может быть достигнуто при помощи любого устройства, находящегося под давлением, такого как контейнер *(например,* аэрозольный баллон), оснащенный распылительной головкой или наконечником, и работающего в ручном или автоматическом режиме для превращения жидкости в мелкий туман. Как правило, распыление проводится в то время, когда система, в которую вводится жидкое вещество, постоянно двигается или иначе перемешивается, для того, чтобы обеспечить быстрое и равномерное распределение жидкости в системе.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Обзор

[0043] По стандартной практике в современной медицине стерилизованные препараты концентрированных иммуноглобулинов (особенно IgG) используются для лечения медицинских состояний трех основных классов: иммунодефицитных состояний, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, а также острых инфекций. Один из обычно используемых IgG-продуктов - иммуноглобулин для внутривенного введения или IVIG - составляется для

внутривенного введения, к примеру, с концентрацией в или приблизительно в 10% IgG. Концентрированные иммуноглобулины также могут быть составлены для подкожного или внутримышечного введения, к примеру, с концентрацией в или приблизительно в 20% IgG. Для простоты обсуждения в данной заявке каждая IgG композиция, составленная для подкожного или внутримышечного введения, также включена в термин «IVIG».

[0044] В определенных аспектах в настоящем изобретении предлагаются способы производства IVIG, повышающие итоговый выход продукта, а также позволяющие получить IVIG-композиции такого же или более высокого качества, а в некоторых случаях — более высоких концентраций. В одном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагаются модифицированные способы разделения по Cohn, позволяющие снизить потерю IgG на одном или более этапов осаждения.

[0045] В ином аспекте в настоящем изобретении предлагаются водные IgG композиции, полученные согласно улучшенным производственным способам, предложенным здесь. Преимуществом служит то, что эти композиции менее дороги в производстве в сравнении с продуктами, доступными в продаже в настоящее время в связи с повышенным выходом, который может быть достигнут способами, предложенными здесь. Помимо этого, эти композиции так же чисты, если не более чисты, как и композиции, произведенные промышленными методами. Важно, что эти композиции пригодны для использования в IVIG-терапии иммуннодефицитных состояний, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, и острых инфекций. В одном варианте воплощения концентрация IgG-композиции равна или примерно равна 10% IgG для внутривенного введения. В другом варианте воплощения концентрация IgG-композиции равна или примерно равна 20% для подкожного или внутримышечного введения.

[0046] В ином аспекте в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции и составы IgG-композиций, полученные согласно улучшенным производственным принципам, представленным здесь. В определенных вариантах воплощения эти композиции и составы обладают улучшенными свойствами в сравнении с иными IVIG-композициями, имеющимися сейчас в продаже. К примеру, в определенных вариантах воплощения композиции и составы, предложенные здесь, стабильны в течение длительного периода времени.

[0047] В еще одном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ лечения иммунодефицитных состояний, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, и острых инфекций, содержащий введение IgG-композиции, изготовленной по улучшенным способам, представленным здесь.

II. Способы производства IVIG

[0048] В общем иммуноглобулиновые препараты по настоящему изобретению могут быть изготовлены из любых подходящих исходных материалов, к примеру, восстановленной плазмы

или исходной плазмы. В типичном примере кровь или плазма берется у здоровых доноров. Обычно кровь берется у того же вида животного, что и субъект, которому будет вводиться иммуноглобулиновый препарат (его обычно называют «гомологичными» иммуноглобулинами). Иммуноглобулины выделяются из крови при помощи пригодных процедур, таких как, к примеру, осаждение (спиртовое разделение или разделение с полиэтиленгликолем), хроматографические методы (ионообменная хроматография, аффинная хроматография, иммуноаффинная хроматография *и т.д.),* ультрацентрифугирование и электрофорезное приготовление, и т.д. *(См., например,* Cohn *et al., J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Oncley *et al., J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Barundern *et al., Vox Sang.* 7:157-74 (1962); Koblet *et al., Vox Sang.* 13:93-102 (1967); Патенты США под номерами 5122373 и 5177194, раскрытие которых включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки для всех целей).

[0049] Во множестве случаев иммуноглобулины изготавливаются из гамма-глобулин-содержащих продуктов, полученных способами спиртового разделения и/или ионообменной и аффинной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области техники. К примеру, очищенная Фракция Cohn II часто используется в качестве исходного материала для выделения иммуноглобулинов. Исходная паста Фракции Cohn II, как правило, содержит приблизительно 95 процентов IgG и включает четыре подтипа IgG. Различные подтипы присутствуют во Фракции II приблизительно в тех же соотношениях, что и в смешанной человеческой плазме, из которой их получают. Фракцию II далее очищают перед добавлением в продукт, предназначенный для введения. К примеру, паста Фракции II может быть растворена в холодном очищенном водном растворе спирта, а примеси будут удалены при осаждении и фильтровании. После последнего фильтрования суспензия иммуноглобулинов может быть подвергнута диализу или диафильтрации *(например,* на ультрафильтрационных мембранах с номинальным пределом молекулярного веса ниже или равным 100000 дальтон) для удаления спирта. Раствор может быть сконцентрирован или разбавлен для получения желаемой концентрации белка и может быть дополнительно очищен техниками, хорошо известными специалистам в области техники.

[0050] Помимо этого, для обогащения каждым из конкретных подтипов иммуноглобулинов могут быть использованы дополнительные препаративные этапы. К примеру, хроматография на протеине A, протеине G или протеине H с сефарозой может применяться для обогащения смеси иммуноглобулинов IgG либо конкретных подтипов IgG. *Общие сведения см. в* Harlow and Lane,*Using Antibodies,*Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); Harlow and Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual,*Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); и Патенте США № 5180810, раскрытие которых включено в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки для всех целей.

[0051] В отличие от способов, описанных выше, в одном аспекте настоящего изобретения предлагаются способы приготовления концентрированных IgG-композиций, в которых используется криосупернатантный исходный материал. В общем в способах, предложенных здесь, используются и этапы модифицированного спиртового фракционирования по Cohn-Oncley, и ионообменная хроматография для обеспечения больших выходов IgG с сохранением такого же уровня качества, если не с повышением, что и у доступных ныне в продаже IVIG-препаратов. К примеру, в определенных вариантах воплощения предлагаются способы, обеспечивающие получение финальной нефасованной IgG-композиции, содержащей близко 75% от содержания IgG в сырье плазмы. Эти способы обеспечивают по меньшей мере 10%–12% повышение общего выхода IgG в сравнении с имеющимися в отрасли в настоящее время способами очистки. К примеру, имеются оценки того, что производственный процесс GAMMAGARD® LIQUID обеспечивает конечный выход между приблизительно 60% и 65% содержания IgG от содержания в исходном материале. При этом способы, предложенные здесь, обеспечивают значительное улучшение в сравнении с имеющимися технологиями очистки IgG.

[0052] В одном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагается очищенная IgG-композиция, содержащая по меньшей мере 70% от содержания IgG в сырье плазмы. В ином варианте воплощения предлагается очищенная IgG-композиция, содержащая по меньшей мере 75% от содержания IgG в сырье плазмы. В иных вариантах воплощения очищенная IgG композиция, предложенная здесь, будет содержать по меньшей мере приблизительно 65% от содержания IgG в сырье плазмы или по меньшей мере приблизительно 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75% или более от содержания IgG в сырье плазмы.

A. Способы с модифицированным спиртовым осаждением/фракционированием ионообменной хроматографией

[0053] В одном аспекте в настоящем изобретении предлагаются улучшенные способы производства IgG композиций, пригодных для использования в IVIG-терапии. В целом эти способы дают IgG-препараты с большими выходами и сравнимой, если не большей, чистотой, что и имеющиеся в настоящее время способы, применяемые для производства имеющихся в продаже продуктов IVIG.

[0054] В одном конкретном аспекте в настоящем изобретении предлагается способ изготовления композиции концентрированного IgG из плазмы, *например,* 10% IVIG, способ, включающий проведение по меньшей мере одного этапа спиртового осаждения и по меньшей мере одного этапа ионообменной хроматографии. В частности, несколько этапов улучшенного вышерасположенного процесса отличаются от более ранних процессов, *например,* использованием 25%-го этанола при низких температурах, добавлением этанола распылением, корректировкой pH распылением и применением тонко измельченных частиц диоксида кремния.

[0055] В определенном варианте воплощения способ включает этапы: (а) осаждения криосупернатантной плазменной фракции на первом этапе осаждения при помощи приблизительно 6%–10%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением супернатанта, обогащенного IgG, (б) осаждения IgG из супернатанта при помощи приблизительно 20%–30%-го спирта при более низкой температуре и pH приблизительно 6,7–7,3 с получением первого осадка, (в) ресуспендирования первого осадка, полученного на этапе (б), с получением суспензии, (г) обработки детергентом суспензии, полученной на этапе (в), (д) осаждения IgG из суспензии при помощи приблизительно 20%–30%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением второго осадка, (е) ресуспендирования второго осадка, полученного на этапе (д) , (ж) обработки суспензии, полученной на этапе (е) , растворителем и/или детергентом, и (з) проведения по меньшей мере одного разделения ионообменной хроматографией с получением композиции с концентрированным IgG. В одном варианте воплощения способ, помимо этого, включает обработку суспензии, полученной на этапе (в), тонко измельченным диоксидом кремния (SiO_2) и фильтрование раствора перед этапом (г) .

[0056] В одном варианте воплощения предлагается способ получения обогащенной концентрированной IgG-композиции из плазмы, способ, содержащий этапы: (а) доведения pH криосупернатантной плазменной фракции до или приблизительно до 7,0, (б) доведения концентрации этанола в криосупернатантной плазменной фракции этапа (а) до или приблизительно до 25% (об./об.) при температуре, между или равной приблизительно -5°C и приблизительно -9°C, с получением, таким образом, смеси, причем концентрация этанола может корректироваться распылением, (в) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (б), (г) ресуспендирования осадка, полученного на этапе (в), в буфере, содержащем фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом приблизительно 400–700 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением суспензии, (д) смешивания тонко измельченного диоксида кремния (SiO2) с суспензией, полученной на этапе (г) , в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут, (е) фильтрования суспензии на фильтр-прессе с получением фильтрата, (ж) промывания фильтр-пресса по меньшей мере 3 мертвыми объемами фильтр-пресса буфера, содержащего фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, равным или приблизительно равным 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением промывочного раствора, (з) смешивания фильтрата, полученного на этапе (е) , с промывочным раствором, полученным на этапе (ж) , с получением раствора, и обработки раствора поверхностно-активным веществом, (и) доведения pH раствора, полученного на этапе (з) , до уровня или приблизительно 7,0 и добавления этанола до финальной концентрации, равной или приблизительно равной 25%, с получением осадка, причем концентрация этанола и/или pH могут корректироваться распылением, (к) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (и) , (л) растворения осадка в водном растворе, содержащем растворитель или поверхностно-активное вещество, и выдерживания раствора по меньшей мере в течение 60 минут, (м) прохождения раствора с этапа (л) через катионообменную хроматографическую колонку и

элюирования в элюат белков, абсорбированных в колонке, (н) прохождения элюата, полученного на этапе (м) , через анионообменную хроматографическую колонку для получения эффлюента *(т.е.* фильтрата), (о) прохождения эффлюента с этапа (н) через нанофильтр для получения нанофильтрата, (п) прохождения нанофильтрата, полученного на этапе (о) , через ультрафильтрационную мембрану для получения ультрафильтрата; и (р) диафильтрации ультрафильтрата, полученного на этапе (п) , против диафильтрационного буфера для получения диафильтрата с концентрацией белка между приблизительно 8% (в./об.) и приблизительно 22% (в./об.) с получением композиции концентрированного IgG. В одном варианте воплощения температура на этапе (б) равна или приблизительно равна -7°С. В одном конкретном варианте воплощения суспензионный буфер на этапе (г) корректируется приблизительно 600 мл ледяной уксусной кислоты.

[0057] В определенных вариантах воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет приблизительно 8%–12%, к примеру, приблизительно 8% или приблизительно 9%, 10%, 11%, либо 12%. В предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна или приблизительно равна 10%. В другом предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна или приблизительно равна 11%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна или приблизительно равна 12%. В других вариантах воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна приблизительно 13%–17%, к примеру, приблизительно 13% либо приблизительно 14%, 15%, 16% или 17%. В еще одних вариантах воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна приблизительно 18%–22%, к примеру, приблизительно 18% либо приблизительно 19%, 20%, 21% или 22%. В предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна или приблизительно равна 20%. В другом предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна или приблизительно равна 21%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате будет равна или приблизительно равна 22%.

[0058] В определенных вариантах воплощения настоящего изобретения способы, предложенные здесь, могут включать усовершенствования двух и более этапов процесса разделения, описанного выше. К примеру, воплощения могут включать усовершенствования первого этапа осаждения, модифицированного этапа осаждения Фракции II+III, модифицированного этапа растворения Фракции II+III и/или модифицированного этапа фильтрования суспензии Фракции II+III.

[0059] В одном варианте воплощения усовершенствование первого этапа осаждения заключается в добавлении спирта путем распыления. В ином варианте воплощения усовершенствование первого этапа осаждения заключается в добавлении pH-модифицирующего агента путем распыления. В другом варианте воплощения усовершенствование первого этапа

осаждения заключается в корректировке pH раствора после добавления спирта. В родственном варианте воплощения усовершенствование первого этапа осаждения заключается в поддержании pH раствора при добавлении спирта. В другом родственном варианте воплощения усовершенствование первого этапа осаждения заключается в поддержании pH раствора в течение периода инкубирования осаждения путем продолжающейся корректировки pH раствора. В определенных вариантах воплощения первый этап осаждения может быть усовершенствован внедрением более чем одного из этих улучшений. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на данном этапе, будут понятны из раздела, представленного ниже, в котором обсуждается первый этап осаждения - Модифицированное Разделение I. Внедрением одного или более усовершенствований, описанных выше, понижается количество потерянного IgG в осажденной фракции на первом этапе осаждения и/или понижается часть IgG, которая необратимо денатурируется во время этапа осаждения.

[0060] В одном варианте воплощения усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III заключается в добавлении спирта путем распыления. В ином варианте воплощения усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III заключается в добавлении pH-модифицирующего агента путем распыления. В другом варианте воплощения усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III заключается в корректировке pH раствора после добавления спирта. В родственном варианте воплощения усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III заключается в поддержании pH раствора при добавлении спирта. В другом родственном варианте воплощения усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III заключается в поддержании pH раствора в течение периода инкубирования осаждения путем продолжающейся корректировки pH раствора. В другом аспекте этап осаждения Модифицированной Фракции II+III усовершенствован повышением концентрации спирта до или приблизительно до 25%. В еще одном варианте воплощения этап осаждения Модифицированной Фракции II+III усовершенствован понижением температуры инкубирования до приблизительно -7°C-(-9°C). В определенных вариантах воплощения этап осаждения Модифицированной Фракции II+III может быть усовершенствован внедрением более чем одного из этих улучшений. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на данном этапе, будут понятны из раздела, представленного ниже, в котором обсуждается второй этап осаждения - Модифицированное Разделение II+III. Внедрением одного или более усовершенствований, описанных выше, понижается количество потерянного IgG в супернатантной фракции на этапе осаждения Модифицированной Фракции II+III и/или понижается часть IgG, которая необратимо денатурируется во время этапа осаждения.

[0061] В одном варианте воплощения усовершенствование этапа растворения Модифицированной Фракции II+III достигается повышением содержания ледяной уксусной кислоты в буфере для растворения до приблизительно 0,06%. В другом варианте воплощения

усовершенствование этапа растворения Модифицированной Фракции II+III достигается поддержанием pH раствора в течение периода инкубирования растворения путем продолжающейся корректировки pH раствора. В другом варианте воплощения усовершенствование этапа растворения Модифицированной Фракции II+III достигается смешиванием тонко измельченного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией Фракции II+III до фильтрования. В определенных вариантах воплощения этап растворения Модифицированной Фракции II+III может быть усовершенствован внедрением более чем одного из этих улучшений. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на данном этапе, будут понятны из раздела, представленного ниже, в котором обсуждается этап растворения Модифицированной Фракции II+III - Экстракция Осадка Модифицированной Фракции II+III. При внедрении одного или более усовершенствований, описанных выше, повышается количество IgG, извлекаемого в суспензии Фракции II+III и/или снижается количество примесей в суспензии Фракции II+III.

[0062] Примерное усовершенствование, сделанное на этапе фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III, реализовано пост-промывкой фильтра по меньшей мере приблизительно 3,6 мертвых объемов буфера для растворения, содержащего или приблизительно содержащего 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на данном этапе, будут понятны из раздела, представленного ниже, в котором обсуждается этап фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III - Предварительная Обработка и Фильтрование Суспензии Модифицированной Фракции II+III. При внедрении одного или более усовершенствований, описанных выше, снижается количество IgG, утрачиваемого на этапе фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0063] В одном варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения и этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III.

[0064] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения и этапа растворения Модифицированной Фракции II+III.

[0065] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0066] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III и этапа растворения Модифицированной Фракции II+III.

[0067] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0068] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование этапа растворения Модифицированной Фракции II+III и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0069] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения, этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III и этапа растворения Модифицированной Фракции II+III.

[0070] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения, этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0071] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения, этапа растворения Модифицированной Фракции II+III и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0072] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III, этапа растворения Модифицированной Фракции II+III и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0073] В другом варианте воплощения способ может содержать усовершенствование первого этапа осаждения, этапа осаждения Модифицированной Фракции II+III, этапа растворения Модифицированной Фракции II+III и этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0074] В определенных вариантах воплощения одно усовершенствование процесса в способах очистки IgG, предложенных здесь, содержит добавление распылением одного и более растворов, которые, иначе, вводились во фракцию плазмы струйным добавлением. К примеру, в определенных вариантах воплощения усовершенствование процесса содержит добавление спирта *(например,* этанола) во фракцию плазмы для целей осаждения одного и более видов белков путем распыления. В других вариантах воплощения растворы, которые могут добавляться к фракции плазмы распылением, включают, не ограничиваясь перечисленным, pH-модифицирующий раствор, раствор растворителя, раствор детергента, буфер для разбавления, раствор для изменения проводимости и т.п. В предпочтительном варианте воплощения один и более этапов спиртового осаждения проводятся добавлением спирта к фракции плазмы путем распыления. Во втором предпочтительном варианте воплощения один и более этапов корректировки pH проводятся добавлением pH-модифицирующего раствора к фракции плазмы путем распыления.

[0075] В определенных вариантах воплощения другое усовершенствование процесса, которое может быть скомбинировано с любым другим усовершенствованием процесса, содержит корректировку pH осаждаемой фракции плазмы после и/или одновременно с добавлением

осаждающего агента *(например,* спирта или полиэтиленгликоля). В определенных вариантах воплощения предлагается усовершенствование процесса, при котором pH активно осаждаемой фракции плазмы поддерживается в течение всего этапа инкубирования или выдерживания осаждения длительными контролем и корректировкой pH. В предпочтительных вариантах воплощения корректировка pH производится добавлением pH-модифицирующего раствора путем распыления.

[0076] В других вариантах воплощения другое усовершенствование процесса, которое может быть скомбинировано с любым другим усовершенствованием процесса, содержит использование этапа обработки тонко измельченным кремнеземом для удаления примесей.

1. Приготовление Криосупернатантной Плазмы

[0077] Исходный материал, используемый для изготовления концентрированных IgG-композиций, как правило, состоит либо из восстановленной плазмы *(т.е.* плазмы, выделенной из цельной крови *ex vivo*) или исходной плазмы *(т.е.* плазмы, полученной при плазмаферезе). Процесс очистки, как правило, начинается с оттаивания ранее замороженной объединенной плазмы, проанализированной ранее на безопасность и параметры качества. Оттаивание обычно проводится при температуре не выше 6°C. После полного оттаивания при низкой температуре замороженной плазмы проводится центрифугирование в холоде *(например,* ≤6°C) для отделения твердых криопреципитатных частиц от жидкого супернатанта. Альтернативно этап отделения может быть произведен путем фильтрования вместо центрифугирования. Жидкий супернатант (также называемый «криосупернатантной плазмой» после удаления из свежеразмороженной плазмы нерастворимых при низкой температуре белков) передается на следующий этап. Различные дополнительные действия могут быть предприняты в этот момент для выделения ингибиторов разрушения фактора восемь (FEIBA), комплекса Фактора IX, концентрата Фактора VII или комплекса Антитромбина III.

2. Первый Процесс Осаждения - Модифицированное Фракционирование I

[0078] На этом этапе криосупернатантную плазму, как правило, охлаждают до приблизительно 0±1°C, pH доводят до приблизительно 7,0–7,5, предпочтительно - до приблизительно 7,1–7,3, наиболее предпочтительно - до приблизительно 7,2. В одном варианте воплощения pH криосупернатантной плазмы дводят до pH, равного или приблизительно равного 7,2. Затем при перемешивании плазмы добавляют предварительно охлажденный этанол до целевой концентрации этанола, равной или приблизительной равной 8% об./об.. Одновременно с этим далее понижают температуру до приблизительно -4–0°C. В предпочтительном варианте воплощения температуру понижают до или приблизительно до -2°C для осаждения таких примесей как α_2-макроглобулин, β_{1A}- и β_{1C}-глобулин, фибриноген и Фактор VIII. Как правило, процесс осаждения включает время выдержки в течение по меньшей мере приблизительно 1 часа, хотя могут использоваться и более короткие или длинные периоды выдержки. Затем

центрифугированием, фильтрованием или иным пригодным способом собирают супернатант (Супернатант I), в идеале содержащий присутствующие в криосупернатантной плазме IgG полностью.

[0079] По сравнению с обычными способами, применяемыми для первого этапа фракционирования криосупернатантной плазмы (Cohn *et al., supra*; Oncley *et al., supra),* в настоящем изобретении предлагаются в некоторых воплощениях способы, которые повышают выходы IgG во фракции Супернатант I. В одном варианте воплощения повышенный выход IgG достигается добавлением спирта распылением. В другом варианте воплощения повышенный выход IgG достигается добавлением pH-модифицирующего агента распылением. В еще одном варианте воплощения повышенный выход IgG достигается корректировкой pH раствора после добавления спирта. В родственном варианте воплощения повышенный выход IgG достигается корректировкой pH раствора во время добавления спирта.

[0080] В одном конкретном аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество IgG теряется в осажденной фракции во время первого этапа осаждения. К примеру, в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в осажденной фракции во время первого этапа осаждения в сравнении с количеством IgG, которое утрачивается во время первого этапа осаждения по 6 протоколу способа по Cohn.

[0081] В определенных вариантах воплощения усовершенствование процесса реализуется доведением pH раствора до приблизительно 7,0–7,5 после добавления спирта-осадителя. В других вариантах воплощения pH раствора доведением до приблизительно 7,1–7,3 после добавления спирта-осадителя. В еще одних вариантах воплощения pH раствора доводится до приблизительно 7,0 или до приблизительно 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 либо 7,5 после добавления спирта-осадителя. В конкретном варианте воплощения pH раствора доводится до приблизительно 7,2 после добавления спирта-осадителя. В связи с этим в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в осажденной фракции во время первого этапа осаждения в сравнении с аналогичным этапом осаждения, при котором pH раствора корректируется до, а не после добавления спирта-осадителя. В одном варианте воплощения pH поддерживается при желаемом pH в течение периода выдержки или инкубирования осаждения путем продолжающейся корректировки pH раствора. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

[0082] В других определенных вариантах воплощения улучшение процесса реализуется добавлением спирта-осадителя и/или раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением. В связи с этим в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в осажденной фракции во время первого этапа осаждения в сравнении с аналогичным этапом осаждения, при котором спирт и/или раствор для корректировки pH вводятся струйным добавлением. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

[0083] В еще одних определенных вариантах воплощения усовершенствование процесса реализуется доведением pH раствора до приблизительно 7,0–7,5. В предпочтительном варианте воплощения pH раствора доводится до приблизительно 7,1–7,3. В других вариантах воплощения pH раствора доводится до или приблизительно до 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 либо 7,5 после добавления спирта-осадителя и добавлением раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением. В конкретном варианте воплощения pH раствора корректируется до или приблизительно до 7,2 после добавления спирта-осадителя и добавлением раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

3. Второй Процесс Осаждения - Модифицированное Фракционирование II+III

[0084] Для дальнейшего повышения содержания IgG и чистоты фракционирования Супернатант I подвергают второму этапу осаждения, представляющему собой модифицированное фракционирование Фракции II+III по Cohn-Oncley. В общем pH раствора доводится до pH приблизительно 6,6–6,8. В предпочтительном варианте воплощения pH раствора доводится до или приблизительно до 6,7. Затем к раствору при перемешивании добавляется спирт, предпочтительно этанол, до итоговой концентрации приблизительно 20%–25% (об./об.), чтобы осадить фракцию IgG. В предпочтительном варианте воплощения спирт добавляется до итоговой концентрации или приблизительно 25% (об./об.), чтобы осадить фракцию IgG. Как правило, в таких условиях не осаждаются примеси, такие как α_1-липопротеин, α_1-антитрипсин, Gc-глобулины, α_{1X}-гликопротеин, гаптоглобулин, церулоплазмин, трансферрин, гемопексин, фракция фактора Кристмаса, тироксинсвязывающий глобулин, холинэстераза, гипертензиноген и альбумин.

[0085] До или одновременно с добавлением спирта раствор дополнительно охлаждается до приблизительно -7°C-(-9°C). В предпочтительном варианте воплощения раствор охлаждается до температуры включительно или приблизительно -7°C. По завершении добавления спирта pH раствора незамедлительно доводится до приблизительно 6,8–7,0. В предпочтительном варианте воплощения pH раствора доводится до или приблизительно до 6,9. Как правило, процесс осаждения включает время выдержки в течение по меньшей мере приблизительно 10 часов, хотя могут использоваться и более короткие или длинные периоды выдержки. Затем центрифугированием, фильтрованием или иным пригодным способом отделяют осадок (Модифицированная Фракция II+III), в идеале содержащий по меньшей мере 85%, предпочтительно - по меньшей мере 90%, более предпочтительно - по меньшей мере 95% присутствующего в криосупернатантной плазме IgG. По сравнению с обычными способами, применяемыми для второго этапа фракционирования криосупернатантной плазмы (Cohn *et al., supra;* Oncley *et al., supra),* в настоящем изобретении предлагаются в некоторых воплощениях способы, которые повышают выходы IgG в осадке Модифицированной Фракции II+III. В

родственном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагаются способы, которые понижают потерю IgG в Модифицированном супернатанте II+III.

[0086] По сравнению с обычными способами, применяемыми для второго этапа фракционирования криосупернатантной плазмы (Cohn *et al., supra*; Oncley *et al., supra),* в настоящем изобретении предлагаются в некоторых воплощениях способы, которые повышают выходы IgG в осадке Модифицированной Фракции II+III. В одном варианте воплощения усовершенствование реализуется добавлением спирта путем распыления. В ином варианте воплощения усовершенствование реализуется добавлением pH-модифицирующего агента путем распыления. В другом варианте воплощения усовершенствование реализуется корректировкой pH раствора после добавления спирта. В родственном варианте воплощения усовершенствование реализуется корректировкой pH раствора во время добавления спирта. В другом варианте воплощения усовершенствование реализуется повышением концентрации спирта *(например,* этанола) до приблизительно 25% (об./об.). В еще одном варианте воплощения усовершенствование реализовано понижением температуры на этапе осаждения до приблизительно -7°C-(-9°C). В предпочтительном варианте воплощения усовершенствование реализуется повышением концентрации спирта *(например,* этанола) до приблизительно 25% (об./об.) и понижением температуры до приблизительно -7°C-(-9°C). Для сравнения, и Cohn *et al.*, и Oncley *et al.* проводили осаждение при -5°C, а Oncley *et al* использовали 20% спирт для снижения количества примесей в осадке. Преимуществом способов, представленных здесь, служит то, что они позволяют достичь максимального выхода IgG без высокого загрязнения конечного продукта.

[0087] Было открыто, что если pH раствора доводится до pH приблизительно 6,9 до добавления спирта-осадителя, то pH раствора сдвигается от 6,9 до приблизительно 7,4–7,7, в частности, вследствие осаждения белка *(см.* Фигуру 8). По мере того как pH раствора сдвигается от 6,9, условия для осаждения IgG становятся менее благоприятными, а для осаждения определенных примесей — более благоприятными. Преимуществом служит то, что изобретатели обнаружили, что корректировка pH раствора после добавления спирта-осадителя обеспечивает большее процентное количество IgG в осадке Фракции II+III.

[0088] Соответственно, в одном аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество IgG теряется в супернатантной фракции во время модифицированного этапа осаждения Фракции II+III. Другими словами, повышенное процентное количество исходного IgG присутствует в осадке Фракции II+III. В определенных вариантах воплощения усовершенствование процесса реализуется корректировкой pH раствора до приблизительно 6,7–7,1 сразу после или во время добавления спирта-осадителя. В другом варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется поддержанием pH раствора на уровне приблизительно 6,7–7,1 продолжительно во время инкубационного периода осаждения. В

других вариантах воплощения pH раствора доводится до приблизительно 6,8–7,0 сразу же после или во время добавления спирта-осадителя, либо до pH приблизительно 6,7, 6,8, 6,9, 7,0 или 7,1 сразу же после или во время добавления спирта-осадителя. В конкретном варианте воплощения pH раствора доводится до приблизительно 6,9 сразу же после или во время добавления спирта-осадителя. В определенных вариантах воплощения pH раствора поддерживается на уровне приблизительно 6,8–7,0 продолжительно во время инкубационного периода осаждения, либо на уровне PH приблизительно 6,9 продолжительно во время инкубационного периода осаждения. В связи с этим в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в супернатантной фракции во время второго этапа осаждения в сравнении с аналогичным этапом осаждения, при котором pH раствора корректируется до, а не после добавления спирта-осадителя, или аналогичным этапом осаждения, при котором pH раствора не поддерживается в течение всего инкубационного периода осаждения. В одном варианте воплощения pH поддерживается на желаемом уровне pH в течение периода выдержки или инкубирования осаждения путем продолжающейся корректировки pH раствора. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

[0089] В другом варианте воплощения улучшение процесса реализуется добавлением спирта-осадителя и/или раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением. В связи с этим в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в супернатантной фракции во время второго этапа осаждения в сравнении с аналогичным этапом осаждения, при котором спирт и/или раствор для корректировки pH вводятся струйным добавлением. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

[0090] В другом варианте воплощения усовершенствование процесса реализовано проведением этапа осаждения при температуре приблизительно -7°C-(-9°C). В одном варианте воплощения этап осаждения проводится при температуре, равной или приблизительно равной -7°C. В ином варианте воплощения этап осаждения проводится при температуре, равной или приблизительно равной -8°C. В другом варианте воплощения этап осаждения проводится при температуре, равной или приблизительно равной -9°C. В определенных вариантах воплощения концентрация спирта на этапе осаждения равна приблизительно 23%–27%. В предпочтительном варианте воплощения концентрация спирта равна приблизительно 24%–26%. В другом предпочтительном варианте воплощения концентрация спирта равна или приблизительно равна 25%. В других вариантах воплощения концентрация спирта может быть равна или приблизительно равна 23%, 24%, 25%, 26% или 27%. В конкретном варианте воплощения второй этап осаждения проводится при температуре, равной или приблизительно равной -7°C, и концентрации спирта, равной или приблизительно равной 25%. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

[0091] Эффект от повышения концентрации спирта на втором осаждении от 20%, как было у Oncley *et al., supra,* до 25% и от понижения инкубационной температуры от -5°C, как было в

способах Cohn и Oncley, до или приблизительно до -7°C, заключается в 5%–6% повышении содержания IgG в осадке модифицированной Фракции II+III.

[0092] В другом варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется доведением pH раствора до приблизительно 6,7–7,1, предпочтительно - до или приблизительно до 6,9, сразу же после или во время добавления спирта-осадителя, поддержанием pH раствора на уровне PH приблизительно 6,7–7,1, предпочтительно – на уровне или приблизительно на уровне 6,9, непрерывной корректировкой pH во время инкубационного периода осаждения, а также добавлением спирта-осадителя и/или раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением. В другом варианте воплощения усовершенствование процесса реализовано проведением этапа осаждения при температуре приблизительно -7°C-(-9°C), предпочтительно - при или приблизительно при -7°C, и осаждением IgG спиртом с концентрацией приблизительно 23%–27%, предпочтительно - равной или приблизительно равной 25%. В еще одном конкретном варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется включением всех усовершенствований Модифицированной Фракции II+III, представленных выше. В предпочтительном варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется осаждением IgG при температуре, равной или приблизительно равной -7°C, этанолом с концентрацией, равной или приблизительно равной 25%, добавляемым распылением с последующим доведением pH раствора до или приблизительно до 6,9, после добавления спирта-осадителя. В еще одном предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживается на или приблизительно на уровне 6,9 в течение всего периода инкубирования или выдерживания осаждения.

4. Экстракция Осадка Модифицированной Фракции II+III

[0093] Чтобы растворить IgG, содержащийся в осадке модифицированной Фракции II+III, используется буфер холодной экстракции для ресуспендирования осадка Фракционирования II+III в типичном соотношении 1 часть осадка на 15 частей экстракционного буфера. Могут использоваться другие соотношения ресуспендирования, например, от приблизительно 1:8 до приблизительно 1:30, либо от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:20, либо от приблизительно 1:12 до приблизительно 1:18, либо от приблизительно 1:13 до приблизительно 1:17, либо от приблизительно 1:14 до приблизительно 1:16. В определенных вариантах воплощения соотношение ресуспендирования может быть равно приблизительно 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30 или выше.

[0094] Растворы, пригодные для экстракции модифицированного осадка II+III, обычно будут иметь pH приблизительно 4,0–5,5. В определенных вариантах воплощения раствор будет иметь pH приблизительно 4,5–5,0, в других вариантах воплощения экстракционный раствор будет иметь pH приблизительно 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 либо 5,5. В предпочтительном варианте воплощения pH экстракционного буфера будет равно или

приблизительно равно 4,5. В другом предпочтительном варианте воплощения pH экстракционного буфера будет равно или приблизительно равно 4,7. В ином предпочтительном варианте воплощения pH экстракционного буфера будет равно или приблизительно равно 4,9. В общем эти требования по pH могут быть удовлетворены при использовании буферного агента, выбранного из, к примеру, ацетата, цитрата, одноосновного фосфата, двухосновного фосфата, их смесей и т.п. Подходящие концентрации буферов, как правило, варьируются в интервале приблизительно 5–100 мМ, либо приблизительно 10–50 мМ, либо приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мМ буферного агента.

[0095] Экстракционный буфер будет, предпочтительно, иметь проводимость от приблизительно 0,5 мС×см$^{-1}$ до приблизительно 2,0 мС×см$^{-1}$. К примеру, в определенных вариантах воплощения проводимость экстракционного буфера будет равна приблизительно 0,5 мС×см$^{-1}$ либо приблизительно 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или приблизительно 2,0 мС×см$^{-1}$. Специалисту в данной области техники известно, как получить экстракционные буферы с необходимой проводимостью.

[0096] В одном конкретном варианте воплощения примерный экстракционный буфер может содержать одноосновный натрия фосфат в концентрации, равной или приблизительно равной 5 мМ, и ацетат в концентрации, равной или приблизительно равной 5 мМ с pH, равным или приблизительно равным 4,5±0,2, и проводимостью, равной или приблизительно равной 0,7–0,9 мС/см.

[0097] В общем экстракцию проводят при приблизительно 0°С–10°С или при приблизительно 2°С–8°С. В определенных вариантах воплощения экстракцию можно проводить при приблизительно 0°С, 1°С, 2°С, 3°С, 4°С, 5°С, 6°С, 7°С, 8°С, 9°С или 10°С. В конкретном варианте воплощения экстракцию проводят при приблизительно 2°С–10°С. Как правило, процесс экстракции продолжается приблизительно 60–300 минут либо приблизительно 120–240 минут, либо приблизительно 150–210 минут при непрерывном перемешивании. В определенных вариантах воплощения экстракционный процесс будет продолжаться приблизительно 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или приблизительно 300 минут. В предпочтительном варианте воплощения экстракционный процесс будет продолжаться по меньшей мере 160 минут при непрерывном перемешивании.

[0098] Было обнаружено, что при использовании экстракционного буфера, содержащего 5 мМ одноосновного натрия фосфата, 5 мМ ацетата и 0,051%–0,06% ледяной уксусной кислоты (об./об.), может быть достигнуто значительное повышение выхода финальной IgG-композиции без подвергания риску чистоты конечного продукта. Корреляция количества уксусной кислоты с pH экстракционного буфера показана на Фигуре 9. В предпочтительном варианте воплощения осадок Фракции II+III экстрагируется при соотношении пасты к буферу, равном или приблизительно равном 1:15, при pH, равном или приблизительно равном 4,5±0,2.

[0099] Преимуществом служит то, что было обнаружено, что в сравнении с используемым в настоящее время производственным процессом GAMMAGARD® LIQUID (BaxterHealthcare), в котором применяется экстракционный буфер, содержащий 5 мМ одноосновного натрия фосфата, 5 мМ ацетата и 0,051% ледяной уксусной кислоты (об./об.), при повышении содержания ледяной уксусной кислоты до или приблизительно до 0,06% (об./об.), может быть достигнуто значительное повышение выхода финальной IgG-композиции. По сравнению со способами, ранее применяемыми для экстракции осадка, полученного на втором этапе осаждения (GAMMAGARD® LIQUID), в настоящем изобретении предлагаются в некоторых воплощениях способы, которые повышают выходы IgG в суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0100] В одном аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество IgG теряется в нерастворенной фракции осадка Модифицированной Фракции II+III. В одном варианте воплощения усовершенствование процесса реализовано экстракцией осадка Модифицированной Фракции II+III в соотношении 1:15 (осадок к буферу) раствором, содержащим 5 мМ одноосновного натрия фосфата, 5 мМ ацетата и 0,06% ледяной уксусной кислоты (об./об.). В другом варианте воплощения усовершенствование реализуется поддержанием pH раствора в течение всей продолжительности процесса экстракции. В одном варианте воплощения pH раствора поддерживается на уровне приблизительно 4,1–4,9 в течение всей продолжительности процесса экстракции. В предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживается на уровне приблизительно 4,2–4,8 в течение всей продолжительности процесса экстракции. В более предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживается на уровне приблизительно 4,3–4,7 в течение всей продолжительности процесса экстракции. В ином предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживается на уровне приблизительно 4,4–4,6 в течение всей продолжительности процесса экстракции. В другом предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживается на уровне, равном или приблизительно равном 4,5, в течение всей продолжительности процесса экстракции.

[0101] В другом аспекте усовершенствование относится к способу, по которому большее количество IgG переходит в раствор из осадка Фракции II+III на этапе растворения Фракции II+III. В одном варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется растворением осадка Фракции II+III в буфере для растворения, содержащем 600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л. В другом варианте воплощения усовершенствование относится к способу, по которому количество примесей снижается после растворения IgG из осадка Фракции II+III. В одном варианте воплощения усовершенствование процесса реализовано смешиванием тонко измельченного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией Фракции II+III в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут.

5. Подготовка и Фильтрование Суспензии Модифицированной Фракции II+III

[0102] Для удаления нерастворенной фракции осадка Модифицированной Фракции II+III *(т.е.* фильтровального остатка Модифицированной Фракции II+III) суспензию фильтруют, как правило, глубинным фильтрованием. Глубинные фильтры, которые могут использоваться в способах, предложенных здесь, включают металлические, стеклянные, керамические, органические (например, с диатомовой землей) глубинные фильтры и т.п. Примеры подходящих фильтров включают, не ограничиваясь перечисленным, фильтры Cuno 50SA, Cuno 90SA и Cuno VR06 (Cuno). Альтернативно этап отделения может быть произведен путем центрифугирования вместо фильтрования.

[0103] Хотя усовершенствования производственного процесса, описанные выше, минимизируют потери IgG на первых этапах процесса очистки, критически важных примесей, включая активность активатора прекалликреина, амидолитическая активность и содержание фибриногена, гораздо больше, к примеру, при экстракции пасты II+III при pH 4,5 или 4,6 в сравнении с экстракцией при pH около 4,9–5,0 *(см.* Примеры 2–5).

[0104] Было обнаружено, что чистота IgG-композиции может быть существенно повышена добавлением подготовительного этапа до фильтрования/центрифугирования, что позволяет противодействовать попаданию примесей при экстракции способами, описанными здесь. В одном варианте воплощения этот этап подготовки включает добавление частиц тонко измельченного диоксида кремния *(например,* высокодисперсного кремнезема Aerosil®) с последующим 40–80-минутным инкубационным периодом, во время которого суспензию постоянно перемешивают. В определенных вариантах воплощения инкубационный период будет равен приблизительно 50–70 минут, либо приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут. Обычно обработка будет проводиться при приблизительно 0°C–10°C или при приблизительно 2°C–8°C. В определенных вариантах воплощения обработку можно проводить при приблизительно 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C. В конкретном варианте воплощения обработку проводят при приблизительно 2°C–10°C.

[0105] Влияние обработки высокодисперсным кремнеземом продемонстрировано результатами в Примере 17. В этом примере осадок Фракции II+III суспендируют и разделяют на два образца, один из которых осветляется только фильтровальным порошком перед фильтрованием (Фигура 7A), а другой обрабатывается высокодисперсным кремнеземом перед добавлением фильтровального порошка и фильтрованием (Фигура 7B). Как следует из хроматограмм и количественных данных, образец фильтрата, предварительно обработанного высокодисперсным кремнеземом, обладает более высокой чистотой IgG в сравнении с образцом, обработанным только фильтровальным порошком (68,8% vs. 55,7%; Таблицы 17 и 18 для сравнения, соответственно).

[0106] В определенных вариантах воплощения высокодисперсный кремнезём добавляется в концентрации от приблизительно 20 г/кг пасты II+III до приблизительно 100 г/кг пасты II+III *(т.е.* для осадка Модифицированной Фракции II+III, экстрагированного в соотношении 1:15, высокодисперсный кремнезем следует добавлять в концентрации от приблизительно 20 г/16 кг суспензии II+III до приблизительно 100 г/16 кг суспензии II+III, либо в итоговой концентрации от приблизительно 0,125% (вес/вес) до приблизительно 0,625% (вес/вес)). В определенных вариантах воплощения высокодисперсный кремнезём может добавляться в концентрации приблизительно 20 г/кг пасты II+III либо приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 г/кг пасты II+III. В одном конкретном варианте воплощения высокодисперсный кремнезем *(например,* Aerosil 380 или аналогичный) добавляется к суспензии Модифицированной Фракции II+III до итоговой концентрации приблизительно в 40 г/16 кг II+III. Смешивание происходит при приблизительно 2–8°C в течение по меньшей мере 50–70 минут.

[0107] В определенных вариантах воплощения фильтровальный порошок, например, Celpure C300 (Celpure) или Hyflo-Supper-Cel (World Minerals) будет добавляться после обработки диоксидом кремния для облегчения глубинной фильтрации. Фильтровальный порошок может добавляться до итоговой концентрации от приблизительно 0,1 кг/кг пасты II+III до приблизительно 0,07 кг/кг пасты II+III либо от приблизительно 0,2 кг/кг пасты II+III до приблизительно 0,06 кг/кг пасты II+III, либо от приблизительно 0,3 кг/кг пасты II+III до приблизительно 0,05 кг/кг пасты II+III. В определенных вариантах воплощения фильтровальный порошок будет добавляться до итоговой концентрации приблизительно 0,1 кг/кг пасты II+III либо приблизительно 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7 кг/кг пасты II+III.

[0108] Значительная часть IgG утрачивалась на этапе фильтрации производственного процесса GAMMAGARD® LIQUID. Было обнаружено, что текущие способы послефильтрационной промывки, в которых используется 1,8 мертвых объемов суспензионного буфера для промывания узлов и линий фильтр-пресса, недостаточны для максимального извлечения IgG на этом этапе. Неожиданно было обнаружено, что по меньшей мере 3,0 мертвых объемов, предпочтительно - 3,6 мертвых объемов, суспензионного буфера требуется для эффективного извлечения общего IgG из осветленной суспензии Модифицированной Фракции II+III *(см.* Пример 12 и Фигуру 1). В определенных вариантах воплощения фильтр-пресс может быть промыт любым пригодным суспензионным буфером. В конкретном варианте воплощения промывочный буфер будет содержать, к примеру, 5 мМ одноосновного натрия фосфата, 5 мМ ацетата и 0,015% ледяной уксусной кислоты (об./об.).

[0109] В одном аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество IgG теряется на этапе фильтрования суспензии Фракции II+III. В одном варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется пост-промывкой фильтра по меньшей мере 3,6 мертвых объемов буфера для растворения, содержащего 150 мл ледяной уксусной

кислоты на 1000 л. Связь количества ледяной уксусной кислоты и pH пост-промывочного буфера представлена на Фигуре 10. В одном варианте воплощения pH пост-промывочного экстракционного буфера равен приблизительно 4,6–5,3. В предпочтительном варианте воплощения pH пост-промывочного экстракционного буфера равен приблизительно 4,7–5,2. В еще одном предпочтительном варианте воплощения pH пост-промывочного экстракционного буфера равен приблизительно 4,8–5,1. В еще одном предпочтительном варианте воплощения pH пост-промывочного экстракционного буфера равен приблизительно 4,9–5,0.

[0110] По сравнению со способами, ранее применяемыми для осветления суспензии, полученной на втором этапе осаждения (GAMMAGARD® LIQUID), в настоящем изобретении предлагаются в некоторых воплощениях способы, которые повышают выходы IgG и чистоту суспензии Фракции II+III. В одном аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество IgG теряется в фильтровальном осадке Модифицированной Фракции II+III. В другом аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество примесей обнаруживается в осветленной суспензии Фракции II+III.

[0111] В одном варианте воплощения усовершенствования процесса реализованы включением обработки высокодисперсным кремнезёмом до осветления фильтрованием или центрифугированием суспензии Модифицированной Фракции II+III. В определенных вариантах воплощения обработка высокодисперсным кремнеземом будет включать добавление в количестве от приблизительно 0,1 кг/кг пасты II+III до приблизительно 0,07 кг/кг пасты II+III либо от приблизительно 0,2 кг/кг пасты II+III до приблизительно 0,06 кг/кг пасты II+III, либо от приблизительно 0,3 кг/кг пасты II+III до приблизительно 0,05 кг/кг пасты II+III, либо приблизительно 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7 кг/кг пасты II+III, и смесь будет инкубирована приблизительно 50–70 минут или приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут при температуре приблизительно 2°C–8°C. В другом варианте воплощения усовершенствования процесса реализуются включением обработки кремнеземом, нанесенным на пленку, что понижает уровни остаточного фибриногена, амидолитической активности и/или активности активатора прекалликреина.

[0112] В другом варианте воплощения усовершенствования процесса реализуются промыванием глубинного фильтра приблизительно 3–5 объемами мертвого объема фильтра по завершении этапа фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III. В определенных вариантах воплощения фильтр будет промыт приблизительно 3,5–4,5 объемами либо по меньшей мере приблизительно 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 объемами мертвого объема фильтра. В конкретном варианте воплощения фильтр-пресс будет промыт по меньшей мере приблизительно 3,6 мертвых объемов суспензионного буфера.

6. Обработка Детергентом

[0113] Для удаления дополнительных примесей из фильтрата Модифицированной Фракции II+III образец далее подвергается обработке детергентом. Способы обработки детергентом фракций плазмы хорошо известны в данной области техники. В общем может использоваться любая стандартная обработка неионным детергентом совместно со способами, предложенными здесь. К примеру, образец протокола обработки детергентом приведен ниже.

[0114] Вкратце, полисорбат-80 добавляется к фильтрату Модифицированной Фракции II+III до конечной концентрации приблизительно 0,2% (в./об.) при перемешивании, образец выдерживают по меньшей мере 30 минут при температуре приблизительно 2–8°C. Затем смешивают раствор с натрия цитратом дегидратом до конечной концентрации приблизительно 8 г/л, образец инкубируют по меньшей мере 30 минут при постоянном перемешивании при температуре приблизительно 2–8°C.

[0115] В определенных вариантах воплощения могут использоваться любые пригодные неионные детергенты. Примеры подходящих неионных детергентов включают, не ограничиваясь перечисленным, Октилглюкозид, Дигитонин, C12E8, Люброл, Тритон X-100, Нонидет P-40, Твин-20 *(т.е.* полисорбат-20), Твин-80 *(т.е.* полисорбат-80), алкилполи(этиленоксид), детергент Brij, алкилфенолполи(этиленоксид), полоксамер, октилглюкозид, децилмальтозид и т.п.

[0116] В одном варианте воплощения улучшение процесса реализуется добавлением детергентных реактивов *(например,* полисорбата-80 и натрия цитрата дегидрата) распылением, а не струйным добавлением. В других вариантах воплощения детергентные реактивы могут добавляться в твердом виде к фильтрату Модифицированной Фракции II+III при перемешивании образца для обеспечения быстрого распределения добавок. В определенных вариантах воплощения предпочтительно добавлять твердые реактивы путем рассыпания твердых веществ над большой площадью фильтрата, чтобы не происходило местного излишнего повышения концентрации, как при струйном добавлении.

7. Третий Процесс Осаждения - Осаждение G

[0117] Чтобы удалить некоторые остаточные малые белки, такие как альбумин и трансферрин, производится третье осаждение при концентрации спирта 25%. Вкратце, pH обработанного детергентом фильтрата II+III доводят до приблизительно 6,8–7,2, предпочтительно - до приблизительно 6,9–7,1, наиболее предпочтительно - до приблизительно 7,0, при помощи подходящего раствора для изменения pH *(например,* 1M натрия гидроксидом или 1M уксусной кислотой). Затем к раствору добавляют холодный спирт до итоговой концентрации приблизительно 25% (об./об.) и инкубируют при перемешивании смесь при приблизительно -6°C–(-10°C) в течение по меньшей мере 1 часа для образования третьего осадка *(т.н.* осадка G). В одном варианте воплощения смесь инкубируют в течение по меньшей мере 2 часов или по

меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более часов. В предпочтительном варианте воплощения смесь инкубируют по меньшей мере 2 часа. В более предпочтительном варианте воплощения смесь инкубируют по меньшей мере 4 часа. В еще более предпочтительном варианте воплощения смесь инкубируют по меньшей мере 8 часов.

[0118] В одном аспекте усовершенствование относится к способу, по которому меньшее количество IgG теряется в супернатантной фракции на третьем этапе осаждения. В определенных вариантах воплощения усовершенствование процесса реализуется доведением pH раствора до приблизительно 6,8–7,2 сразу после или во время добавления спирта-осадителя. В другом варианте воплощения усовершенствование процесса реализуется поддержанием pH раствора на уровне приблизительно 6,8–7,2 продолжительно во время инкубационного периода осаждения. В других вариантах воплощения pH раствора доводится до приблизительно 6,9–7,1 сразу же после или во время добавления спирта-осадителя, либо до pH приблизительно 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 или 7,2 сразу же после или во время добавления спирта-осадителя. В конкретном варианте воплощения pH раствора доводится до приблизительно 7,0 сразу же после или во время добавления спирта-осадителя. В определенных вариантах воплощения pH раствора поддерживается на уровне приблизительно 6,9–7,1 продолжительно во время инкубационного периода осаждения либо на уровне PH приблизительно 7,0 продолжительно во время инкубационного периода осаждения. В связи с этим в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в супернатантной фракции во время третьего этапа осаждения в сравнении с аналогичным этапом осаждения, при котором pH раствора корректируется до, а не после добавления спирта-осадителя, или аналогичным этапом осаждения, при котором pH раствора не поддерживается в течение всего инкубационного периода осаждения. В одном варианте воплощения pH поддерживается на желаемом уровне pH в течение периода выдержки или инкубирования осаждения путем продолжающейся корректировки pH раствора. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

[0119] В другом варианте воплощения улучшение процесса реализуется добавлением спирта-осадителя и/или раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением. В связи с этим в определенных вариантах воплощения меньшее количество IgG теряется в супернатантной фракции во время третьего этапа осаждения в сравнении с аналогичным этапом осаждения, при котором спирт и/или раствор для корректировки pH вводятся струйным добавлением. В одном варианте воплощения спирт является этанолом.

8. Суспендирование и Фильтрование Осадка G (PptG)

[0120] Чтобы растворить IgG, содержащийся в осадке G, используется буфер холодной экстракции для ресуспендирования PptG. Вкратце, осадок G растворяют в соотношении 1 к 3,5 в Воде для Инъекций (WFI) при приблизительно 0°C–8°C для получения величины $AU_{280\text{-}320}$ приблизительно 40–95. Итоговый pH раствора, который перемешивается по меньшей мере 2 часа,

затем доводится до или приблизительно до 5,2±0,2. В одном варианте воплощения эта корректировка pH проводится 1M уксусной кислотой. Для повышения растворимости IgG проводимость суспензии повышается до приблизительно 2,5–6,0 мС/см. В одном варианте воплощения проводимость повышается добавлением натрия хлорида. Суспендированный раствор PptG затем фильтруется через пригодный глубинный фильтр с номинальным размером пор приблизительно 0,1 мкм — 0,4 мкм для удаления нерастворившихся частиц. В одном варианте воплощения номинальный размер пор глубинного фильтра равен приблизительно 0,2 мкм *(например,* фильтр Cuno VR06 или аналогичный) для получения осветленного фильтрата. В другом варианте воплощения суспендированный раствор PptG центрифугируют для восстановления осветленного супернатанта. Пост-промывка фильтра производится раствором натрия хлорида с проводимостью приблизительно 2,5–6,0 мС/см. Типичные подходящие растворы для экстракции осадка G включают воду для инъекций и буферы с низкой проводимостью. В одном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет проводимость ниже приблизительно 10 мС/см. В предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет проводимость ниже приблизительно 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мС/см. В предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет проводимость ниже приблизительно 6 мС/см. В другом предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет проводимость ниже приблизительно 4 мС/см. В ином предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет проводимость ниже приблизительно 2 мС/см.

9. Обработка «Растворителем/Детергентом»

[0121] Чтобы инактивировать различные вирусные загрязнители, которые могут присутствовать в продуктах, полученных из плазмы, осветленный фильтрат PptG далее подвергается обработке растворителем/детергентом (S/D). Способы обработки детергентом фракций плазмы хорошо известны в данной области техники (*см.* Pelletier JP *et al., Best Pract Res Clin Haematol.* 2006; 19(1):205-42). В общем может использоваться любая стандартная обработка растворителем/детергентом совместно со способами, предложенными здесь. К примеру, образец протокола обработки растворителем/детергентом приведен ниже.

[0122] Вкратце, Тритон X-100, Твин-20 и три(n-бутил)фосфат (TNBP) добавляются к осветленному фильтрату PptG до конечных концентраций приблизительно 1,0%, 0,3% и 0,3%, соответственно. Затем смесь перемешивают при температуре приблизительно 18°C–25°C в течение по меньшей мере часа.

[0123] В одном варианте воплощения улучшение процесса реализуется добавлением S/D-реактивов *(например,* Тритон X-100, Твин-20 и TNBP) распылением, а не струйным добавлением. В других вариантах воплощения детергентные реактивы могут добавляться в твердом виде к

осветленному фильтрату PptG при перемешивании образца для обеспечения быстрого распределения S/D-компонентов. В определенных вариантах воплощения предпочтительно добавлять твердые реактивы путем рассыпания твердых веществ над большой площадью фильтрата, чтобы не происходило местного излишнего повышения концентрации, как при струйном добавлении.

10. Ионообменная Хроматография

[0124] Для дальнейших очистки и концентрирования IgG из обработанного растворителем/детергентом фильтрата PptG могут быть выполнены катионообменная и/или анионообменная хроматография. Способы очистки и концентрирования IgG с использованием ионообменной хроматографии хорошо известны в данной области техники. К примеру, в Патенте США № 5886154 описан способ, по которому осадок Фракции II+III экстрагируется при низком pH (приблизительно 3,8–4,5) с последующим осаждением IgG каприловой кислотой и финальным проведением двух этапов анионообменной хроматографии. В Патенте США № 6069236 описана схема хроматографической очистки IgG, в которой вовсе не используется спиртовое осаждение. В международной публикации № WO 2005/073252 описан способ очистки IgG, включающий экстракцию осадка Фракции II+III, обработку каприловой кислотой, обработку ПЭГ и один этап анионообменной хроматографии. В Патенте США № 7186410 описан способ очистки IgG, включающий экстракцию либо Фракции I+II+III, либо осадка Фракции II с последующим одним этапом анионообменной хроматографии, проводимым при щелочном pH. В Патенте США № 7553938 описан способ, включающий экстракцию либо Фракции I+II+III, либо осадка Фракции II+III, каприлатную обработку и один или два этапа анионообменной хроматографии. В Патенте США № 6093324 описан способ очистки, включающий использование крупнопористой анионообменной смолы при pH приблизительно 6,0–6,6. В Патенте США № 6835379 описан способ очистки, основывающийся на катионообменной хроматографии без спиртового фракционирования. Раскрытие вышеперечисленных публикаций включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

[0125] В одном варианте воплощения способов настоящего изобретения фильтрат PptG, прошедший обработку растворителем/детергентом, может быть подвергнут и катионообменной, и анионообменной хроматографии. К примеру, в одном варианте воплощения фильтрат PptG, прошедший обработку растворителем/детергентом, пропускается через катионообменную колонку, связывающую IgG, находящийся в растворе. Реактивы растворителя/детергента затем могут быть отмыты от абсорбированного IgG, который затем элюируется из колонки элюирующим буфером с высоким pH, имеющим pH приблизительно 8,0–9,0. Таким образом, этап катионообменной хроматографии может использоваться для удаления из препарата реактивов растворителя/детергента, концентрирования IgG-содержащего раствора, либо для обеих этих целей. В определенных вариантах воплощения pH элюирующего буфера может составлять pH приблизительно 8,2–8,8 либо приблизительно 8,4–8,6, либо приблизительно 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4,

8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, либо 9,0. В предпочтительном варианте воплощения pH элюирующего буфера равен приблизительно 8,5±0,1.

[0126] В определенных вариантах воплощения pH элюата из катионообменной колонки может быть доведен до более низких значений, к примеру, приблизительно 5,5–6,5, и разбавлен пригодным буфером для понижения проводимости раствора. В определенных вариантах воплощения pH катионообменного элюата может быть доведен до уровня pH приблизительно 5,7–6,3 либо приблизительно 5,9–6,1, либо уровня pH приблизительно 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 либо 6,5. В предпочтительном варианте воплощения pH элюата доводится до уровня pH приблизительно 6,0±0,1. Затем элюат загружается в анионообменную колонну, связывающую ряд примесей, находящихся в препарате. Элюат колонки, содержащий фракцию IgG, собирается при загрузке и промывке колонки. В определенных вариантах воплощения этапы ионообменной хроматографии по настоящему изобретению могут проводиться в колонке, в колбе или в комбинации этих двух режимов.

[0127] В определенных вариантах воплощения улучшение процесса реализуется добавлением раствора, используемого для корректировки pH, распылением, а не струйным добавлением.

11. Нанофильтрация и Ультра/Диафильтрация

[0128] Для дальнейшего снижения вирусной нагрузки в IgG композиции, предложенной здесь, эффлюент из анионообменной колонки может быть подвергнут нанофильтрации на подходящем приборе для нанофильтрации. В определенных вариантах воплощения прибор для нанофильтрации будет иметь средний размер пор приблизительно 15 нм – 200 нм. Примерами нанофильтров, пригодных для использования в этих целях, служат, не ограничиваясь перечисленными, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N и 75N (Planova). В конкретном варианте воплощения средний размер пор нанофильтра может составлять приблизительно 15 нм – 72 нм либо приблизительно 19 нм – 35 нм, либо приблизительно 15 нм, 19 нм, 35 нм или 72 нм. В предпочтительном варианте воплощения нанофильтр будет иметь средний размер пор приблизительно 35 нм, например, как фильтр Asahi PLANOVA 35N или аналогичный.

[0129] Необязательно, могут проводиться ультрафильтрация/диафильтрация для дальнейшего концентрирования нанофильтрата. В одном варианте воплощения используется мембрана с открытыми каналами, а также специально разработанный промывной раствор, благодаря чему в составе полученных IgG-композиций вблизи окончания производственного процесса содержится вдвое больше белка (200мг/мл) в сравнении с получаемыми по нынешним технологиям IVIG *(например,* GAMMAGARD® LIQUID) без влияния на выход и стабильность хранения. С большинством доступных в продаже ультрафильтрационных мембран концентрация 200 мг/мл IgG не может быть достигнута без потерь большей части белка. Такие мембраны быстро

блокируются, поэтому достаточной пост-промывки трудно достичь. Поэтому следует использовать конфигурации мембран с открытыми каналами. Даже с мембранами с открытыми каналами следует использовать особенным образом разработанную процедуру пост-промывки, чтобы достичь требуемой концентрации без значительных потерь белка (потерь меньше 2%). Еще более удивителен тот факт, что большая концентрация белка 200мг/мл не влияет на способность к вирусной активации во время этапа хранения при низком pH.

[0130] Следом за нанофильтрацией фильтрат может быть дополнительно концентрирован ультрафильтрацией/диафильтрацией. В одном варианте воплощения нанофильтрат может быть концентрирован ультрафильтрацией до концентрации белка приблизительно в 2%–10% (в./об.). В определенных вариантах воплощения ультрафильтрацию проводят в кассете с открытоканальным ситом и ультрафильтрационной мембраной с номинальным молекулярным весом отсечения (NMWCO) менее чем приблизительно 100 кДа или менее чем приблизительно 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 или менее кДа. В предпочтительном варианте воплощения ультрафильтрационная мембрана имеет NMWCO не более чем 50 кДа.

[0131] По завершении этапа ультрафильтрации концентрат может быть дополнительно концентрирован диафильтрацией против раствора, пригодного для внутривенного или внутримышечного введений. В определенных вариантах воплощения диафильтрационный раствор может содержать стабилизирующий и/или буферный агент. В предпочтительном варианте воплощения стабилизирующим и буферным агентами является глицин в подходящей концентрации, к примеру, приблизительно 0,20 М—0,30М либо приблизительно 0,22М — 0,28М, либо приблизительно 0,24М — 0,26 мМ, либо в концентрации приблизительно 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0. В предпочтительном варианте воплощения диафильтрационный буфер содержит или приблизительно содержит 0,25М глицина.

[0132] Как правило, минимальный объем обмена равен по меньшей мере приблизительно 3 исходным объемам концентрата или по меньшей мере приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более исходных объемов концентрата. Раствор IgG может быть сконцентрирован до конечной концентрации белка приблизительно 5%–25% (в./об.) либо приблизительно 6%–18% (в./об.), либо приблизительно 7%–16% (в./об.), либо приблизительно 8%–14% (в./об.), либо приблизительно 9%–12%, либо до конечной концентрации приблизительно 5% или 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% или выше. В одном варианте воплощения конечная концентрация белка по меньшей мере в приблизительно 23% достигается без добавления пост-промывочной фракции к концентрированному раствору. В другом варианте воплощения конечная концентрация белка по меньшей мере в приблизительно 24% достигается без добавления пост-промывочной фракции к концентрированному раствору. Конечная концентрация белка по меньшей мере в приблизительно 25% достигается без

добавления пост-промывочной фракции к концентрированному раствору. Как правило, к концу процесса концентрирования pH раствора будет равно приблизительно 4,6–5,1.

[0133] В одном приблизительном варианте воплощения pH IgG-композиции доводится до приблизительно 4,5 перед ультрафильтрацией. Раствор концентрируют до концентрации белка в 5±2% в./об. посредством ультрафильтрации. UF-мембрана имеет Номинальный Молекулярный Вес Отсечения (NMWCO) в 50000 Дальтон или ниже (Полиэфирсульфоновая мембрана Millipore Pellicon). Концентрат диафильтруют против десяти объемов 0,25M раствора глицина, pH 4,5±0,2. В течение операции ультрафильтрации/диафильтрации температура раствора поддерживается равной приблизительно 2°C–8°C. После диафильтрации раствор концентрируют до содержания белка по меньшей мере 11% (в./об.).

12. Составление

[0134] По завершении этапа диафильтрации концентрация белка в растворе доводится диафильтрационным буфером до конечной концентрации приблизительно 5%–20% (в./об.) либо приблизительно 6%–18% (в./об.), либо приблизительно 7%–16% (в./об.), либо приблизительно 8%–14% (в./об.), либо приблизительно 9%–12%, либо до конечной концентрации приблизительно 5% или 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20%. В предпочтительном варианте воплощения конечная концентрация белка в растворе равна приблизительно 9%–11%, более предпочтительно - приблизительно 10%.

[0135] Составленный нефасованный раствор далее стерилизуется фильтрацией через мембранный фильтр с абсолютным размером пор не более приблизительно 0,22 микрон, к примеру, приблизительно 0,2 микрон. Затем раствор асептически фасуется в финальные контейнеры для запечатывания, образцы берутся для тестирования.

[0136] В одном варианте воплощения IgG-композиция далее доводится до приблизительно 10,2±0,2% (в./об.) диафильтрационным буфером. При необходимости pH доводится до приблизительно 4,4–4,9. Наконец, раствор подвергают стерильной фильтрации и инкубируют три недели при или приблизительно при 30°C.

13. Добавление Спирта

[0137] Преимуществом служит то, что было обнаружено, что для целей фракционирования IgG из плазмы добавление спирта распылением вместо струйного добавления обеспечивает снижение потерь выхода IgG. Не вдаваясь в теорию, при струйном добавлении к фракции плазмы временное локальное повышение концентрации спирта в месте притока спирта может приводить к денатурации белка и необратимой потере и/или осаждению IgG во время этапов, на которых IgG должен оставаться в супернатанте. Помимо этого, данные эффекты могут усиливаться при

добавлении больших объемов спирта, например, при промышленном масштабе очистки, при котором фракционированию подвергается по меньшей мере 100 л объединенной плазмы.

[0138] Влияние добавления спирта распылением проиллюстрировано в Примере 14, в котором криосупернатантные образцы плазмы осаждались 8% этанолом, который вводился либо струйно (1 и 2), либо распылением (3 и 4). Как следует из Таблицы 14, практически 100% IgG, присутствующего в криосупернатантной плазме, переводится в супернатант при добавлении этанола распылением, в то время как при струйном добавлении спирта 4–5% IgG утрачивается. Это дает потерю IgG в приблизительно 0,20–0,25 г/л только на этом этапе. В пересчете на уровни производства 2007 года это соответствует потерям в 5,3 миллионов граммов (5300 килограммов) IgG. С учетом нынешней рыночной цены IVIG, которая варьируется от $50 до $100 за грамм, 4-5% потери на этом этапе обозначают общие экономические потери вплоть до полумиллиарда долларов ежегодно.

[0139] Соответственно, в одном аспекте способов, предложенных здесь, один или более этапов осаждения проводятся добавлением спирта распылением. В определенных вариантах воплощения добавление распылением может проводиться с использованием любого устройства, находящегося под давлением, такого как контейнер *(например,* аэрозольный баллон), оснащенный распылительной головкой или наконечником и работающего в ручном или автоматическом режиме, для превращения жидкости в мелкий туман. В определенных вариантах воплощения добавление распылением проводится в то время, когда система постоянно двигается или иначе перемешивается для того, чтобы обеспечить быстрое и равномерное распределение жидкости в системе.

14. Корректировка pH

[0140] Профили осаждения белка фракций плазмы высоко зависят от pH раствора, из которого осаждаются белки плазмы. Этот факт был использован учеными, фракционирующими белки плазмы после введения способов Cohn и Oncley в 1946 и 1949, соответственно. Традиционно, pH фракции плазмы корректируется до добавления спирта для облегчения наивысших выходов интересующих компонентов. Преимуществом служит то, что было обнаружено, что корректировкой pH раствора сразу после добавления спирта или сопутствующих спирту добавок обеспечивается более определенное и воспроизводимое осаждение. Было обнаружено, что добавление этанола к фракциям плазмы приводит к флуктуациям pH раствора, обычно с подъемом pH раствора. В связи с этим при корректировании pH фракции плазмы до предопределенного уровня pH до, а не после добавления спирта, реакция осаждения будет протекать при неоптимальном pH.

[0141] Аналогично осаждение белков из фракции плазмы будет влиять на электростатическое окружение и, таким образом, менять pH раствора. Соответственно, по мере продвижения процесса осаждения pH раствора начнет отклоняться от предустановленной величины pH, позволяющей

максимальное извлечение интересующих видов белка. Это особенно верно для процессов осаждения, в которых большая часть фракции белка осаждается, процессов осаждения, в которых используется высокое содержание спирта, и процессов осаждения, требующих длительного инкубационного периода.

[0142] Влияние корректировки pH фракции плазмы продемонстрировано результатами в Примере 16. В этом примере IgG осаждали из двух образцов фракции Супернатант I после добавления спирта распылением. pH обоих образцов доводили до 6,7 перед добавлением спирта и до 6,9 после добавления спирта, но до 10-часового инкубационного этапа осаждения. В первом образце (референтном) pH не корректировали в течение 10 часов инкубации, а во втором образце (с длительной корректировкой) pH постоянно доводили до pH 6,9 в течение 10-часового инкубирования. Как показано в Таблице 16, после удаления осадка модифицированной Фракции II+III из образцов, в первом супернатанте содержалось 0,2 г IgG/л плазмы, а во втором образце, в котором pH поддерживался постоянным в течение инкубации осаждения, содержалось только 0,13 г IgG/л плазмы. Снижение потерь на 0,07 г IgG/л плазмы во втором образце отражает, в пересчете на уровни производства 2007 года, потери в 1,9 миллионов граммов (1900 килограммов) IgG. С учетом нынешней рыночной цены IVIG, которая варьируется от $50 до $100 за грамм, 1,5% потери на этом этапе обозначают общие экономические потери вплоть до $200 миллионов долларов ежегодно.

[0143] Соответственно, в одном аспекте способов, предложенных здесь, pH фракции плазмы корректируется сразу же после добавления спирта. В родственных вариантах воплощения pH может корректироваться до и после добавления спирта либо во время и после добавления спирта, либо до, во время и после добавления спирта. В родственном варианте воплощения pH раствора длительно корректируется в течение одного или более процессов осаждения или инкубаций. В определенных вариантах воплощения pH раствора длительно корректируется или поддерживается в то время, когда система постоянно двигается или иначе перемешивается, для того, чтобы обеспечить быстрое и равномерное распределение pH-модифицирующего агента в системе.

[0144] Аналогично случаю струйного добавления спирта сейчас было обнаружено, что струйное добавление больших объемов pH-модифицирующего агента может вызывать временные локальные колебания pH, приводя к нежелательной денатурации или осаждению белка. Соответственно, в одном варианте воплощения способов, предложенных здесь, pH-модифицирующие агенты могут вводиться на одном или более этапов фракционирования плазмы распылением. В ином варианте воплощения способов, предложенных здесь, pH фракции плазмы на этапе осаждения может корректироваться добавлением pH-модифицирующего агента путем распыления. В определенных вариантах воплощения добавление распылением может проводиться с использованием любого устройства, находящегося под давлением, такого как контейнер *(например,* аэрозольный баллон), оснащенный распылительной головкой или наконечником и

работающего в ручном или автоматическом режиме, для превращения жидкости в мелкий туман. В определенных вариантах воплощения добавление распылением проводится в то время, когда система постоянно двигается или иначе перемешивается, для того, чтобы обеспечить быстрое и равномерное распределение жидкости в системе.

III. Концентрированные IgG-Композиции

[0145] IVIG-композиции, содержащие целые антитела, применяются для лечения определенных аутоиммунных состояний. *(См., например,* Патентные Публикации США под номерами US 2002/0114802, US 2003/0099635 и US 2002/0098182.) IVIG-композиции, раскрытые по этим ссылкам, включают поликлональные антитела.

1. Водные IgG-Композиции

[0146] В одном аспекте настоящее изобретение относится к водным IgG-композициям, полученным способами, предложенными здесь. В общем IgG-композиции, полученные по новым способам, предложенным здесь, имеют большие содержание IgG и чистоту. К примеру, IgG-композиции, предложенные здесь, могут иметь содержание белка по меньшей мере приблизительно 3% (в./об.) и содержание IgG более приблизительно 90% чистоты. Эти высокочистые IgG-композиции пригодны для терапевтического введения, *например,* для IVIG-терапии. В одном варианте воплощения концентрация IgG-композиции примерно равна 10% и применяется она для внутривенного введения. В другом варианте воплощения концентрация примерно равна 20% и применяется она для подкожного или внутримышечного введения.

[0147] В одном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагается водная IgG-композиция, приготовленная по способу, который включает этапы: (а) осаждения криосупернатантной плазменной фракции на первом этапе осаждения при помощи приблизительно 6%–10%-го спирта, при pH приблизительно 6,7–7,3, с получением супернатанта, обогащенного IgG, (б) осаждения IgG из супернатанта при помощи приблизительно 20%–30%-го спирта, при pH приблизительно 6,7–7,3, с получением первого осадка, (в) ресуспендирования первого осадка, полученного на этапе (б), с получением суспензии, (г) обработки детергентом суспензии, полученной на этапе (в), (д) осаждения IgG из суспензии при помощи приблизительно 20%–30%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением второго осадка, (е) ресуспендирования второго осадка, полученного на этапе (д) , (ж) обработки суспензии, полученной на этапе (е) , растворителем и/или детергентом, и (з) проведения по меньшей мере одного разделения ионообменной хроматографией с получением композиции с концентрированным IgG.

[0148] В конкретном варианте воплощения предлагается IgG-композиция, полученная способом, содержащим этапы: (а) доведения pH криосупернатантной плазменной фракции приблизительно до 7,0, (б) доведения концентрации этанола в криосупернатантной плазменной

фракции этапа (а) приблизительно до 25% (об./об.) при температуре между приблизительно -5°С и приблизительно -9°С с получением смеси, (в) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (б), (г) ресуспендирования осадка, полученного на этапе (в) , в буфере, содержащем фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, приблизительно равным 600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением суспензии, (д) смешивания тонко измельченного диоксида кремния (SiO2) с суспензией, полученной на этапе (г) , в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут, (е) фильтрования суспензии на фильтр-прессе с получением фильтрата, (ж) промывания фильтр-пресса по меньшей мере 3 мертвыми объемами фильтр-пресса буфера, содержащего фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, равным или приблизительно равным 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера с получением промывочного раствора, (з) смешивания фильтрата, полученного на этапе (е) , с промывочным раствором, полученным на этапе (ж) , с получением раствора и обработки раствора поверхностно-активным веществом, (и) доведения pH раствора, полученного на этапе (з) , до уровня приблизительно 7,0 и добавления этанола до финальной концентрации, приблизительно равной 25%, с получением осадка, (к) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (и) , (л) растворения осадка в водном растворе, содержащем растворитель или поверхностно-активное вещество, и выдерживания раствора по меньшей мере в течение 60 минут, (м) прохождения раствора с этапа (л) через катионообменную хроматографическую колонку и элюирования в элюат белков, абсорбированных в колонке, (н) прохождения элюата, полученного на этапе (м) , через анионообменную хроматографическую колонку для получения эффлюента, (о) прохождения эффлюента с этапа (н) через нанофильтр для получения нанофильтрата, (п) прохождения нанофильтрата, полученного на этапе (о) , через ультрафильтрационную мембрану для получения ультрафильтрата;и (р) диафильтрации ультрафильтрата, полученного на этапе (п) , против диафильтрационного буфера для получения диафильтрата с концентрацией белка между приблизительно 8% (в./об.) и приблизительно 12% (в./об.) с получением композиции концентрированного IgG.

[0149] В определенных вариантах воплощения водные IgG-композиции приготавливаются с использованием способов, предложенных здесь, которые включают усовершенствования двух и более этапов процесса разделения, описанного выше. К примеру, в определенных вариантах воплощения усовершенствования могут быть введены на первом этапе осаждения, этапе осаждения Модифицированной Фракции II+III, этапе растворения Модифицированной Фракции II+III и/или этапе фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0150] В одном варианте воплощения предлагается водная IgG-композиция, которая готовится способом очистки, предложенным здесь, причем способ содержит добавление распылением одного или более растворов, которые, иначе, вводились во фракцию плазмы струйным добавлением. К примеру, в определенных вариантах воплощения способ будет содержать введение спирта *(например,* этанола) во фракцию плазмы путем распыления. В других

вариантах воплощения растворы, которые могут добавляться к фракции плазмы распылением, включают, не ограничиваясь перечисленным, pH-модифицирующий раствор, раствор растворителя, раствор детергента, буфер для разбавления, раствор для изменения проводимости и т.п. В предпочтительном варианте воплощения один или более этапов спиртового осаждения проводятся добавлением спирта к фракции плазмы путем распыления. Во втором предпочтительном варианте воплощения один или более этапов корректировки pH проводятся добавлением pH-модифицирующего раствора к фракции плазмы путем распыления.

[0151] В определенных вариантах воплощения предлагается водная IgG-композиция, которая готовится способом очистки, предложенным здесь, причем способ содержит корректирование pH осаждаемой фракции плазмы после и/или одновременно с добавлением осаждающего агента *(например,* спирта или полиэтиленгликоля). В определенных вариантах воплощения предлагается усовершенствование процесса, при котором pH активно осаждаемой фракции плазмы поддерживается в течение всего этапа инкубирования или выдерживания осаждения длительными контролем и корректировкой pH. В предпочтительных вариантах воплощения корректировка pH производится добавлением pH-модифицирующего раствора путем распыления.

[0152] В одном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагаются водные IgG-композиции, содержащие белок в концентрации приблизительно 30 г/л–250 г/л. В определенных вариантах воплощения концентрация белка в IgG-композиции равна приблизительно 50 г/л–200 г/л либо приблизительно 70 г/л–150 г/л, либо приблизительно 90 г/л–120 г/л, либо любой подходящей концентрации в этих пределах, к примеру, приблизительно 30 г/л либо приблизительно 35 г/л, 40 г/л, 45 г/л, 50 г/л, 55 г/л, 60 г/л, 65 г/л, 70 г/л, 75 г/л, 80 г/л, 85 г/л, 90 г/л, 95 г/л, 100 г/л, 105 г/л, 110 г/л, 115 г/л, 120 г/л, 125 г/л, 130 г/л, 135 г/л, 140 г/л, 145 г/л, 150 г/л, 155 г/л, 160 г/л, 165 г/л, 170 г/л, 175 г/л, 180 г/л, 185 г/л, 190 г/л, 195 г/л, 200 г/л, 205 г/л, 210 г/л, 215 г/л, 220 г/л, 225 г/л, 230 г/л, 235 г/л, 240 г/л, 245 г/л, 250 г/л или выше. В предпочтительном варианте воплощения концентрация водной IgG-композиции будет равна или приблизительно равна 10%. В особенно предпочтительном варианте воплощения концентрация композиции будет равна 10,2±0,2% (в./об.). В другом предпочтительном варианте воплощения концентрация водной IgG-композиции будет равна или приблизительно равна 20%.

[0153] Способы, предложенные здесь, позволяют получить IgG-композиции с очень высокими степенями чистоты. В одном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 95% от общего количества белка в композиции, предложенной здесь, будет IgG. В других вариантах воплощения по меньшей мере приблизительно 96% белка является IgG либо по меньшей мере приблизительно 97%, 98%, 99%, 99,5% или более от общего количества белка композиции будет IgG. В предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 97% от общего количества белка в композиции будет IgG. В другом предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 98% от общего

количества белка в композиции будет IgG. В ином предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 99% от общего количества белка в композиции будет IgG.

[0154] Аналогично способы, предложенные здесь, позволяют получить IgG-композиции с чрезвычайно низкими уровнями загрязняющих агентов. К примеру, в Таблице 19 предлагаются результаты анализа примесей трех нефасованных растворов IgG, приготовленных способами, предложенными здесь. В определенных вариантах воплощения предлагаются IgG-композиции, содержащие менее чем приблизительно 140 мг/л IgA. В других вариантах воплощения IgG-композиция будет содержать менее чем приблизительно 60 мг/л IgA, предпочтительно - менее чем приблизительно 40 мг/л IgA, наиболее предпочтительно - менее чем приблизительно 30 мг/л IgA.

[0155] В другом варианте воплощения предлагаются IgG-композиции, содержащие менее чем приблизительно 50 мг/л IgM. В других вариантах воплощения IgG-композиция будет содержать менее чем приблизительно 25 мг/л IgM, предпочтительно - менее чем приблизительно 10 мг/л IgM, более предпочтительно - менее чем приблизительно 5 мг/л IgM, более предпочтительно - менее чем приблизительно 4 мг/л IgM, более предпочтительно - менее чем приблизительно 3 мг/л IgM, наиболее предпочтительно - менее чем приблизительно 2,5 мг/л IgM.

[0156] В другом варианте воплощения предлагаются IgG-композиции, содержащие менее чем приблизительно 100 PL-1 нмоль/мл мин. амидолитической активности. В других вариантах воплощения IgG-композиция будет содержать менее чем приблизительно 50 PL-1 нмоль/мл мин. амидолитической активности, предпочтительно - менее чем приблизительно 25 PL-1 нмоль/мл мин. амидолитической активности, более предпочтительно - менее чем приблизительно 20 PL-1 нмоль/мл мин. амидолитической активности, более предпочтительно - менее чем приблизительно 15 PL-1 нмоль/мл мин. амидолитической активности, наиболее предпочтительно - менее чем приблизительно 10 PL-1 нмоль/мл мин. амидолитической активности.

[0157] В другом варианте воплощения предлагаются IgG-композиции, содержащие менее чем приблизительно 20 мг/л фибриногена. В других вариантах воплощения IgG-композиция будет содержать менее чем приблизительно 10 мг/л фибриногена, предпочтительно - менее чем приблизительно 5 мг/л фибриногена, более предпочтительно - менее чем приблизительно 2,5 мг/л фибриногена, более предпочтительно - менее чем приблизительно 1 мг/л фибриногена, более предпочтительно - менее чем приблизительно 0,5 мг/л фибриногена, наиболее предпочтительно - менее чем приблизительно 0,25 мг/л фибриногена.

[0158] В еще одном варианте воплощения предлагаются IgG-композиции, состоящие преимущественно из мономеров/димеров IgG. В одном варианте воплощения предлагается IgG-композиция, в которой по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% IgG мономерны или димерны. В предпочтительном варианте воплощения предлагается IgG-композиция, в которой по меньшей мере 97% IgG

мономерны или димерны. В более предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере 99% IgG мономерны или димерны. В более предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере 99,5% IgG мономерны или димерны. В более предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере 99,7% IgG мономерны или димерны.

2. Фармацевтические Композиции

[0159] В ином аспекте в настоящем изобретении предлагаются фармацевтические композиции и составы, содержащие очищенный IgG, полученные способами, представленными здесь. В общем фармацевтические композиции и составы IgG, полученные новыми способами, предложенными здесь, имеют большие содержание IgG и чистоту. К примеру, фармацевтические композиции и составы IgG, предложенные здесь, могут иметь содержание белка по меньшей мере приблизительно 7% (в./об.) и содержание IgG более чем приблизительно 95% чистоты. Эти высокочистые фармацевтические композиции и составы IgG пригодны для терапевтического введения, *например,* для IVIG-терапии. В предпочтительном варианте воплощения фармацевтическая IgG-композиция составлена для внутривенного введения *(т.н.* IVIG-терапии).

[0160] В одном варианте воплощения фармацевтические композиции, предложенные здесь, готовятся составлением водной IgG-композиции, выделенной способом, предложенным здесь. Как правило, составленная композиция будет подвергнута по меньшей мере одному, предпочтительно - по меньшей мере двум, наиболее предпочтительно - по меньшей мере трем этапам инактивации или удаления вирусов. Неограничивающие примеры этапов инактивации или удаления вирусов, которые могут использоваться со способами, предложенными здесь, включают обработку растворителем/детергентом (Horowitz *et al., Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 и Kreil *et al., Transfusion* 2003 (43):1023-1028, оба из которых включены в настоящую заявку недвусмысленным образом посредством ссылки во всей полноте для всех целей), нанофильтрацию (Hamamoto *et al., Vox Sang* 1989 (56)230-236 и Yuasa *et al.,J Gen Virol.*1991 (72 (pt 8)):2021-2024, оба из которых включены в настоящую заявку недвусмысленным образом посредством ссылки во всей полноте для всех целей), а также инкубирование с низким pH при высоких температурах (Kempf *et al., Transfusion* 1991 (31)423-427 и Louie *et al., Biologicals* 1994 (22):13-19).

[0161] В определенных вариантах воплощения предлагаются фармацевтические составы с содержанием IgG от приблизительно 80 г/л IgG до приблизительно 120 г/л IgG. Как правило, подобные составы IVIG готовятся выделением IgG-композиции из плазмы способом, предложенным здесь, концентрированием композиции и составлением концентрированной композиции в раствор, пригодный для внутривенного введения. IgG-композиции могут быть концентрированы любым пригодным способом, известным специалисту в данной области техники. В одном варианте воплощения композицию концентрируют ультрафильтрацией/диафильтрацией. В некоторых вариантах воплощения прибор для ультрафильтрации, используемый для концентрирования композиции, будет оснащен

ультрафильтрационной мембраной с номинальным молекулярным весом отсечения (NMWCO) менее чем приблизительно 100 кДа или менее чем приблизительно 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 или менее кДа. В предпочтительном варианте воплощения ультрафильтрационная мембрана имеет NMWCO не более чем 50 кДа. Обмен буфера может быть достигнут любым пригодным способом, известным специалисту в данной области техники. В конкретном варианте воплощения обмен буфера достигается диафильтрацией.

[0162] В одном конкретном варианте воплощения предлагается фармацевтическая IgG-композиция, отличающаяся тем, что IgG-композиция была выделена из плазмы способом, который включает этапы: (а) осаждения криосупернатантной плазменной фракции на первом этапе осаждения при помощи приблизительно 6%–10%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением супернатанта, обогащенного IgG, (б) осаждения IgG из супернатанта при помощи приблизительно 20%–30%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением первого осадка, (в) ресуспендирования первого осадка, полученного на этапе (б), с получением суспензии, (г) обработки детергентом суспензии, полученной на этапе (в) , (д) осаждения IgG из суспензии при помощи приблизительно 20%–30%-го спирта при pH приблизительно 6,7–7,3 с получением второго осадка, (е) ресуспендирования второго осадка, полученного на этапе (д) , (ж) обработки суспензии, полученной на этапе (е) , растворителем и/или детергентом, (з) проведения по меньшей мере одного разделения ионообменной хроматографией; (и) проведения обработки растворителем/детергентом; и (к) подвергания композиции нанофильтрации с получением композиции с концентрированным IgG.

[0163] В конкретном варианте воплощения предлагается фармацевтическая композиция с IgG, отличающаяся тем, что IgG-композиция была выделена из плазмы способом, содержащим этапы: (а) доведения pH криосупернатантной плазменной фракции приблизительно до 7,0, (б) доведения концентрации этанола в криосупернатантной плазменной фракции этапа (а) приблизительно до 25% (об./об.) при температуре между приблизительно -5°C и приблизительно -9°C с получением смеси, (в) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (б), (г) ресуспендирования осадка, полученного на этапе (в), в буфере, содержащем фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, приблизительно равным 600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением суспензии, (д) смешивания тонко измельченного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией, полученной на этапе (г) , в течение по меньшей мере приблизительно 30 минут, (е) фильтрования суспензии на фильтр-прессе с получением фильтрата, (ж) промывания фильтр-пресса по меньшей мере 3 мертвыми объемами фильтр-пресса буфера, содержащего фосфат и ацетат, pH которого был откорректирован объемом, равным или приблизительно равным 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, с получением промывочного раствора, (з) смешивания фильтрата, полученного на этапе (е) , с промывочным раствором, полученным на этапе (ж) , с получением раствора и обработки раствора поверхностно-активным веществом, (и) доведения pH раствора, полученного на этапе (з) , до уровня

приблизительно 7,0 и добавления этанола до финальной концентрации, приблизительно равной 25%, с получением осадка, (к) разделения жидкости и осадка из смеси, полученной на этапе (и) , (л) растворения осадка в водном растворе, содержащем растворитель или поверхностно-активное вещество, и выдерживания раствора по меньшей мере в течение 60 минут, (м) прохождения раствора с этапа (л) через катионообменную хроматографическую колонку и элюирования в элюат белков, абсорбированных в колонке, (н) прохождения элюата, полученного на этапе (м) , через анионообменную хроматографическую колонку для получения эффлюента, (о) прохождения эффлюента с этапа (н) через нанофильтр для получения нанофильтрата, (п) прохождения нанофильтрата, полученного на этапе (о) , через ультрафильтрационную мембрану для получения ультрафильтрата; и (р) диафильтрации ультрафильтрата, полученного на этапе (п) , против диафильтрационного буфера для получения диафильтрата с концентрацией белка между приблизительно 8% (в./об.) и приблизительно 12% (в./об.) с получением композиции концентрированного IgG.

[0164] В определенных вариантах воплощения предлагается фармацевтическая композиция IgG, отличающаяся тем, что IgG-композиция приготавливается с использованием способов, предложенных здесь, которые включают усовершенствования двух или более этапов процесса разделения, описанного выше. К примеру, в определенных вариантах воплощения усовершенствования могут быть введены на первом этапе осаждения, этапе осаждения Модифицированной Фракции II+III, этапе растворения Модифицированной Фракции II+III и/или этапе фильтрования суспензии Модифицированной Фракции II+III.

[0165] В определенных вариантах воплощения предлагается фармацевтическая IgG-композиция, отличающаяся тем, что IgG-композиция приготавливается способом очистки, предложенным здесь, причем способ содержит добавление распылением одного или более растворов, которые, иначе, вводились во фракцию плазмы струйным добавлением. К примеру, в определенных вариантах воплощения способ будет содержать введение спирта *(например,* этанола) во фракцию плазмы путем распыления. В других вариантах воплощения растворы, которые могут добавляться к фракции плазмы распылением, включают, не ограничиваясь перечисленным, pH-модифицирующий раствор, раствор растворителя, раствор детергента, буфер для разбавления, раствор для изменения проводимости и т.п. В предпочтительном варианте воплощения один или более этапов спиртового осаждения проводятся добавлением спирта к фракции плазмы путем распыления. Во втором предпочтительном варианте воплощения один или более этапов корректировки pH проводятся добавлением pH-модифицирующего раствора к фракции плазмы путем распыления.

[0166] В определенных вариантах воплощения предлагается фармацевтическая IgG-композиция, отличающаяся тем, что IgG-композиция приготавливается способом очистки, предложенным здесь, причем способ содержит корректирование pH осаждаемой фракции плазмы

после и/или одновременно с добавлением осаждающего агента *(например,* спирта или полиэтиленгликоля). В определенных вариантах воплощения предлагается усовершенствование процесса, при котором pH активно осаждаемой фракции плазмы поддерживается в течение всего этапа инкубирования или выдерживания осаждения длительными контролем и корректировкой pH. В предпочтительных вариантах воплощения корректировка pH производится добавлением pH-модифицирующего раствора путем распыления.

[0167] В одном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая IgG-композиция, содержащая белок в концентрации приблизительно 70 г/л–130 г/л. В определенных вариантах воплощения концентрация белка в IgG-композиции равна приблизительно 80 г/л–120 г/л, предпочтительно - приблизительно 90 г/л–110 г/л, наиболее предпочтительно - приблизительно 100 г/л, либо любой подходящей концентрации в этих пределах, к примеру, приблизительно 70 г/л, 75 г/л, 80 г/л, 85 г/л, 90 г/л, 95 г/л, 100 г/л, 105 г/л, 110 г/л, 115 г/л, 120 г/л, 125 г/л или 130 г/л. В предпочтительном варианте воплощения предлагается фармацевтическая композиция с концентрацией белка, равной или приблизительно равной 100 г/л. В особенно предпочтительном варианте воплощения концентрация белка фармацевтической композиции будет равна или приблизительно равна 102 г/л.

[0168] В ином варианте воплощения в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая IgG-композиция, содержащая белок в концентрации приблизительно 170 г/л–230 г/л. В определенных вариантах воплощения концентрация белка в IgG-композиции равна приблизительно 180 г/л–220 г/л, предпочтительно - приблизительно 190 г/л–210 г/л, наиболее предпочтительно - приблизительно 200 г/л, либо любой подходящей концентрации в этих пределах, к примеру, приблизительно 170 г/л, 175 г/л, 180 г/л, 185 г/л, 190 г/л, 195 г/л, 200 г/л, 205 г/л, 210 г/л, 215 г/л, 220 г/л, 225 г/л или 230 г/л. В предпочтительном варианте воплощения предлагается фармацевтическая композиция с концентрацией белка, равной или приблизительно равной 200 г/л.

[0169] Способы, предложенные здесь, позволяют получить фармацевтические IgG-композиции с очень высокими степенями чистоты. К примеру, в одном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 95% от общего белка в композиции, предложенной здесь, будет IgG. В других вариантах воплощения по меньшей мере приблизительно 96% белка является IgG либо по меньшей мере приблизительно 97%, 98%, 99%, 99,5%, или более от общего белка композиции будет IgG. В предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 97% от общего белка в композиции будет IgG. В другом предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 98% от общего белка в композиции будет IgG. В ином предпочтительном варианте воплощения по меньшей мере приблизительно 99% от общего белка в композиции будет IgG.

[0170] Аналогично способы, предложенные здесь, позволяют получить фармацевтические IgG-композиции с чрезвычайно низкими уровнями загрязняющих агентов. К примеру, в определенных вариантах воплощения предлагаются IgG-композиции, содержащие менее чем приблизительно 100 мг/л IgA. В других вариантах воплощения IgG-композиция будет содержать менее чем приблизительно 50 мг/л IgA, предпочтительно - менее чем приблизительно 35 мг/л IgA, наиболее предпочтительно - менее чем приблизительно 20 мг/л IgA.

[0171] Фармацевтическая композиция, предложенная здесь, будет, как правило, содержать один или более буферизующих агентов или pH-стабилизирующих агентов, пригодных для внутривенного, подкожного и/или внутримышечного введения. Неограничивающие примеры буферных агентов, пригодных для составления IgG-композиции, предложенной здесь, включают глицин, цитрат, фосфат, ацетат, глутамат, тартрат, бензоат, лактат, гистидин или другие аминокислоты, глюконат, малат, сукцинат, формиат, пропионат, карбонат или их комбинация, доведенная до необходимого pH. Как правило, буферного агента будет достаточно для поддержания подходящего pH состава в течение длительного периода времени. В предпочтительном варианте воплощения буферным агентом является глицин.

[0172] В некоторых вариантах воплощения концентрация буферного агента в составе будет равна приблизительно 100 мМ — 400 мМ, предпочтительно - приблизительно 150 мМ — 350 мМ, более предпочтительно - приблизительно 200 мМ — 300 мМ, наиболее предпочтительно - приблизительно 250 мМ. В особенно предпочтительном варианте воплощения IVIG-композиция будет содержать приблизительно 200 мМ — 300 мМ глицина, наиболее предпочтительно - приблизительно 250 мМ глицина.

[0173] В определенных вариантах воплощения pH состава будет приблизительно 4,1–5,6, предпочтительно - приблизительно 4,4–5,3, наиболее предпочтительно - приблизительно 4,6–5,1. В конкретных вариантах воплощения pH состава может быть равен приблизительно 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5 либо 5,6. В предпочтительном варианте воплощения pH состава будет приблизительно равен 4,6–5,1.

[0174] В определенных вариантах воплощения фармацевтические композиции, предложенные здесь, могут, необязательно, дополнительно содержать агент для корректирования осмоляльности композиции. Неограничивающими примерами агентов осмоляльности являются маннитол, сорбитол, глицерин, сахароза, глюкоза, декстроза, левулоза, фруктоза, лактоза, полиэтиленгликоли, фосфаты, натрия хлорид, калия хлорид, кальция глюконоглюкогептонат, диметилсульфон и т.п.

[0175] Как правило, составы, предложенные здесь, будут иметь осмоляльность, сопоставимую с физиологической осмоляльностью, - приблизительно 285–295 мОсмоль/кг (Lacy *et al., Drug Information Handbook - Lexi-Comp* 1999:1254). В определенных вариантах воплощения

осмоляльность состава будет приблизительно 200–350 мОсмоль/кг, предпочтительно - приблизительно 240–300 мОсмоль/кг. В конкретных вариантах воплощения осмоляльность состава будет равна приблизительно 200 мОсмоль/кг или 210 мОсмоль/кг, 220 мОсмоль/кг, 230 мОсмоль/кг, 240 мОсмоль/кг, 245 мОсмоль/кг, 250 мОсмоль/кг, 255 мОсмоль/кг, 260 мОсмоль/кг, 265 мОсмоль/кг, 270 мОсмоль/кг, 275 мОсмоль/кг, 280 мОсмоль/кг, 285 мОсмоль/кг, 290 мОсмоль/кг, 295 мОсмоль/кг, 300 мОсмоль/кг, 310 мОсмоль/кг, 320 мОсмоль/кг, 330 мОсмоль/кг, 340 мОсмоль/кг, 340 мОсмоль/кг, либо 350 мОсмоль/кг.

[0176] IgG-составы, предложенные здесь, обычно стабильны в жидком виде в течение длительного периода времени. В определенных вариантах воплощения составы стабильны в течение по меньшей мере 3 месяцев при комнатной температуре или по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, или 24 месяцев при комнатной температуре. Состав также будет обычно стабилен 6 или по меньшей мере приблизительно 18 месяцев в рефрижерируемых условиях (обычно приблизительно 2°C—8°C), либо в течение по меньшей мере приблизительно 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 или 45 месяцев в рефрижерируемых условиях.

IV. Способы лечения

[0177] По стандартной практике в современной медицине стерилизованные препараты концентрированных иммуноглобулинов (особенно IgG) используются для лечения медицинских состояний трех основных классов: иммунодефицитных состояний, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, а также острых инфекций. Данные IgG-препараты могут быть особенно полезны для лечения множественного склероза (особенно рецидивирующе-ремиттирующего множественного склероза или РРМС), болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Очищенный препарат IgG по данному изобретению пригоден для этих целей, а также иных клинически принятых способов использования препаратов IgG.

[0178] FDA одобрила использование IVIG по множеству показаний, включая аллогенную пересадку костного мозга, хроническую лимфоцитную лейкемию, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), ВИЧ у детей, первичные иммунодефицитные состояния, болезнь Кавасаки, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП), пересадку почки реципиенту с высоким уровнем антител или от АВО-несовместимого донора. В определенных вариантах воплощения IVIG-композиции, предложенные здесь, пригодны для лечения или контролирования этих заболеваний и состояний.

[0179] Кроме того, не по одобренным показаниям IVIG часто назначаются пациентам для лечения или контролирования различных состояний, таких как синдром хронической усталости, колит, вызванный *Clostridiumdifficile*, дерматомиозит и полимиозит, офтальмопатию Грейвса, синдром Гийена-Барре, мышечную дистрофию, миозит с включёнными тельцами, синдром Ламберта–Итона, красную волчанку, мультифокальную моторную нейропатию, множественный

склероз (МС), тяжелую миастению, неонатальную аллоиммунную тромбоцитопению, инфекцию Парвовирусом B19, пузырчатку, послетрансфузионную пурпуру, отторжение трансплантата почки, самопроизвольный аборт/выкидыш, синдром мышечной скованности, опсоклонус Миоклонус, тяжелый сепсис и септический шок у критически больных взрослых, токсический эпидермальный некролиз, хронический лимфолейкоз, множественную миелому, агаммаглобулинемию, сцепленную с Х-хромосомой, и гипогаммаглобулинемию. В определенных вариантах воплощения IVIG-композиции, предложенные здесь, пригодны для лечения или контролирования этих заболеваний и состояний.

[0180] Наконец, предлагалось экспериментальное использование IVIG для лечения или контроля заболеваний, включая первичный иммунодефицит, PPMC, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (Патентная Заявка США № 2009/0148463, которая включена сюда посредством ссылки во всей полноте для всех целей). В определенных вариантах воплощения IVIG-композиции, предложенные здесь, пригодны для лечения или контролирования первичного иммунодефицита, PPMC, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. В определенных вариантах воплощения, включающих ежедневное введение, эффективное количество для введения субъекту может быть определено врачом, исходя из индивидуальных отличий в возрасте, весе, тяжести заболевания, пути введения *(например,* внутривенный или подкожный) и ответа на терапию. В определенных вариантах воплощения иммуноглобулиновый препарат по этому изобретению может вводиться субъекту в количестве от приблизительно 5 мг/килограмм до приблизительно 2000 мг/килограмм ежедневно. В дополнительных вариантах воплощения иммуноглобулиновый препарат может вводиться в количествах по меньшей мере приблизительно 10 мг/килограмм, по меньшей мере 15 мг/килограмм, по меньшей мере 20 мг/килограмм, по меньшей мере 25 мг/килограмм, по меньшей мере 30 мг/килограмм либо по меньшей мере 50 мг/килограмм. В дополнительных вариантах воплощения иммуноглобулиновый препарат может вводиться субъекту в дозах вплоть до приблизительно 100 мг/килограмм, до приблизительно 150 мг/килограмм, до приблизительно 200 мг/килограмм, до приблизительно 250 мг/килограмм, до приблизительно 300 мг/килограмм, до приблизительно 400 мг/килограмм ежедневно. В иных вариантах воплощения дозы иммуноглобулинового препарата могут быть больше или меньше. Помимо этого, иммуноглобулиновые препараты могут вводиться одной или более дозами в день. Врачи, которым известны заболевания, которые лечатся препаратами IgG, могут определить нужную для пациента дозу в соответствии с критериями, известными в данной области техники.

[0181] В соответствии с настоящим изобретением время, необходимое для завершения терапевтического курса, может быть определено врачом и может варьироваться от такого краткого срока как один день и вплоть до срока более чем месяц. В определенных вариантах воплощения терапевтический курс может составлять 1–6 месяцев.

[0182] Эффективное количество IVIG-препарата вводится субъекту внутривенно. Термин «эффективное количество» относится к такому количеству IVIG-препарата, которое обеспечивает облегчение или ослабление заболевания или состояния субъекта. Эффективное количество для введения субъекту может быть определено врачом, исходя из индивидуальных отличий в возрасте, весе, заболевания или состояния, по поводу которых осуществляется лечение, тяжести заболевания и ответа на терапию. В определенных вариантах воплощения IVIG-препарат по этому изобретению может вводиться субъекту в дозе от приблизительно 5 мг/килограмм до приблизительно 2000 мг/килограмм за введение. В определенных вариантах воплощения доза может составлять по меньшей мере приблизительно 5 мг/кг или по меньшей мере приблизительно 10 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг, 150 мг/кг, 175 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 300 мг/кг, 350 мг/кг, 400 мг/кг, 450 мг/кг, 500 мг/кг, 550 мг/кг, 600 мг/кг, 650 мг/кг, 700 мг/кг, 750 мг/кг, 800 мг/кг, 850 мг/кг, 900 мг/кг, 950 мг/кг, 1000 мг/кг, 1100 мг/кг, 1200 мг/кг, 1300 мг/кг, 1400 мг/кг, 1500 мг/кг, 1600 мг/кг, 1700 мг/кг, 1800 мг/кг, 1900 мг/кг, или по меньшей мере приблизительно 2000 мг/кг.

[0183] Дозировка и частота терапии IVIG будет зависеть от, среди прочих факторов, тяжести заболевания или состояния, по поводу которого производится лечение, и тяжести заболевания или состояния пациента. Как правило, при первичной дисфункции иммунитета назначается доза в приблизительно 100 мг/кг – 400 мг/кг массы тела каждые 3–4 недели. При неврологических и аутоиммунных заболеваниях вводится плоть до 2 г/кг массы тела в течение трех-шести месяцев пятидневными ежемесячными курсами. Как правило, дополнительно производится поддерживающая терапия, включающая введение приблизительно 100 мг/кг – 400 мг/кг массы тела приблизительно один раз каждые 3–4 недели. Обычно пациент будет получать дозу или лечение приблизительно один раз каждые 14–35 дней либо каждые 21–28 дней. Частота терапии будет зависеть от, среди прочих факторов, тяжести заболевания или состояния, по поводу которого производится лечение, и тяжести заболевания или состояния пациента.

[0184] В предпочтительном варианте воплощения предлагается способ лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у человека, нуждающегося в этом, способ, включающий введение фармацевтической IVIG-композиции по настоящему изобретению. В родственном варианте воплощения в настоящем изобретении предлагаются IVIG-композиции для лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у человека, нуждающегося в этом, произведенные способом, предложенным здесь.

[0185] В определенных вариантах воплощения иммунодефицит, аутоиммунное заболевание или острая инфекция выбраны из аллогенной пересадки костного мозга, хронического лимфоцитного лейкоза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), ВИЧ у детей, первичных иммунодефицитных состояний, болезни Кавасаки, хронической воспалительной

демиелинизирующей полинейропатии (ХВДП), пересадки почки реципиенту с высоким уровнем антител или от АВО-несовместимого донора, синдрома хронической усталости, колита, вызванного *Clostridiumdifficile*, дерматомиозита и полимиозита, офтальмопатии Грейвса, синдрома Гийена-Барре, мышечной дистрофии, миозита с включёнными тельцами, синдрома Ламберта–Итона, красной волчанки, мультифокальной моторной нейропатии, множественного склероза (МС), тяжелой миастении, неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении, инфекции Парвовирусом B19, пузырчатки, послетрансфузионной пурпуры, отторжения трансплантата почки, самопроизвольного аборта/выкидыша, синдрома мышечной скованности, опсоклонуса Миоклонуса, тяжелого сепсиса и септического шока у критически больных взрослых, токсического эпидермального некролиза, хронического лимфолейкоза, множественной миеломы, агаммаглобулинемии, сцепленной с Х-хромосомой, гипогаммаглобулинемии, первичного иммунодефицита, рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона.

ПРИМЕРЫ

[0186] Приведенные ниже примеры представлены лишь для иллюстрирования, а не для ограничения. Специалисты в данной области техники легко распознают множество некритичных параметров, которые могут быть изменены или модифицированы с получением практически таких же или сходных результатов.

Пример 1

[0187] В данном примере продемонстрировано, что значительные количества фибриногена, амидолитической активности, активности активатора прекалликреина и липопротеинов могут быть удалены из экстрагированной суспензии пасты модифицированной Фракции II+III обработкой Аэросилом до фильтрования.

[0188] Высокодисперсный кремнезем (Аэросил 380) в настоящее время используется для адсорбирования фибриногена, амидолитической активности, активности активатора прекалликреина и липопротеинов. Чтобы более подробно исследовать влияние Аэросила, шесть суспензий модифицированной Фракции II+III были обработаны различными количествами Аэросила перед фильтрованием. Вкратце, буфер для растворения, содержащий 5мМ натрия ацетата/5мМ натрия дигидрофосфата с pH 4,5, использовался для ресуспендирования модифицированной пасты II+III, полученной так, как описано здесь, в соотношении 15 граммов буфера для растворения на грамм пасты II+III. После добавления пасты суспензию перемешивали один час при 2°C–8°C при контроле pH (пределы межоперационного контроля pH: 4,9–5,3). Нами было обнаружено, что pH этой суспензии в норме сдвигается до pH приблизительно 5,1 и, таким образом, дальнейшая корректировка pH не нужна. После дополнительной экстракции в течение по меньшей мере 120 минут в контейнеры был добавлен Аэросил 380 по 0–100 мг на грамм пасты II+III, и суспензии инкубировались один час. Диатомовую землю добавляли до глубинной

фильтрации с фильтром Cuno 50SA. После фильтрации фильтры были промыты экстракционным буфером, содержащим 8 г $л^{-1}$ цитрата и 0,2% полисорбата 80 (pH 5,0), смыв был добавлен к фильтрату. Комбинированные фильтрат и промывочный раствор затем были обработаны Полисорбатом 80 для дальнейшего растворения гидрофобных примесей, к примеру, липопротеинов, и IgG был осажден 25% этанолом (pH 7) при -8°C-(-10°C). Полученный осадок Ppt G был почти белым и содержал более чистый IgG. Осадок затем был растворен в очищенной воде в соотношении 7 граммов воды на 2 грамма осадка Ppt G.

[0189] Для растворов IgG были определены извлечение IgG и содержание примесей после этапа фильтрации на Cuno. В частности, измерялись уровни амидолитической активности (PL-1), активности активатора прекалликреина и фибриногена (Таблица 3). В частности, как показано в Таблице 3, протоколы экстракции, в которых использовалось 40–60мг Аэросила 380 на г пасты II+III дали приемлемые уровни извлечения IgG со значительным понижением амидолитической и активности активатора прекалликреина, а также значительное снижение уровня фибриногена в фильтрате. В сравнении с экстракциями, проводившимися без обработки Аэросилом, добавление 40мг Аэросила 380 на грамм пасты II+III обеспечило почти 90%-е снижение активности активатора прекалликреина и содержания фибриногена и 60%-е снижение амидолитической активности с поддержанием сходного извлечения IgG (73%).

Таблица 1.

Влияние количества Аэросила 380 на этапе Cuno Фильтрации II+III (Экстрагирование в Условиях GAMMAGARD® LIQUID)

Аэросил	IgG	IgG	PL-1	Активность активатора прекалликреина	Фибриноген
мг $г^{-1}$ пасты II+III	г $л^{-1}$ плазмы	Извлечение	мкмоль $мин^{-1}$ $г^{-1}$ белка (Ppt G)	МЕ $г^{-1}$ белка (Ppt G)	мг $г^{-1}$ белка (Ppt G)
0	4,9	72%	1,3	2403	19,5
20	5,2	82%	0,7	974	8,2
40	4,8	73%	0,5	290	2,1
60	4,8	71%	0,3	90	0,1
80	4,2	63%	ниже предела обнаружения	37	0,0
100	4,3	65%	ниже предела обнаружения	16	0,0

Пример 2

[0190] В данном примере продемонстрировано, что значительное количество фибриногена может быть удалено из экстрагированной суспензии пасты модифицированной Фракции II+III обработкой Аэросилом до фильтрования. Одной целью данного эксперимента было определить условия, подходящие для эффективного извлечения фибриногена без существенных потерь IgG.

[0191] Модифицированная паста II+III, приготовленная согласно способу, предложенному здесь, была растворена в буфере 5мМ натрия ацетата/5мМ одноосновного натрия фосфата с pH 4,5. Соотношение растворения составляло 15кг буфера на 1 кг пасты II+III. Количество уксусной кислоты, добавленной к буферу, было выбрано так, чтобы pH после шестидесяти минут перемешивания составлял 4,9. Чтобы полностью гомогенизировать суспензию, ее перемешивали вплоть до двадцати часов при 2–8°C перед разделением на 6 порций по 50 мл, которые налили в стаканы вместимостью 100 мл, в которых уже присутствовали различные количества Аэросила 380 согласно Таблице 2. Растворы суспензии II+III затем были перемешаны 80 минут в присутствии Аэросила, а затем обработаны и проанализированы. После перемешивания все образцы были центрифугированы в Heraeus Cryofuge 8500i при 4600 оборотов/мин. в течение 30 минут при 4°C в пробирках falcon вместимостью 50 мл.

[0192] В этом эксперименте измерения IgG проводились нефелометрическим тестом, который был выбран вследствие большей правильности в сравнении с тестом ELISA при высоких концентрациях, обнаруживаемых в растворах суспензии II+III. Для минимизации влияния неспецифической мутности образцы перед анализом были профильтрованы через фильтры 0,45 мкм. Для IgM, IgA и фибриногена были предпочтены тесты ELISA из-за низких концентраций этих примесей в суспензии. Результаты эксперимента показаны ниже в Таблице 2.

[0193] Для дальнейшей характеристики влияния обработки Аэросилом на удаление фибриногена и потерю IgG, так, как описано в Примере 1, были далее оттитрованы концентрации Аэросила в пределах 0 мг и 40 мг на грамм модифицированной пасты II+III. Результаты, показанные в Таблице 2, подтверждают высокую способность Аэросила к понижению уровня фибриногена в этой фракции. В частности, при использовании 40 мг на грамм пасты II+III наблюдается почти 90%-е снижение фибриногена, а извлечение IgG в фильтровальном слое снижается лишь на 10%.

Таблица 2.

Результаты варьирования условий растворения после экстракции II+III при помощи 5мМ NaAc/5мМ NaH_2PO_4, pH 4,5, с соотношением растворения 1кг II+III на 15кг буфера после центрифугирования

Условия растворения			Показатели в супернатанте													
					Белок (Биурет)			IgM ELISA		IgG неф.		IgA ELISA		Фибриноген ELISA	
Условия		дополнительное время перемешивания (мин)	pH	проводимость ($мС \cdot см^{-1}$)	($г \cdot л^{-1}$)	(г)	($г \cdot л^{-1}$ плазмы)	($мкг \cdot мл^{-1}$)	($г \cdot л^{-1}$ плазмы)	$Мг \cdot мл^{-1}$	($г \cdot л^{-1}$ плазмы)	($мкг \cdot мл^{-1}$)	($г \cdot л^{-1}$ плазмы)	($мкг \cdot мл^{-1}$)	($г \cdot л^{-1}$ плазмы)
Холостая проба 80 мин.		80	5,0	1,5	13,76	0,69	8,5	476	0,29	7,19	4,44	993	0,61	400	0,25
Аэросил 5		80	5,0	1,5	13,40	0,67	8,3	457	0,28	7,30	4,51	983	0,61	353	0,22
Аэросил 10	$мг \cdot г^{-1}$	80	5,0	1,5	13,44	0,67	8,3	464	0,29	6,97	4,30	1009	0,62	272	0,17
Аэросил 15	пасты II+III	80	5,0	1,5	12,01	0,60	7,4	451	0,28	7,04	4,35	1005	0,62	230	0,14
Аэросил 30		80	5,0	1,5	12,49	0,62	7,7	468	0,29	6,77	4,18	944	0,58	95	0,06
Аэросил 40		80	5,0	1,5	12,21	0,61	7,5	449	0,28	6,71	4,14	899	0,56	41	0,03

Пример 3

[0194] В настоящем примере показаны условия, подходящие для высокоэффективной экстракции IgG из пасты модифицированной Фракции II+III, в то же время ограничивающие уровни вредных примесей. В частности, исследовались параметры, включая концентрацию уксусной кислоты, используемой в буфере для растворения II+III и обработки Аэросилом экстрагированного раствора перед фильтрованием.

[0195] Паста II+III была экстрагирована в 5мМ натрия ацетата, 5мМ натрия дигидрофосфата и различных количествах концентрированной уксусной кислоты, как показано в Таблице 1, в течение 180 минут при 2°С—8°С с последующим добавлением Аэросила 380, как показано в Таблице 1. Спустя один час перемешивания, суспензия была осветлена фильтрованием на Cuno 50SA в присутствии диатомовой земли. Пост-промывка фильтра производилась с тем же буфером, что и экстракция, за исключением того, что использовалось другое количество уксусной кислоты, как указано в Таблице 1, с использованием 40% объема суспензии до фильтрования. Проводилось осаждение осадка G в присутствии 25% этилового спирта; 8 г $л^{-1}$ натрия цитрата и 0,2% Твин 80 (pH 7) при -8°С было представлено, и после выдерживания в течение 8 часов осуществлялось разделение центрифугированием на Heraeus Cryofuge 8500i в стаканах из нержавеющей стали при 4600 оборотов/мин. в течение 30 минут при -10°С. Осадок был растворен в очищенной воде в соотношении 1:2.

Таблица 3

Таблица 3. Влияние количества уксусной кислоты на корректировку pH экстракционного буфера и количества Аэросила, пошедшего на осветление, на выход IgG и чистоту в Ppt G и потерю IgG в фильтровальном осадке

	Аэросил (мг $г^{-1}$ II+III)	0	20	40	40
буфер для растворения	**уксусная кислота (г $л^{-1}$)**	**0,40**	**0,40**	**0,40**	**0,51**
	pH	4,52	4,52	4,52	4,46
экстракт II+III	pH	5,00	5,00	5,00	4,94
	проводимость (мС $см^{-1}$)	1,340	1,340	1,340	1,344
пре/пост-промывочный буфер	уксусная кислота (г $л^{-1}$)	0,12	0,12	0,12	0,12
	PH	5,02	5,02	5,02	5,02
фильтрат II+III	CAE альбумин (%)	11,9	12,5	12,3	10,7
	CAE α/β-глобулин	25,5	22,9	18,9	17,2
	CAE денатурированный белок	3,2	0,0	0,0	0,0
	CAE (% γ-глобулин)	59,4	64,6	68,8	72,1
	pH	5,00	5,03	5,04	4,92
потеря IgG в фильтровальном слое	(г $л^{-1}$ плазмы)	0,09	0,20	0,56	0,29
растворенный PptG	CAE альбумин (%)	0,3	0,5	0,3	0,3
	CAE α/β-глобулин	16,2	14,3	12,5	13,0
	CAE денатурированный белок	0,0	0,0	0,0	0,0
	CAE (% γ-глобулин)	83,5	85,2	87,2	86,7
	фибриноген (мг $л^{-1}$ плазмы)	129	32	<4	4
	PKA (ME $мг^{-1}$ белка)	126	60	9	10
	PL-1 (мкмоль $мл^{-1}$ $г^{-1}$)	0,9	0,6	0,5	0,6
супернатант PptG	PH	7,20	7,35	7,30	6,96
потеря IgG в супернатанте PptG	(г $л^{-1}$ плазмы)	0,14	0,13	0,11	0,09

[0196] Как следует из Таблицы 1, добавление Аэросила к суспензии пасты II+III имеет выраженное влияние на чистоту γ-глобулина во фракции Ppt G. Без Аэросила чистота γ-глобулина равна лишь 83,5%, а добавление 40 мг Аэросила на грамм пасты II+III к суспензии пасты II+III повышает чистоту γ-глобулина до 87,2%. Исходя из этого, обработка Аэросилом обеспечивает значительное снижение уровней фибриногена, активности активатора прекалликреина и амидолитической активности. Одним из недостатков адсорбции примесей на Аэросиле является то, что потеря IgG в фильтровальном слое повышается с повышением количеств Аэросила. Тем не менее, как показано в Таблице 1, большие концентрации уксусной кислоты в экстракционном буфере частично уравновешивают влияние Аэросила на потерю IgG в фильтровальном слое и далее снижают потерю IgG в супернатантной фракции Ppt G. Как следует из Таблицы 1, повышение количества уксусной кислоты в буфере для растворения от 400 мкл на литр пасты до 510 мкл на литр пасты снижает количество IgG, потерянного в фильтровальном слое, почти на 50%. Преимуществом служит то, что высокая концентрация уксусной кислоты не влияет на чистоту γ-глобулина во фракции Ppt G (87,2% чистота при использовании 400 мкл на литр пасты vs. 86,7% чистоты при использовании 510 мкл на литр пасты). Помимо этого, результаты свидетельствуют о том, что разница в величине pH, обусловленная различным количеством

уксусной кислоты, ничтожна вследствие буферной емкости уксусной кислоты вблизи ее величины pka 4,75 (Merck). Вследствие этого, для большей точности при крупномасштабном производстве, уксусная кислота должна при добавлении измеряться по весу. Таким образом, влияние Аэросила на чистоту гораздо выше влияния уксусной кислоты на чистоту в исследованном интервале, судя по содержанию γ-глобулина, измеренного электрофорезом на пленке из ацетата целлюлозы.

Пример 4

[0197] Результаты, установленные в Примере 3, позволяют предположить, что количество IgG, потерянного в фильтровальном слое, сильно зависит от количества уксусной кислоты, использованной для корректировки pH экстракционного буфера при заданной концентрации Аэросила. Для дальнейшей характеристики этого эффекта модифицированная паста II+III была экстрагирована очищенной водой приблизительно в течение 120 минут до получения гомогенной суспензии и разделена на 4 части. pH этих частей был доведен до 3,8, 4,2, 4,6 и 5,0, соответственно, 1М уксусной кислотой с последующим вторым экстрагированием в течение еще 120 минут. После этого была произведена обработка Аэросилом - 40 мг Аэросила 380 на грамм пасты II+III. Спустя один час перемешивания суспензия была осветлена фильтрованием на Cuno 50SA в присутствии диатомовой земли. Пост-промывка фильтра производилась с использованием 100 процентов объема суспензии до фильтрования экстракционным буфером с pH, подкорректированным так, как указано выше. Фильтрат был обработан 8г $л^{-1}$ натрия цитрата и 0,2% Твин 80, доведен до pH 7,0, и IgG был осажден 25% спиртом при -8°C. Осадок PptG был извлечен центрифугированием при 4600 оборотов/мин. в течение 30 минут при -10°C в Heraeus Cryofuge 8500i в стаканах из нержавеющей стали. Осадок затем был растворен в очищенной воде в соотношении 7 граммов воды на 2 грамма осадка Ppt G. Затем для релевантных фракций были определены извлечение IgG, активность активатора прекалликреина, содержание фибриногена и амидолитическая активность для определения зависимости извлечения от pH (Таблица 4).

Таблица 4

pH-зависимое устранение фибриногена, активности активатора прекалликреина и амидолитической активностей экстракцией и осветлением с обработкой Аэросилом

					Осадок G		
pH экстракции и осветления с уксусной кислотой	концентрация уксусной кислоты после корректировки pH (мМ)	потеря IgG в фильтровальном слое г $л^{-1}$ плазмы	потеря IgG в супернатанте PptG (г $л^{-1}$ плазмы)	IgG потеря Σ (г $л^{-1}$ плазмы)	активность активатора прекалликреина (МЕ $мг^{-1}$)	фибриноген (мг $л^{-1}$ плазмы)	PL-1 (мкмоль $мл^{-1}$ $г^{-1}$)
3,8	75	0,02	0,85	0,87	138	243	-
4,2	25	0,04	0,53	0,57	35	182	-
4,6	10	0,07	0,05	0,12	2	99	2
5,0	5	0,19	0,06	0,25	0,6	3	0,5
3,8	75	-	-	-	116	304	3,8

4,2	25	0,02	0,34	0,36	44	313	2,6
4,6	10	0,04	0,52	0,56	8	148	1,7
5,0	5	0,14	0,09	0,23	3	10	<0,2

[0198] В Таблице 4 показано, что удаление активности активатора прекалликреина, амидолитической активности (PL-1) и фибриногена Аэросилом менее эффективно при низком pH во время осветления. Как может быть понятно из результатов, полученных здесь, pH, которое наиболее эффективно для снижения активности активатора прекалликреина, амидолитической активности (PL-1) и фибриногена, и поддержания эффективного извлечения IgG во фракции Ppt G, равно приблизительно pH 5. Высокие концентрации уксусной кислоты приводят к значительной потере IgG в супернатанте Ppt G (0,85г $л^{-1}$ в присутствии 75мМ уксусной кислоты) при минимизации потерь IgG в фильтровальном слое.

Пример 5

Для определения влияния обработки Аэросилом на результаты, полученные в Примере 4, эксперимент был повторен, но этап обработки Аэросилом был опущен. Вкратце, паста II+III была экстрагирована очищенной водой приблизительно в течение 120 минут до получения гомогенной суспензии и разделена на 4 части. pH этих частей был доведен до 3,8, 4,2, 4,6 и 5,0, соответственно, 1М уксусной кислотой с последующим вторым экстрагированием в течение еще 120 минут. Затем суспензия была осветлена фильтрованием на Cuno 50SA в присутствии диатомовой земли. Пост-промывка фильтра производилась с использованием 100 процентов объема суспензии до фильтрования экстракционным буфером с pH, подкорректированным так, как указано выше. Фильтрат был обработан 8г $л^{-1}$ натрия цитрата и 0,2% Твин 80, доведен до pH 7,0, и IgG был осажден 25% спиртом при -8°C. Осадок Ppt G был извлечен центрифугированием при 4600 оборотов/мин. в течение 30 минут при -10°C в Heraeus Cryofuge 8500i с использованием стаканов из нержавеющей стали. Осадок затем был растворен в очищенной воде в соотношении 7 граммов воды на 2 грамма осадка Ppt G. Затем для релевантных фракций были определены извлечение IgG, активность активатора прекалликреина, содержание фибриногена и амидолитическая активность для определения зависимости извлечения от pH (Таблица 5).

Таблица 5.

pH-зависимое устранение фибриногена, активности активатора прекалликреина и амидолитической активности путем экстракции и осветления без обработки Аэросилом

					Осадок G		
pH экстракции и осветления с уксусной кислотой	концентрация уксусной кислоты после корректировки pH (мМ)	потеря IgG в фильтровальном слое (г $л^{-1}$ плазмы)	потеря IgG в супернатанте PptG (г $л^{-1}$ плазмы)	IgG потеря Σ (г $л^{-1}$ плазмы)	активность активатора прекалликреина (МЕ $мг^{-1}$)	фибриноген (мг $л^{-1}$ плазмы)	PL-1 (мкмоль $мл^{-1}$ $г^{-1}$)

3,8	75	0,00	0,42	0,42	214	173	3,9
4,2	25	0,01	0,19	0,20	170	134	3,2
4,6	10	0,01	0,09	0,10	38	193	1,4
5,0	5	0,09	0,04	0,13	6,4	114	0,4
3,8	75	0,00	0,53	0,53	193	355	3,8
4,2	25	0,00	0,28	0,28	171	346	3,2
4,6	10	0,01	0,14	0,15	131	340	1,5
5,0	5	0,16	0,05	0,21	5,3	189	<0,2

[0199] В соответствии с результатами, представленными в Примере 4, повышение pH буфера экстрагирования/растворения до 5,0 приводит к небольшому повышению потери IgG в фильтровальном осадке, тем не менее, эта потеря перекрывается более значительным снижением потери IgG в супернатанте Ppt G.

[0200] При сравнении результатов Примера 4 и Примера 5 видно, что обработка Аэросилом снижает количество остаточной активности активатора прекалликреина, обнаруживаемой в растворенной PptG фракции при экстракции пасты II+III при низких pH (3,8, 4,2 и 4,6), но не при pH 5,0 (Фигура 2). Напротив, обработка Аэросилом значительно снижает содержание фибриногена в растворенной фракции Ppt G при экстракции пасты II+III при высоких pH (Фигура 3; ср. pH 4,6 и 5,0 с pH 3,8 и 4,2). Обработка Аэросилом, судя по всему, не влияет на уровень остаточной амидолитической активности, обнаруживаемой в растворенной фракции Ppt G (Фигура 4). В частности, уровень всех трех примесей в растворенной фракции Ppt G существенно снижается при экстракции пасты II+III при pH 5,0 в сравнении с pH 3,8, 4,2 и 4,6.

Пример 6

[0201] Как следует из Примеров выше, потери IgG в фильтровальном слое и супернатантах Ppt G минимизированы, если пасту II+III экстрагируют при pH примерно 4,5-4,6. Однако, из предыдущих примеров также следовало, что уровни критически важных примесей, включая активность активатора прекалликреина, амидолитическая активность и содержание фибриногена, гораздо выше при экстракции пасты II+III при pH 4,5 или 4,6 в сравнении с экстракцией при pH около 4,9–5,0. Соответственно, настоящий пример был выполнен для того, чтобы определить, могут ли наблюдаемые при проведении экстракции пасты II+III при pH 4,5 большие уровни примесей быть сдвинуты повышением количества Аэросила, используемого для адсорбирования загрязнителей, но с поддержанием низких уровней потерь IgG в фильтровальном слое и супернатанте Ppt G.

[0202] По этому принципу экстракцию модифицированной пасты II+III проводили так, как указано ранее, при pH экстракционного буфера 4,5. Затем добавлялись увеличивающиеся количества Аэросила 380, вплоть до 200 мг на г пасты II+III, суспензию перемешивали один час. Далее образец обрабатывали так, как описано выше.

[0203] Как показано в Таблице 6, удаление и фибриногена, и активности активатора прекалликреина значительно улучшалось при осветлении большими количествами Аэросила. Потери IgG в фильтровальном осадке вследствие связывания с Аэросилом повышались при увеличении количеств Аэросила, хотя этот эффект был слегка компенсирован снижением потери IgG в супернатанте Ppt G. Однако, существенным образом амидолитическая активность не может быть снижена большими количествами Аэросила, если проводить экстракцию пасты II+III при pH 4,5. Помимо этого, хотя чистота γ-глобулинов повышается при использовании больших количеств Аэросила, во всех случаях она остается ниже предела в >86%, установленного спецификацией для Ppt G, вероятно, вследствие низкого pH экстракции и осветления.

Таблица 6.

В Таблице 6 представлены результаты изменения концентрации Аэросила, если экстракция и осветление проводятся при pH 4,5

				Осадок G			
количество Аэросила в мг на грамм II+III	потеря IgG в фильтровальном слое (г $л^{-1}$ плазмы)	потеря IgG в супернатанте PptG (г $л^{-1}$ плазмы)	IgG потеря Σ (г $л^{-1}$ плазмы)	активность активатора прекалликреина (МЕ $мг^{-1}$)	фибриноген (мг $л^{-1}$ плазмы)	PL-1 (мкмоль $мл^{-1}$ $г^{-1}$)	CAE (% гаммаглобулина)
0	0,01	0,21	0,22	177,1	272	5,4	69,1
40	0,13	0,50	0,63	9,3	173	1,8	76,8
100	0,11	0,30	0,41	0,1	76	6,1	79,4
200	0,25	0,08	0,33	ниже предела обнаружения	10	4,5	84,1

Пример 7

[0204] В настоящем примере продемонстрировано влияние pH экстракционного буфера на удаление примесей при ресуспендировании и осветлении пасты II+III.

[0205] Экстракция при низком pH модифицированной пасты II+III проводилась при pH 4,2 с соотношением 15 граммов буфера на грамм пасты II+III. Затем суспензию разделили на 3 части и pH довели до 4,5, 4,7 либо 5,0, соответственно, при помощи 3М Трис. После этого каждый раствор был далее разделен на две части, которые были инкубированы один час при либо 4°C, либо 25 °C. Фильтрование с Cuno 50(90)SA проводилось с использованием 10 мМ пост-промывочным буфером с натрия ацетатом, обладающим таким же pH, что и соответствующий буфер для осветления. Фильтраты были обработаны 8г $л^{-1}$ цитрата и 0,2% Твин 80, затем IgG был осажден добавлением 25% спирта при -10°C в течение по меньшей мере 8 часов. Осадок был выделен центрифугированием, как описано ранее, осадок был растворен в 2-кратном

объеме очищенной воды. Полученная суспензия была профильтрована на фильтре Cuno VR06 в итоговый раствор с проводимостью приблизительно 1,3 мС $см^{-1}$.

[0206] Для оценивания различных условий определялись уровни IgG, IgA, IgM, трансферрина, фибриногена и иных примесей. Результаты данного анализа приведены в Таблице 7, в которой показана pH-зависимость осветления суспензии пасты II+III. В пределах интервала pH 4,5–5,0 количества IgA, IgM, трансферрина и фибриногена не варьируются в широких пределах, но иные нежелательные белки присутствуют в более высоких количествах при использовании буферов с более низкими pH. Было подсчитано, что эти иные примеси включают 10% от общего количества белка при pH 4,5, но менее 1% при pH 5. Содержание IgG наиболее велико при pH 5,0, а температурная зависимость содержания IgG и уровней примесей между 4°C и 25°C незначительна.

Таблица 7.

В Таблице 7 сравнивается снижение количества примесей в II+III, растворенных в фильтрате VR06, при изменении pH и температуры в течение 1 часа инкубирования после ресуспендирования пасты II+III и последующей фильтрации следом за экстракцией при низком pH без добавок

pH инкубирования и обоих этапов фильтрования	Температура инкубирования и первого этапа фильтрования	этап	% белка:					
			IgG Нефелометрически	IgA ELISA	IgM ELISA	трансферрин ELISA	фибриноген ELISA	рассчитанные другие примеси
4,5	4°C	растворенный II+III	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Cuno 90-фильтрат	51,7	8,5	4,0	1,6	2,5	31,7
		растворенный Ppt G	64,4	8,3	4,4	0,1	2,8	20,0
		VR06-фильтрат	**71,8**	**9,5**	**5,1**	**0,1**	**3,0**	**10,6**
	25°C	растворенный II+III	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Cuno 90-фильтрат	52,3	8,0	4,2	1,6	2,6	31,3
		растворенный Ppt G	64,5	7,4	4,8	0,1	3,8	19,4
		VR06-фильтрат	**72,5**	**9,1**	**5,0**	**0,1**	**3,3**	**9,9**
4,7	4°C	растворенный II+III	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Cuno 50-фильтрат	49,4	8,2	3,7	1,6	2,5	34,6
		растворенный Ppt G	68,8	9,5	5,0	0,1	3,5	13,2
		VR06-фильтрат	**76,5**	**9,8**	**5,4**	**0,1**	**3,5**	**4,7**
	25°C	растворенный II+III	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3

		Cuno 50-фильтрат	49,6	8,6	3,7	1,5	3,1	33,6
		растворенный Ppt G	66,9	8,8	4,9	0,1	4,1	15,2
		VR06-фильтрат	**75,8**	**10,2**	**5,3**	**0,1**	**4,3**	**4,3**
5,0	4°C	растворенный II+III	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Cuno 50-фильтрат	52,5	9,3	3,4	1,7	2,1	31,0
		растворенный Ppt G	76,9	10,1	4,9	0,1	3,0	5,0
		VR06-фильтрат	**83,6**	**10,6**	**4,5**	**0,1**	**3,0**	**0,0**
	25°C	растворенный II+III	55,0	7,9	3,6	1,3	3,0	29,3
		Cuno 50-фильтрат	53,4	8,9	3,4	1,8	2,6	30,0
		растворенный Ppt G	76,6	10,3	4,8	0,1	3,9	4,3
		VR06-фильтрат	**79,9**	**10,9**	**4,7**	**0,1**	**3,6**	**0,8**

[0207] Как следует из Таблицы 8, дальнейший анализ растворенной фракции Ppt G и VR06-фильтрата показывает, что при использовании буферов с pH 4,5 для этапов осветления II+III и обработки фильтрата II+III происходит повышение уровня агрегатов и низкомолекулярных компонентов. Этот эффект усиливается при проведении этапов при 25°C в сравнении с 4°C. Напротив, если образцы обрабатываются при большем pH (pH 5,0), полученные суспензии Ppt G и фильтрат содержат большие уровни ~350 кДа материала (димерные IgG или IgA), чем растворы, обработанные при pH 4,5 (Таблица 8). Помимо этого, при обработке с меньшим pH наблюдалась большая амидолитическая активность в сравнении с обработкой при pH 5,0.

Таблица 8.

Влияние pH и температуры при инкубировании и фильтровании суспензии пасты II+III на активность активатора прекалликреина и амидолитическую активность растворенного Осадка G, и на распределение по размерам молекул в фильтрате VR06.

pH инкубирования и обоих этапов фильтрования	Температура инкубирования и первого этапа фильтрования	Растворенный Ppt G				VR06-фильтрат			
		активность активатора прекалликреина		амидолитическая активность (PL-1)		распределение по размерам молекул (%)			
pH	темп. °C	МЕ $мл^{-1}$	МЕ $г^{-1}$	нмоль $мл^{-1}.мин^{-1}$	нмоль $мин^{-1}.г^{-1}$	>450 кДа	~350 кДа	~160 кДа	<60 кДа
4,5	4	60,2	2028	171,8	5788	28,33	6,61	63,21	1,85
4,5	25	103,4	3569	239,4	8264	29,44	6,02	61,76	2,79

4,7	4	1343,2	38029	152,1	4306	23,71	8,82	65,82	1,64
4,7	25	2215,9	67702	180,2	5506	24,54	8,02	65,06	2,38
5,0	4	134,5	4009	67,6	2015	17,81	10,78	70,03	1,38
5,0	25	186,6	5738	87,3	2685	19,16	10,54	68,84	1,46

Пример 8

[0208] Результаты, представленные в Таблицах 7 и 8, показывают, что ресуспендирование осадка II+III должно проходить при пониженных температурах (2°C–8°C) и что pH должен поддерживаться при pH 5,0 для того, чтобы минимизировать растворение высоко- (>450 кДа) и низко- (>70 кДа) молекулярных компонентов, а также компонентов с амидолитической активностью. Эффективное осветление после суспендирования пасты II+III снизит нагрузку примесями для последующей хроматографической обработки Ppt G и, таким образом, является ключевым этапом для воспроизводимого соответствия IVIG спецификациям в конечных контейнерах. Для дальнейшего подтверждения этого открытия модифицированную пасту II+III растворяли и обрабатывали, как указано выше, модифицированную пасту II+III растворяли при pH 4,2 и затем довели до pH 4,5, 4,7 или 5,0. Как следует из Таблицы 9, IgM удаляется более эффективно при pH 5,0 во время суспендирования и осветления пасты II+III в сравнении с удалением при pH 4,5. В этом эксперименте выход IgG был одинаков при pH 5,0 и 4,5.

Таблица 9

Выход IgG, IgA, IgM, трансферрина и фибриногена на различных этапах ресуспендирования, фильтрования пасты II+III и осаждения Ppt G

			выход %					
pH инкубирования и обоих этапов фильтрования	Температура инкубирования и первого этапа фильтрования	этап	общее содержание белка	IgG неф./ ELISA[1]	IgA ELISA	I g M ELISA	трансферрин ELISA	фибриноген ELISA
4,5	4°C	растворенный II+III	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Cuno 50 фильтрат	100,2	92,9	100,2	97,8	118,7	86,3
		Cuno 90 фильтрат	97,0	91,1	105,3	108,6	123,2	80,1
		Ppt G супернатант	33,5	4,4	-	-	-	-
		растворенный Ppt G	71,7	83,9	75,6	89,6	5,0	66,5
		VR06 фильтрат	**65,3**	**85,2**	**78,8**	**93,1**	**5,2**	**64,8**
	25°C	растворенный II+III	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Cuno 50 фильтрат	101,0	92,3	100,9	104,4	113,2	96,7
		Cuno 90 фильтрат	97,2	92,4	98,9	113,4	123,9	84,6
		Ppt G супернатант	33,8	5,1	-	-	-	-
		растворенный Ppt G	72,9	85,5	68,8	97,5	4,7	89,9
		VR06 фильтрат	**68,3**	**90,0**	**78,9**	**95,9**	**5,5**	**75,0**
4,7	4°C	растворенный II+III	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Cuno 50 фильтрат	93,5	83,9	98,0	98,0	115,9	75,3

		Ppt G супернатант	27,5	2,7	-	-	-	-
		растворенный Ppt G	64,8	81,1	78,2	90,2	4,5	73,9
		VR06 фильтрат	**60,5**	**84,1**	**75,0**	**92,1**	**5,1**	**70,2**
	25°C	растворенный II+III	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Cuno 50 фильтрат	94,7	85,3	103,1	98,5	113,8	95,8
		Ppt G супернатант	28,5	4,1	-	-	-	-
		растворенный Ppt G	65,3	79,5	73,1	90,9	5,0	87,0
		VR06 фильтрат	61,9	85,3	80,7	93,0	5,3	86,9
5,0	4°C	растворенный II+III	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Cuno 50 фильтрат	86,1	82,3	101,5	81,5	117,5	59,8
		Ppt G супернатант	26,0	4,1	-	-	-	-
		растворенный Ppt G	58,1	81,2	74,8	79,3	4,5	57,0
		VR06 фильтрат	**54,0**	**82,1**	**72,5**	**67,8**	**4,7**	**52,5**
	25°C	растворенный II+III	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
		Cuno 50 фильтрат	88,0	85,4	99,7	83,2	124,1	75,4
		Ppt G супернатант	23,4	1,5	-	-	-	-
		растворенный Ppt G	60,5	84,2	79,0	81,6	4,5	78,2
		VR06 фильтрат	**59,0**	**85,7**	**82,0**	**77,6**	**4,5**	**69,0**

Пример 9

[0209] Чтобы оценить оптимум pH для этапа экстракции II+III, для минимальной протеолитической активности фильтрата, pH во время экстракции и фильтрования варьировался в более широком интервале pH 3,8–7,8. Для этой цели модифицированную пасту II+III экстрагировали при низком pH в соотношении 1+8. После непродолжительного перемешивания для получения гомогенной дисперсии суспензию разделяли на 8 частей, pH довели уксусной кислотой или буфером Трис до pH 3,8, 4,2, 4,6, 5,0, 6,6, 7,0, 7,4 или 7,8 и экстрагировали в течение дополнительных 120 минут. После этого pH довели до 5,1 и осветляли центрифугированием в пробирках falcon на 50 мл. Осаждение Ppt G проводилось в стандартных условиях. Амидолитическая активность и активность активатора прекалликреина измерялись в растворенной фракции Ppt G так, как показано на Фигурах 5 и 6.

[0210] Как может быть замечено на Фигуре 5, для образца, хранившегося при 4°C, амидолитическая активность минимальна, если экстракция пасты II+III проводится при pH 5,0. Далее амидолитическая активность поднималась после хранения растворенной фракции Ppt G при комнатной температуре в течение одной недели, что подчеркивает мысль о том, что образцы не должны храниться при повышенной (комнатной температуре) длительное время. Аналогично, как показано на Фигуре 6, активность активатора прекалликреина минимальна, если экстракция пасты II+III проводится при pH 5,0 или выше.

Пример 10

[0211] В настоящем примере оценивается влияние pH на потерю выхода IgG во время экстракции и осветления. Вкратце, 110 граммов модифицированной пасты II+III были ресуспендированы в соотношении 15 граммов очищенной воды на грамм пасты II+III, после чего

проводилась экстракция в течение 120 минут. Затем образец был разделен на четыре части и pH довели уксусной кислотой до pH 3,8, 4,2, 4,6 либо 5,0. Предварительная экстракция была осуществлена перед разделением на четыре части при собственном pH, чтобы обеспечить четыре одинаковые части, которые затем доводились до указанных pH и далее экстрагировались в течение одного дополнительного часа. Затем образцы были осветлены фильтрованием Cuno 50SA при том же pH, что использовался для экстракции и осаждения Ppt G. После фильтрования Cuno все части были обработаны одинаково, что обозначает стандартное осаждение осадка G при pH 7,0 для всех частей. Результаты двух таких экспериментов представлены ниже в Таблицах 10 и 11.

Таблица 10.

Извлечение белка и IgG в фильтратах, а также результаты MSD и CAE для повторно растворенного Осадка G

			38/1				41			
		pH экстракции и осветления	3,8	4,2	4,6	5,0	3,8	4,2	4,6	5,0
		концентрация уксусной кислоты после корректировки pH	75	25	10	5	75	25	10	5
	фильтрат	извлечение белка (%)	100,3	99,6	92,8	76,0	106,4	107,5	99,7	81,0
		извлечение IgG (%)	87,6	89,8	90,3	86,0	96,2	97,3	95,1	88,3
Осадок G	MSD (% площади)	>450 кДа	19,2	20,5	14,8	13,2	22,5	22,8	20,7	16,8
		~350 кДа	8,7	7,6	10,5	11,7	5,2	5,0	7,7	9,4
		~160 кДа	69,5	69,2	72,9	74,2	66,0	65,6	67,5	72,0
		<70 кДа	2,7	2,7	1,8	1,0	6,2	5,6	4,1	1,9
	CAE (% гаммаглобулина)		67,4	68,3	78,1	86,7	68,3	69,8	77,5	85,1

Таблица 11.

Потеря IgG во время экстракции и осветления, а также протеолитическая активность и фибриноген в повторно растворенном Осадке G

					Осадок G		
pH экстракции и осветления с уксусной кислотой	концентрация уксусной кислоты после корректировки pH (мМ)	потеря IgG в фильтровальном слое (г $л^{-1}$ плазмы)	потеря IgG в супернатанте PptG (г $л^{-1}$ плазмы)	IgG потеря Σ (г $л^{-1}$ плазмы)	активность активатора прекалликреина (МЕ $мг^{-1}$)	фибриноген (мг $л^{-1}$ плазмы)	PL-1 (мкмоль $мл^{-1}$ $г^{-1}$)
3,8	75	0,00	0,42	0,42	214	173	3,9
4,2	25	0,01	0,19	0,20	170	134	3,2
4,6	10	0,01	0,09	0,10	38	193	1,4
5,0	5	0,09	0,04	0,13	6,4	114	0,4
3,8	75	0,00	0,53	0,53	193	355	3,8
4,2	25	0,00	0,28	0,28	171	346	3,2
4,6	10	0,01	0,14	0,15	131	340	1,5
5,0	5	0,16	0,05	0,21	5,3	189	0,2

[0212] Данные выше подтверждают результаты, показанные на Фигурах 5 и 6, касательно активации протеолитических ферментов при экстракции при низком pH. При совместном рассмотрении данные свидетельствуют о том, что экстракция при низком pH обеспечивает меньшую потерю IgG вследствие повышения растворимости всех белков. Эти результаты согласуются с примерами, представленными выше. Помимо этого, исходя из потерь IgG согласно Таблице 11, можно предположить, что большие концентрации уксусной кислоты, обеспечивая меньший pH, приводят к меньшей потере IgG в фильтровальном слое, но к большей потере IgG в супернатанте Осадка G. Это явление может быть объяснено большими концентрациями ацетата на этапе осаждения после экстракции при низком pH.

Пример 11

Чтобы определить пригодные условия экстракции II+III, сравнивался протокол экстракции при низком pH очищенной водой, доведенной уксусной кислотой до pH 4,3 с повторным доведением до pH 4,9 перед фильтрованием, с экстракцией в буфере 5мМ натрия ацетата/5 мМ натрия дигидрофосфата с 600 г уксусной кислоты на 1000 литров экстракционного буфера, дающий pH растворения 4,8–4,9. Эксперименты проводились для лабораторного масштаба, исходя из 3,8–5 кг модифицированной пасты II+III. Все эксперименты включали обработку Аэросилом в количестве 40 г Аэросила на кг пасты II+III. Для осветления использовался фильтр-пресс Strassburger с фильтровальной рамой 30см×30см, в которую были установлены листы фильтра Cuno 50SA. Пост-промывку осуществляли 4 мертвыми объемами фильтр-пресса буфером 5мМ натрия ацетата/5мМ натрия дигидрофосфата со 150 граммами уксусной кислоты на 1000 литров буфера. Центрифугирование осадка G проводилось на центрифуге Cepa® Z61H при 17000 оборотов/мин. (диаметр ротора 10,5 см) на скорости потока 40 литров в час. Результаты эксперимента, выполненного в трех повторностях, показаны ниже в Таблице 12.

Таблица 12.

Сравнение экстракции при низком pH 4,3 и сдвиге pH до 4,9 перед обработкой Аэросилом с экстракцией в улучшенных условиях GAMMAGARD® LIQUID с 600 г ледяной уксусной кислоты на 1000 л экстракционного буфера

эксперимент	единицы	P00809NG2	P00909NG2	P01509NG2	P02209NG2	P02509NG2	P02609NG2
способ		экстракция при низком pH			600г HAc на 1000л экстракционного буфера		
II+III-паста	№ партии	VNEGJ039	VNGBJ022	VNGBJ216	VNGBJ216	VNGBJ022	VNEGJ039
	кг	5,00	5,00	4,97	4,96	4,96	3,86
PEQ	л	106,65	118,70	123,32	123,31	117,65	82,35
II+III-экстракт							
белок	г	1316	1310	1364	1336	1347	1022
выход белка (БИУРЕТ)	г $л^{-1}$	12,3	11,0	11,1	10,8	11,5	12,4
выход IgG (ELISA)	г $л^{-1}$	6,09	5,89	6,25	5,50	6,06	6,38
выход IgA (ELISA)	г $л^{-1}$	1,06	0,96	0,98	1,00	1,01	1,10
выход IgM (ELISA)	г $л^{-1}$	0,40	0,40	0,47	0,40	0,43	0,48
Фильтрат							
белок	г	957	1007	1038	955	926	731
выход белка (БИУРЕТ)	г $л^{-1}$	9,0	8,5	8,4	7,7	11,5	12,4
выход IgG (ELISA)	г $л^{-1}$	5,7	5,62	5,45	5,02	6,06	6,38
выход IgA (ELISA)	г $л^{-1}$	1,03	0,88	0,96	0,90	1,01	1,10
выход IgM (ELISA)	г $л^{-1}$	0,32	0,39	0,37	0,27	0,43	0,48
экстракт фильтровального слоя							
выход IgG (ELISA)	г $л^{-1}$	-	-	-	0,07	0,07	0,07
Ppt G-супернатант							
белок	г	196	130	188	187	168	109
выход белка (БИУРЕТ)	г $л^{-1}$	1,8	1,1	1,5	1,5	1,4	1,3
выход IgG (ELISA)	г $л^{-1}$	0,05	0,02	0,03	0,05	0,03	0,04

[0213] Как показано в Таблице 12, оба протокола экстракции обеспечивают схожее извлечение IgG. Принимая во внимание результаты Примеров 3–10, в которых показано, что содержание различных примесей может быть минимизировано экстракцией пасты II+III при pH 5,0, результаты, представленные в Таблице 12, показывают, что экстракция при pH 4,8–4,9 с 600г ледяной уксусной кислоты на 1000 л экстракционного буфера превосходит экстракцию при низком pH с последующим доведением до pH 4,8–5,0.

Пример 12

[0214] При производстве рамы фильтр-пресса и линии, соединяющиеся с баками, обладают значительным пустотным объемом, который заполнен суспензией или фильтратом перед началом пост-промывки. По завершении пост-промывки этот пустотный объем остается в фильтр-прессе. Стандартные протоколы учитывают этот пустотный объем промыванием одним-двумя мертвыми объемами фильтр-пресса. Чтобы определить, позволяют ли стандартные послефильтрационные

промывки эффективно извлечь весь IgG, проводились эксперименты с использованием различных объемов промывки для крупномасштабной производственной очистки IgG. На Фигуре 1 показана зависимость пост-промывочных объемов (измеренных в мертвых или пустотных объемах) на уровни остаточного IgG и общего содержания белка.

[0215] В частности, как показано на Фигуре 1, пост-фильтрационная промывка с использованием приблизительно 2-кратного мертвого объема фильтр-пресса приводит к существенной потере извлечения IgG, поскольку промывочный раствор содержит приблизительно 1,5 грамма IgG на литр промывочного раствора. Неожиданным было то, что 3,6-кратного мертвого объема фильтр-пресса пост-промывочного буфера достаточно для эффективного извлечения IgG (отмечено стрелкой на Фигуре 1). Последующая пост-промывка, превышающая 3,6 мертвых объемов фильтр-пресса, не требуется, поскольку она приводит к разбавлению фильтрата, не обеспечивая дополнительного извлечения IgG.

Пример 13

[0216] В течение этапа осаждения II+III концентрацию спирта поднимали от 20 до 25%, а температуру снижали от -5°C до -7°C. При растворении пасты II+III по меньшей мере 600 мл ледяной уксусной кислоты использовалось на объем 1000 л ресуспензионного буфера для корректировки pH пасты II+III, в отличие от использовавшегося ранее соотношения в 510 мл ледяной уксусной кислоты/1000 л буфера. Соотношение экстракции составляло 1+15 с уксуснокислым буфером. Для осветления добавляли 0,04–0,06 грамма Аэросила (обычно ближе к нижней границе этого интервала, *например,* 0,04 г) на каждый грамм пасты II+III. Для пост-промывки использовали приблизительно четыре (4x) мертвых объема фильтр-пресса пост-промывочного буфера. К примеру, в одном конкретном эксперименте использовали 4,3x мертвых объема фильтр-пресса, а в другом эксперименте — 3,6x объема. Объем был увеличен до четырехкратного и более мертвых объемов с использовавшегося ранее 1,8x мертвого объема. Буфер был подкорректирован 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, то есть количество увеличено с использовавшихся ранее 120 мл/1000 л буфера. Эти изменения обеспечивают на 8% больший выход IgG и чистоту по меньшей мере 86% γ-глобулинов. В экстракте фильтровального слоя обнаруживалось очень низкое остаточное количество IgG при экстракции 0,1 М натрия фосфатом +150 мМ NaCl (pH 7,4, проводимость 25,5 мС/см).

Пример 14

А. Оптимизация фракционирования I: добавление этанола распылением против добавления вливанием; корректировка pH до pH 7,0 или 7,5 после добавления этанола

[0217] В Таблице 13 показан выход IgG способами, используемыми в производстве в настоящее время, и представлено сравнение экспериментов, описанных ниже. 15-20% IgG

утрачивается из пула Cohn в фильтрат. Приблизительно 0,4 г IgG на литр плазмы утрачивается в супернатанте II+III.

Таблица 13

	Выход IgG (2009)					
	г/ л плазмы			% пула Cohn		
Фракция	LA B1 (исходная)	Vienna (исходная)	LA B5 (восст.)	L.A. (исходная)	Vienna (исходная)	L.A. (Восст.)
Пул Cohn	6,18 (5,28-7,02)	6,26 (5,43-6,68)	7,49* (6,41-8,41)	100	100	100
II+III Супернатант	0,41 (0,23-0,63)	0,39 (0,33-0,47)	0,37 (0,23-0,48)	6,6	6,2	4,9
II+III осадок (рассчитанный)	5,77	5,87	7,12	93,4	93,8	95,1
II+III фильтрат	4,93 (4,21-5,57)	5,19 (4,11-5,48)	6,43 (6,11-7,02)	80	83	86

* LA B5 пул Cohn восстановленной плазмы: меньшая концентрация IgG вследствие вытеснения солевым раствором. Среднее количество восстановленной плазмы LA B1 в пуле Cohn: 8,52 г/л.

Способ

[0218] Пул Cohn оттаивали при 24-27°C в течение 6-7 часов в 14-литровом ведре. Затем материал перемешивали в течение ночи при 2-8°C. Затем пул разделяли на четыре части (800 г каждая):

1. Струйное добавление этанола с последующим доведением pH до 7,0;
2. Струйное добавление этанола с последующим доведением pH до 7,5;
3. Добавление этанола распылением с последующим доведением pH до 7,0;
4. Добавление этанола распылением с последующим доведением pH до 7,5.

[0219] Вначале все части были охлаждены до 0°C. Затем к частям 1 и 2 добавляли струйно 8% этанол, а в части 3 и 4 — распылением через распылитель. В обоих способах этанол добавлялся с приблизительно одинаковой скоростью. При добавлении этанола криостат был скорректирован до -5°C, к каждой части добавляли 75 мл этанола при перемешивании. pH доводили либо до 7,0, либо до 7,5 1M уксусной кислотой. Затем раствор инкубировали в течение 1 часа. После инкубирования раствор центрифугировали в стаканной центрифуге (4600 оборотов/мин.; 30 мин.; -2°C).

Результаты

[0220] Выходы IgG измерялись нефелометрически и показаны в Таблице 14. Почти 100%-й выход IgG при фракционировании I супернатанта был получен усовершенствованным способом

(распыление этанола), а при обычном добавлении этанола 0,2–0,25 г/л плазмы было потеряно. Эти результаты показывают, что усовершенствованный способ может привести к повышению выхода IgG на 0,2 г/л плазмы при производстве.

Таблица 14.

Образец	**Вес (г)**	IgG неф (среднее из 3)				
		мг/мл	г	%	Чистота (%)	г/л плазмы
Криосупернатантная плазма	**800**	**5,72**	**4,57**	**100,00**	**12,2**	**5,72**
Супернатант 1	856	5,10	4,37	95,57	12,6	5,46
Супернатант 2	853	5,16	4,41	96,36	12,7	5,51
Супернатант 3	853	5,36	4,58	100,14	13,1	5,72
Супернатант 4	848	5,33	4,52	98,90	13,0	5,65

<u>B. Лабораторный Масштаб: Фракционирование I (распыление v. струйное введение; доведение pH до 7,4 после добавления этанола) и Фракционирование II+III (доведение pH до 6,7 перед добавлением этанола, повторное доведение до 6,9 после добавления этанола)</u>

Пример 15

Способ

[0221] 2,8 кг плазмы были оттаяны при перемешивании при 2°C. **Фракция I:** было добавлено 8% этанола, pH доводили до 7,4 при помощи 5M уксусной кислоты. При перемешивании суспензию охлаждали до температуры -2°C. Условия распыления обеспечивались распылителем. По обоим способам этанол и 5M уксусная кислота добавлялись с приблизительно одинаковой скоростью. После 1 часа инкубирования раствор центрифугировали в центрифуге CEPA при температуре -4°C.

[0222] **Фракция II+III:** pH доводили до 6,7 с буфером при pH 4, затем добавляли 25% этанол (1) распылением или (2) вливанием, как обычно. Затем pH доводили до 6,9. Инкубирование проводили в течение 10 часов при -7°C.

Результаты

[0223] Потеря IgG при фракционировании II+III 25%-м этанолом измерялась нефелометрически и показана в Таблице 15. Измерения IgG обладают определенным разбросом, поэтому была взята средняя величина по оптимизированному способу.

Таблица 15

	Потеря IgG Фракция I:	Супернатант Фракции II+III, добавление 25% этанола	IgG в Фильтрате
Эксперимент	г на литр плазмы	г на литр плазмы	% пула Cohn
NG2C73	0,47	0,08	85,28
NG2C73-1	0,34	0,03	92,27
NG2C73-2	0,05	0,06	95,94
Среднее	**0,29**	**0,06**	**91,16**
Референтное (струйное добавление этанола)	0,29	0,10	87,38

[0224] До момента осаждения фракции II+III было потеряно только 0,35 г IgG/л плазмы. При использовании способа с распылением было достигнуто повышение выхода на 0,04 г IgG на литр плазмы во время фракционирования II+III в сравнении со струйным добавлением этанола 25%; и повышение выхода на 0,3 г IgG на литр плазмы (среднее от интервала от 0,4 до 0,06 г/л) в сравнении со струйным добавлением 20% этанола, которое в настоящее используется в производстве. Выход IgG в фильтрате существенно выше в сравнении с референтным и гораздо выше 80–86%, которые достигаются при производстве в настоящее время струйным добавлением 20% этанола на осаждении II+III.

С. Фракционирование II+III (20% этанол): поддержание начального pH в течение всего фракционирования II+III

Пример 16

Способ

[0225] 50 литров плазмы были оттаяны при перемешивании при 17-20°C в течение 27 часов. Фракционирование I проводилось так, как описано в разделах выше, по оптимизированному процессу. Супернатант I был разделен на две части:

(1) наихудший случай корректировки pH: корректировка pH до и после добавления этанола, но не во время инкубационного периода.

(2) оптимизированная корректировка pH: корректировка pH до и после добавления этанола, дополнительная корректировка pH во время выдержки. Во время выдержки раствор постоянно перемешивали.

[0226] pH супернатанта по I доводили в обеих частях до 6,7 перед добавлением этанола с использованием буфера с pH 4. Затем добавляли распылением этанол, pH доводили до 6,9 после добавления этанола.

[0227] В части (1) корректировку pH проводили менее аккуратно для имитации сценария наихудшего случая. pH раствора корректировали сразу после добавления этанола, но не во время

инкубирования. В части (2) pH корректировали повторно до постоянной величины 6,8–7,0 в течение инкубационного периода продолжительностью 10 часов.

Результаты

[0228] Уровень IgG был повторно измерен нефелометрически и показан в Таблице 16. При постоянной повторной корректировке pH до постоянной величины в 6,9 в течение выдержки утрачивалось только 0,13 г IgG на литр плазмы в сравнении со средней величиной 0,4 г/л плазмы при крупномасштабном производстве. В сравнении с референтным способом (без распыления, но с постоянным перемешиванием в течение выдерживания) было достигнуто повышение выхода на 0,07 г IgG на литр плазмы. Достигалось повышение выхода на приблизительно 0,20 г — 0,30 г IgG на литр плазмы в сравнении с обычным способом, применяемым в настоящее время (потеря 0,38 г IgG на литр плазмы, *см.* Таблицу 13).

Таблица 16.

		Объем	IgG, нефелометрическое измерение	
	Образец	кг	Выход %	г/л плазмы
Пул	Плазма	45,20	100,00	4,90
Фракция I	Супернатант I	68,66	102,61	5,03
Оптимизированная корректировка pH	Супернатант II+III	53,09	0,26	0,13
Референтная	Супернатант II+III	52,69	0,41	0,20

Вывод

[0229] Потеря IgG в супернатанте II+III снижена от настоящего уровня 0,4 г IgG/л плазмы в производственных сериях до уровня 0,13 г/л плазмы при осаждении 20% этанолом, и до уровня ниже чем 0,08 г/л плазмы при осаждении 25% этанолом, если этанол добавляется распылением и pH в 6,9±0,1 длительно поддерживается при осаждении.

[0230] При осаждении I добавление этанола перед корректировкой pH распылением обеспечивает повышение выхода IgG на 0,1–0,2 г/л плазмы в супернатанте фракционирования I.

Обсуждение

[0231] IgG измерялся нефелометрически во всех экспериментах и может иметь разброс по меньшей мере -/+ 5,0% (как указано производителем нефелометра, Siemens AG). Таким образом, возможно, что фактическое повышение выхода, обеспечиваемое усовершенствованным способом при производстве, может быть слегка выше или ниже, чем показано в примерах.

[0232] В качестве дополнительного доказательства повышения выхода по новому и усовершенствованному способу вес осадка IgG сравнивался со средним весом осадка IgG, полученного из аналогичного источника плазмы при производстве. По способу, применяемому в настоящее время при производстве, было получено 18 кг осадка IgG из 1000 литров пула Cohn

происхождением из US, а в исследовании лабораторного масштаба (раздел B выше) было получено 20,8 кг осадка IgG (20% этанола и оптимизированная корректировка pH при фракционировании II+III, все процедуры добавления буфера и этанола осуществлялись распылением). Это составило увеличение в более чем на 2 кг осадка IgG на 1000 литров пула Cohn.

Пример 17

[0233] В этом примере показано, что добавление этапа обработки высокодисперсным кремнеземом перед фильтрованием суспензии Фракции II+III обеспечивает большую чистоту фильтратов IgG. Вкратце, криосупернатантную плазму фракционировали так, как описано выше на этапе Фракции II+III, в этот момент ее разделяли на два образца. Первый образец осветляли только добавлением порошка для фильтрования перед стандартным фильтрованием суспензии Фракции II+III (Фигура 7A), второй образец подвергали предварительной обработке высокодисперсным кремнеземом, как описано здесь, перед добавлением порошка для фильтрования и стандартным фильтрованием суспензии Фракции II+III (Фигура 7B).

[0234] Белковые компоненты фильтратов затем разделялись электрофорезом на ацетате целлюлозы, площади отдельных пиков рассчитывались стандартными способами. Как следует из хроматограмм и количественных данных, второй образец, который был обработан высокодисперсным кремнеземом перед фильтрованием, дал фильтрат с гораздо большей чистотой IgG в сравнении с образцом, необработанным высокодисперсным кремнеземом (68,8% vs. 55,7 γ-глобулина; для сравнения Таблица 18 и Таблица 16).

Таблица 17. Количественное определение пиков белков, разделенных электрофорезом на ацетате целлюлозы в суспензии Фракции II+III, осветленной только добавлением порошка для осаждения перед фильтрованием, как показано на Фигуре 7A.

номер пика слева направо	площадь, %	фракция
1	55,7	γ-глобулин
2	3,2	денатурированный белок
3	3,7	γ-глобулин
4	25,5	α/β-глобулин
5	11,9	альбумин

Таблица 18. Количественное определение пиков белков, разделенных электрофорезом на ацетате целлюлозы в суспензии Фракции II+III, предварительно обработанной высокодисперсным

кремнеземом и осветленной добавлением порошка для осаждения перед фильтрованием, как показано на Фигуре 7B.

номер пика слева направо	площадь, %	фракция
1	68,8	γ-глобулин
2	18,9	α/β-глобулин
3	12,3	альбумин

Пример 18

[0235] В данном примере проиллюстрированы ультрафильтрация и составление 20% IgG-препарата, пригодного для подкожного введения. Эта информация была собрана при производстве 20% доклинических IgG-препаратов в производственном масштабе. Процесс, используемый для производства 20% партий до этапа нанофильтрации, был таким, как описано выше. Ультра-/диафильтрация были введены в качестве усовершенствования для концентрирования раствора до 20%. Чтобы снизить потерю выхода до минимума, смыв прибора для ультрафильтрации, используемый для диафильтрации, концентрировался вторым меньшим устройством, оборудованным мембранами такого же типа и затем добавлялся к нефасованному раствору.

[0236] Неожиданным было то, что на инактивацию вирусов во время хранения при низком pH концентрация белка в растворе не влияла. Аналогичное понижение уровня вирусов достигалось и в растворе 10% (GAMMAGARD® LIQUID), и в растворе 20%. Поэтому хранение при низком pH в качестве этапа снижения уровня вирусов выполнялось для 20% продукта.

[0237] Перед нанофильтрацией концентрацию глицина в растворе IgG доводили до целевой концентрации в 0,25M. Затем раствор концентрировали до концентрации белка в 6±2% в./об. посредством ультрафильтрации (UF). pH доводили до 5,2±0,2. Использовавшаяся UF-мембрана имела Номинальный Молекулярный Вес Отсечения (NMWCO) 50000 Дальтон или ниже и была специально разработана для высоковязких продуктов *(например,* V screen от Millipore).

[0238] Затем концентрат был диафильтрован против 0,25M раствора глицина, pH 4,2±0,2. Минимальный объем обмена в 10 раз больше исходного объема концентрата. В течение операции ультрафильтрации/диафильтрации раствор поддерживался при приблизительно 4°C–20°C.

[0239] После диафильтрации раствор концентрировали до концентрации белка по меньшей мере 22% (в./об.). Температуру раствора доводили до 2°C–8°C.

[0240] Чтобы полностью извлечь белок, остающийся в системе, первая большая система промывается по меньшей мере 2 мертвыми объемами в рециркуляционном режиме для того, чтобы удостовериться в полном смывании белка. Затем смыв первой системы ультрафильтрации концентрируется до содержания белка по меньшей мере 22% в./об. во второй системе ультра-/диафильтрации, оснащенной таким же типом мембраны, но имеющей размеры в десять раз и меньше, чем первая. Концентрат смыва добавляется к нефасованному раствору. Затем промывается вторая система ультрафильтрации. Полученный смыв используется для корректировки содержания белка в конечном составе. Температуру раствора поддерживают при приблизительно 2°C–8°C.

[0241] Чтобы составить конечный раствор, концентрацию белка доводят до приблизительно 20,4±0,4% (в./об.) смывом второй меньшей системы ультрафильтрации и/или буфером для диафильтрации. При необходимости pH доводитсядо приблизительно 4,4–4,9.

Пример 19

[0242] Чтобы сравнить фракции IgG, извлеченные из фильтрата Фракции II+III по текущему производственному процессу GAMMAGARD® LIQUID, было проведено пять очисток IgG производственного масштаба с использованием усовершенствованных способов осаждения и растворения Фракции II+III, предложенных здесь. Вкратце, осаждение IgG пулов Cohn с исходной концентрацией IgG приблизительно в 6,14 г/л проводилось при -7°C 25%-м этанолом, который вводился струйно, в сравнении с -5°C и 20%-м этанолом согласно настоящему производственному процессу. Осадок модифицированной Фракции II+III затем экстрагировали в соотношении 1 к 15 с буфером для растворения, имеющим pH 4,3 или подкорректированным 0,06% ледяной уксусной кислотой, затем фильтровали через глубинный фильтр с конечной промывкой 4,3 мертвыми объемами фильтра буфера для растворения. Как показано в Таблице 18, фильтрат модифицированной Фракции II+III, полученный по усовершенствованным способам, предложенным здесь, содержал значительно большее процентное количество (по меньшей мере на 8,0% больше) IgG, присутствующего в исходном пуле Cohn, в сравнении с фильтратом Фракции II+III, полученным согласно используемому в настоящее время производственному процессу (91,1% и 91,6% vs. 83,1% и 83,8%, соответственно).

Таблица 18. Среднее извлечение IgG в фильтрате Фракции II+III всех производственных прогонов, проведенных Vienna в течение 2008 и части 2009, в сравнении с извлечением IgG в партиях, произведенных согласно усовершенствованным способам, предложенным здесь.

Процесс	Производство Vienna		R&D в промышленном масштабе**	
	действующее	2008		
IgG в пуле Cohn (г/л)	6,26	6,31	6,14	6,13

Спирт на осаждении II+III (%)	20	20	25	25
мл уксусной кислоты / 1000 л буфера для растворения	510	510	Растворение при pH **4,3;** сдвиг к **4,9** перед фильтрацией	600
Аэросил (г/г пасты)	0,045	0,04	0,04	0,04
Пост-промывка, мертвых объемов фильтр-пресса	1,8	1,8	4,3	4,3
Среднее количество IgG в фильтрате (% пула Cohn)	83,1% 57 партий	83,8% 200 партий	91,1% 3 партии	91,6% 2 партии
Дополнительный IgG в фильтрате	не применимо	не применимо	+ 8,0%	+ 8,5%

Пример 20

[0243] Чтобы определить чистоту IgG-композиций, предложенных здесь, были получены три партии IgG согласно улучшенным способам, предложенным здесь. Итоговые IgG-продукты этих очисток затем были проанализированы на несколько примесей, включая IgA, IgM, амидолитическую активность, C3 и фибриноген, также определялось процентное количество мономеров/димеров IgG в итоговой композиции. Как следует из Таблицы 19 ниже, улучшенные способы производства, предложенные здесь, обеспечивают в финальных нефасованных композициях повышенное извлечение IgG, 73,6%–78,5% от исходного материала в сравнении с 60%–70% для используемых в настоящее время способов, обеспечивая при этом такие же, если не лучшие, профили очистки, что установлены действующими стандартами производства IgG.

Таблица 19. Уровни примесей и содержание мономеров/димеров IgG в IgG-композиции, полученной согласно усовершенствованным производственным способам, предложенным здесь.

Пункт	**1**	**3**	**6**
№ эксперимента (P0..10NG2)	19	20	21
Выход белка в элюате анионообменной колонки [г/л плазмы]	**4,35**	**4,35**	**4,38**
извлечение IgG: из исходного материала по Cohn в нефасованный [%]	73,6	78,5	78,5
Определение параметров итогового нефасованного материала			
IgA [мкг/мл @ 10% белка]	29	26	в ожидании
IgM [мкг/мл @ 10% белка]	1,1	1,1	в ожидании
Амидолитическая активность [PL-1 нмоль/мл мин.]	в ожидании	<10	<10
MSD мономеры/димеры [%]	99,7	99,9	99,7
C3 [мкг/мл @ 10% белка]	в ожидании	в ожидании	в ожидании
Фибриноген [мкг/мл @ 10% белка]	<0,2	в ожидании	в ожидании

[0001] Следует понимать, что примеры и варианты воплощения, описанные здесь, предназначены лишь для иллюстративных целей и что различные модификации на их основе могут быть предложены специалистам в данной области техники, и включены в дух и область действия заявки, и охват прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые здесь, включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ

1. Способ получения из плазмы обогащенной IgG-композиции, содержащий стадии:

а. осаждение криосупернатантной плазменной фракции приблизительно 6%–10% спиртом при pH приблизительно 7,0–7,5 с получением первого осадка и первого супернатанта, обогащенного IgG;

б. осаждение IgG из первого супернатанта приблизительно 23%–27% спиртом при температуре приблизительно -5°C - -9°C и при pH приблизительно 6,7–7,1 с получением второго осадка;

в. ресуспендирование второго осадка экстракционным буфером с получением суспензии, где pH экстракционного буфера составляет приблизительно 4,5-5,0;

г. обработка суспензии тонко измельченным диоксидом кремния (SiO_2); и

д. отделение растворимой фракции от суспензии, обработанной тонко измельченным диоксидом кремния, с получением обогащенной IgG-композиции.

2. Способ по п. 1, где IgG осаждают из первого супернатанта на стадии (б) приблизительно 24-26% спиртом.

3. Способ по п. 1, где IgG осажден из первого супернатанта на стадии (б) приблизительно 25% спирта.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где IgG осаждают из первого супернатанта на стадии (б) при температуре приблизительно -7°C - -9°C.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где IgG осаждают из первого супернатанта на стадии (б) при температуре приблизительно -7°C.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где IgG осаждают из первого супернатанта на стадии (б) при pH приблизительно 6,9.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где второй осадок ресуспендируют на стадии (в) экстракционным буфером в соотношении 1 часть осадка на приблизительно 15 частей экстракционного буфера.

8. Способ по любому из пп. 1-7, где второй осадок ресуспендируют на стадии (в) экстракционным буфером, содержащим 5 мМ одноосновного фосфата натрия и 5 мМ ацетата и имеющим pH приблизительно 4,5±0,2.

9. Способ по п. 8, где pH экстракционного буфера доводят 510-600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера.

10. Способ по любому из пп. 1-9, где обработка суспензии тонко измельченным диоксидом кремния (SiO_2) на стадии (г) включает добавление приблизительно 0,01-0,07 г высокодисперсного кремнезема на г осадка, полученного на стадии (б).

11. Способ по п. 10, где обработка суспензии тонко измельченным диоксидом кремния (SiO_2) на стадии (г) включает добавление приблизительно 0,03-0,05 г высокодисперсного кремнезема на г осадка, полученного на стадии (б).

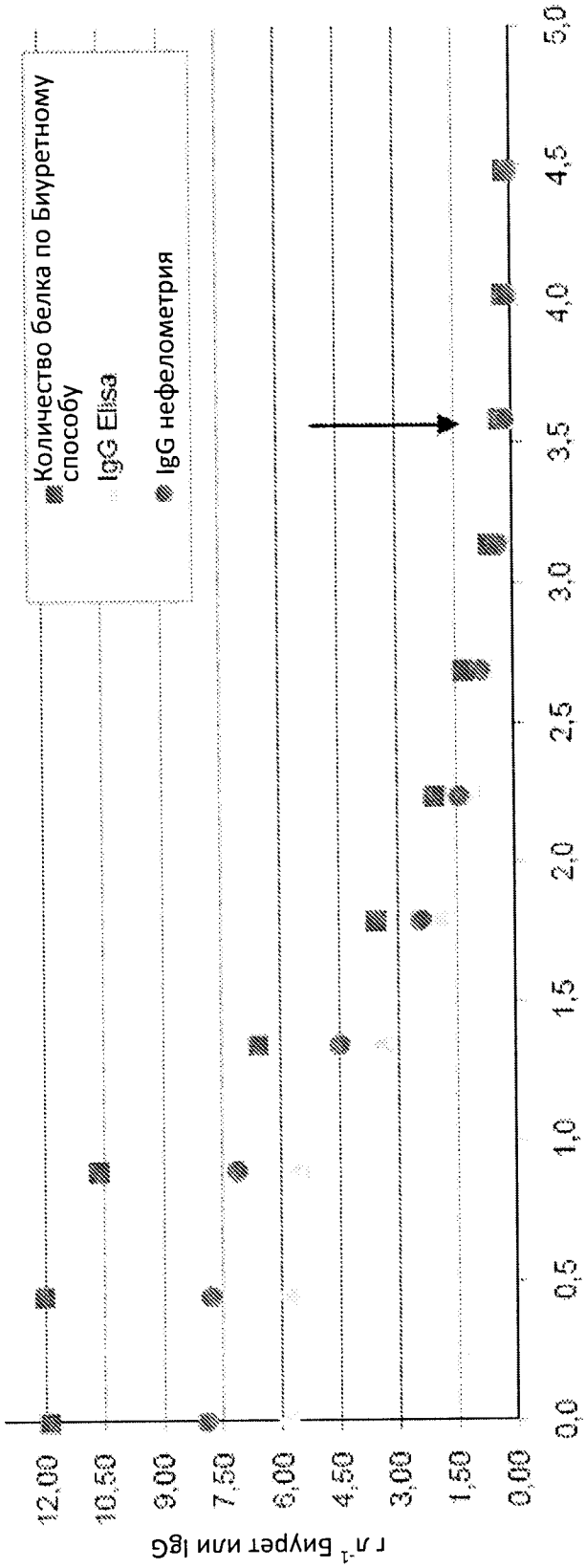
12. Способ по п.10, где обработка суспензии тонко измельченным диоксидом кремния (SiO_2) на стадии (г) включает добавление приблизительно 0,04 г высокодисперсного кремнезема на г осадка, полученного на стадии (б).

13. Способ по любому из пп. 1-12, где отделение растворимой фракции от суспензии, обработанной тонкоизмельченным диоксидом кремния на стадии (д) включает глубинную фильтрацию, где глубинная фильтрация дополнительно содержит промывание фильтра по меньшей мере 3 мертвыми объемами буфера.

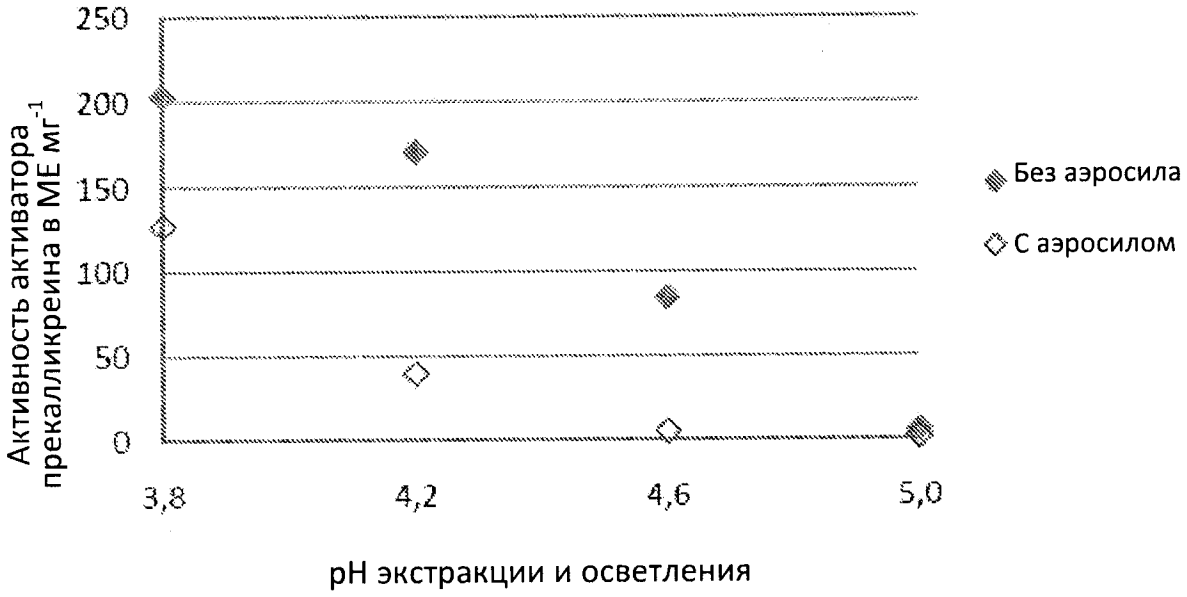
14. Способ по любому из пп. 1-13, где способ дополнительно содержит стадию осаждения IgG на третьей стадии осаждения приблизительно 22-28% спирта при pH приблизительно 6,7-7,3 с образованием третьего осадка.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где обогащенная IgG-композиция, полученная на стадии (д) содержит по меньшей мере 90% содержания IgG, обнаруженного в криосупернатантной плазменной фракции, использованной на стадии (а).

По доверенности


Количество белка по Биуретному способу
IgG Elisa
IgG нефелометрия
г л-1 Биурет или IgG
12,00
10,50
9,00
7,50
6,00
4,50
3,00
1,50
0,00
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
Количество мертвых объемов фильтрпресса, использованных для пост-промывки

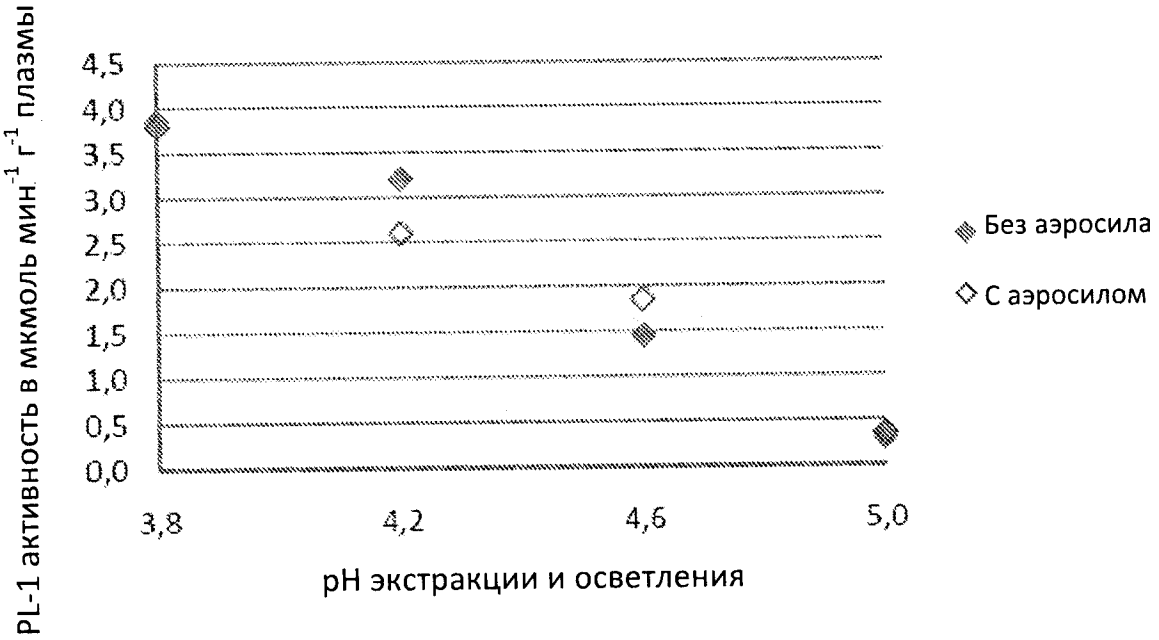
Фиг. 1


250
200
150
100
50
0
Активность активатора прекалликреина в МЕ мг-1
3,8
4,2
4,6
5,0
pH экстракции и осветления
Без аэросила
С аэросилом

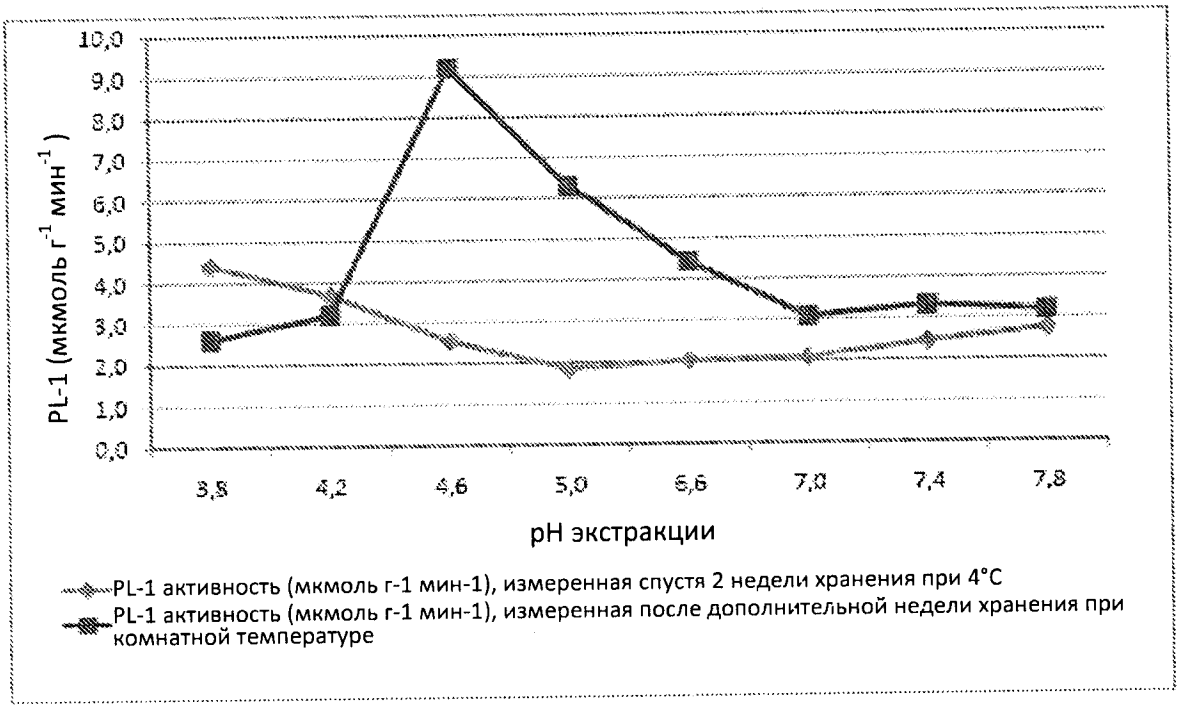
Фиг. 2

300
250
200
150
100
50
0
Фибриноген в мг л-1 плазмы
3,8
4,2
4,6
5,0
pH экстракции и осветления
Без аэросила
С аэросилом

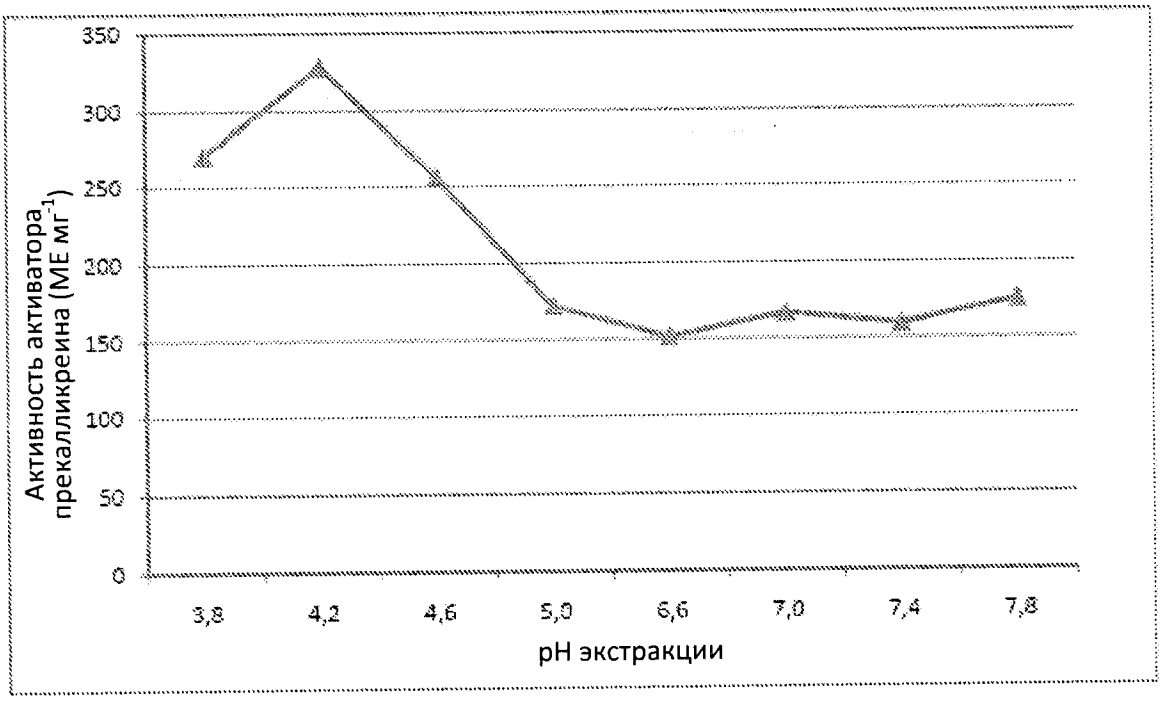
Фиг. 3


PL-1 активность в мкмоль мин-1 г-1 плазмы
4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
3,8
4,2
4,6
5,0
pH экстракции и осветления
Без аэросила
С аэросилом

Фиг. 4

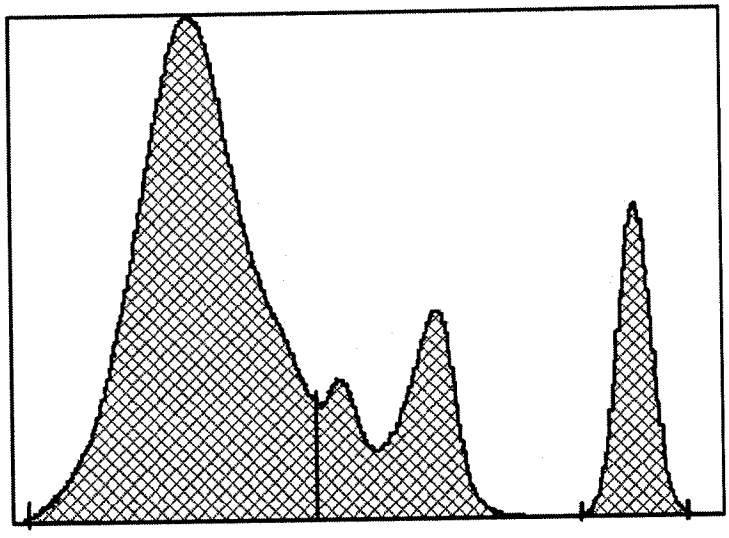

PL-1 (мкмоль г-1 мин-1)
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
3,8
4,2
4,6
5,0
6,6
7,0
7,4
7,8
pH экстракции
PL-1 активность (мкмоль г-1 мин-1), измеренная спустя 2 недели хранения при 4°C
PL-1 активность (мкмоль г-1 мин-1), измеренная после дополнительной недели хранения при комнатной температуре

Фиг. 5


350
300
250
200
150
100
50
0
Активность активатора прекалликреина (МЕ мг-1)
3,8
4,2
4,6
5,0
6,6
7,0
7,4
7,8
pH экстракции

Фиг. 6

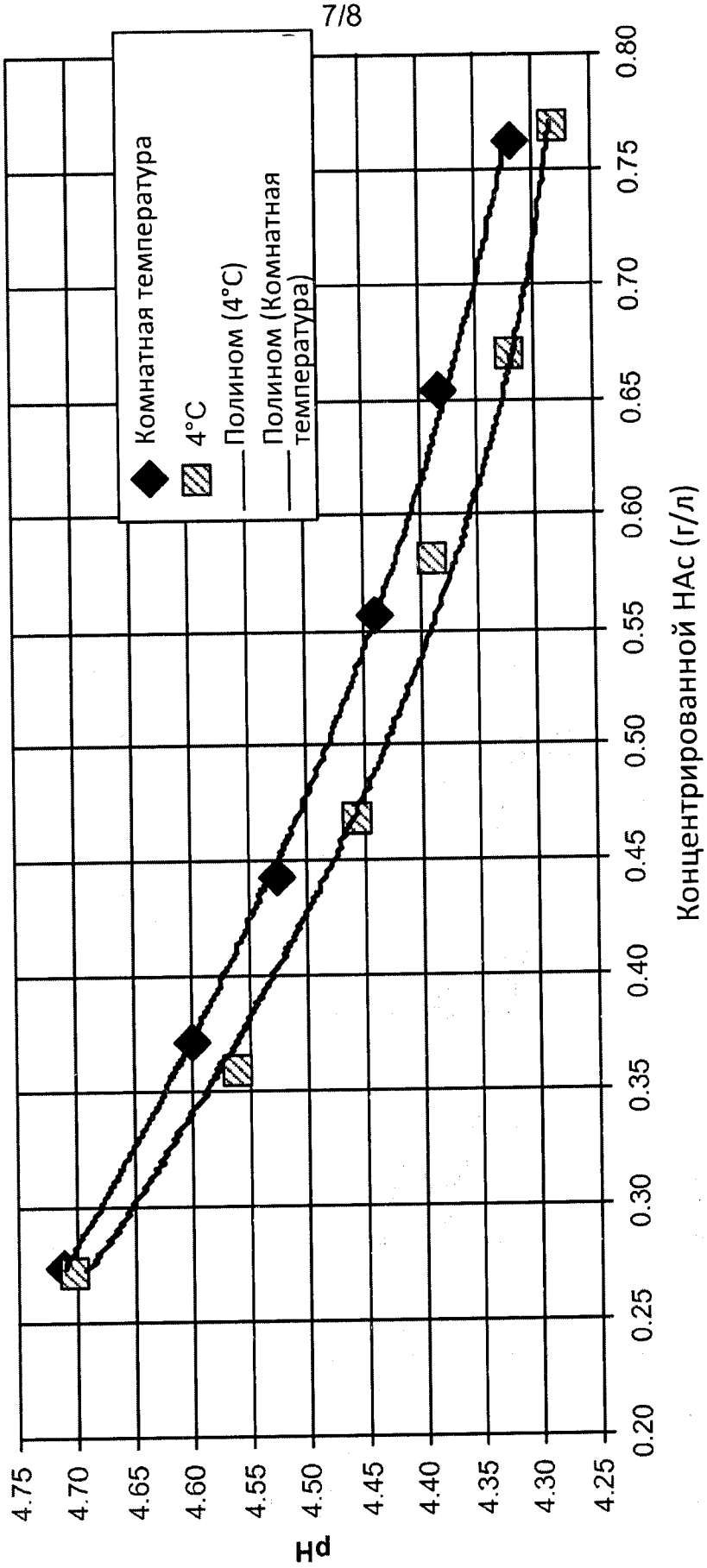
Фиг. 7A



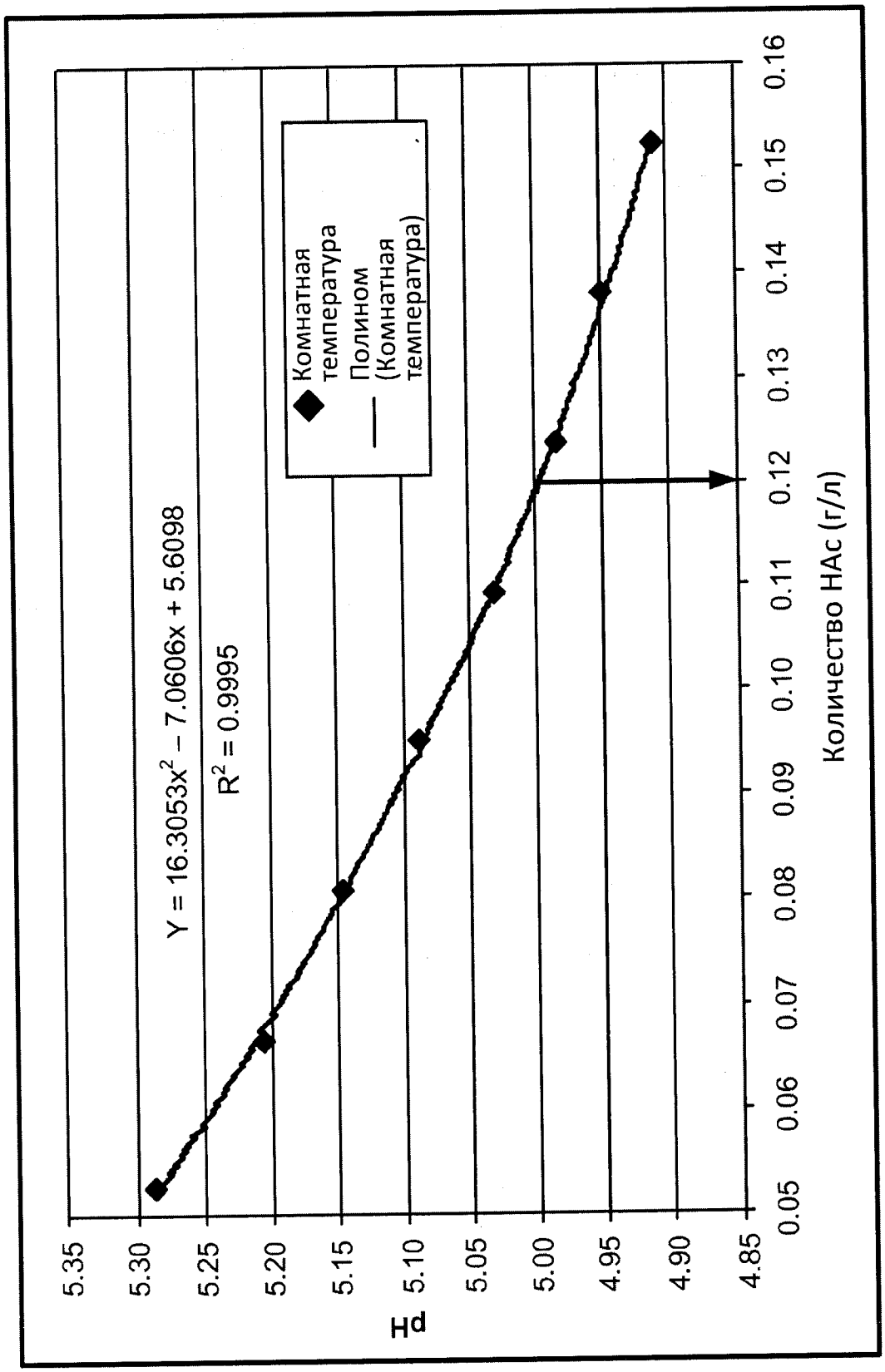
Фиг. 7B

pH
7,75
7,7
7,65
7,6
7,55
7,5
7,45
7,4
7,35
7,3
7,25
VNAU795
VNAU785
VNAU762
VNAU754
VNAU736
VNAU710
VNAU705
VNAU700
VNAU681/V127
VNAU676
VNAU671
VNAU666
VNAU661/V127
VNAU630
VNAU622
VNAU599
VNAU591
VNAU581
VNAU573
VNAU548
VNAU540
VNAU517
VNAU491
VNAU483
VNAU473
VNAU447
VNAU440
VNAU435
VNAU430
VNAU425
VNAU391
VNAU381
Партия

Фиг. 8


Комнатная температура
4°C
Полином (4°C)
Полином (Комнатная температура)
Концентрированной HAc (г/л)
pH
4.75
4.70
4.65
4.60
4.55
4.50
4.45
4.40
4.35
4.30
4.25
0.20
0.25
0.30
0.35
0.40
0.45
0.50
0.55
0.60
0.65
0.70
0.75
0.80

Фиг. 9


Комнатная температура
Полином (Комнатная температура)
Y = 16.3053x² – 7.0606x + 5.6098
R² = 0.9995
pH
Количество HAc (г/л)
5.35
5.30
5.25
5.20
5.15
5.10
5.05
5.00
4.95
4.90
4.85
0.05
0.06
0.07
0.08
0.09
0.10
0.11
0.12
0.13
0.14
0.15
0.16

Фиг. 10

ЕВРАЗИИСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42

Номер евразийской заявки: 201500848

Дата подачи: 27 мая 2010 (27.05.2010) | Дата испрашиваемого приоритета: 26 мая 2010 (26.05.2010)

Название изобретения: Способ получения обогащенной IGG-композиции из плазмы

Заявитель: БАКСТЕР ИНТЕРНЭШНЛ ИНК. и др.

☐ **Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)**

☐ **Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)**

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: ***A61K 39/395*** *(2006/01)*, ***C07K 1/36*** *(2006/01)*, ***C07K 16/06*** *(2006/01)*, ***B01J 20/10*** *(2006/01)*, ***A61P 37/00*** *(2006/01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК)

A61K 39/00, 39/395, A61P 37/00, C07K 1/00, 1/14, 1/30, 1/34, 1/36, 16/00, 16/06, B01J 20/00, 20/10

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 5164487 A (BIOTEST PHARMA GMBH) 17.11.1992, кол. 4, строки 33-45, кол. 6 строки 8-45, кол. 8 строки 8-49, кол. 9, строки 30-52	1-15
Y	BUCHACHER Andrea et al. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma-aspects of yield and virus safety. Biotechnol. J. 2006 Feb. 1, 148-163, реферат, с.150, 151, левая кол., с. 152, фиг. 3, с. 153, левая кол., абзац 4	1-15
Y	US 7041798 B1 (BIOTEST PHARMA GMBH) 09.05.2006, кол. 7 строки 22-56, кол. 10 строки 18-28, кол. 12 строки 49-67, кол. 13 строки 1-50, фиг. 1-3	8, 9, 13

☐ последующие документы указаны в продолжении графы В ☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

"A" документ, определяющий общий уровень техники

"E" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

"O" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета

"D" документ, приведенный в евразийской заявке

"T" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

"X" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

"Y" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

"&" документ, являющийся патентом-аналогом

"L" документ, приведенный в других целях

Дата действительного завершения патентного поиска: 12 февраля 2016 (12.02.2016)

Наименование и адрес Международного поискового органа:
Федеральный институт промышленной собственности
РФ, 125993,Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1.Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА

Уполномоченное лицо :
Т. Ф. Владимирова
Телефон № (499) 240-25-91