

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292782** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.22

(22) Дата подачи заявки
2021.03.29

(51) Int. Cl. **C07K 16/06** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ИММУНОГЛОБУЛИНА ИЗ ПЛАЗМЫ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ИНГИБИТОРА C-1

(31) 63/002,791

(32) 2020.03.31

(33) US

(86) PCT/US2021/024644

(87) WO 2021/202373 2021.10.07

(71) Заявитель:
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:

**Майс-Пол Урсула, Тешнер Вольфганг,
Брукшвайгер Леопольд, Гнауэр
Лусия, Талир Бригитте, Гранд Сандра
(AT), По Жоффре (BE)**

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

(57) Описан способ получения обогащенной иммуноглобулином G (IgG) фракции из супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH. Выделение фракции с высоким содержанием иммуноглобулина G (IgG) из супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH обеспечивает альтернативный исходный материал для процесса производства. В настоящем изобретении супернатант плазмы с низким содержанием C1-INH обрабатывают гепарином перед дополнительной обработкой.

202292782

A1

A1

202292782

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-575409EA/085

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА ИММУНОГЛОБУЛИНА ИЗ ПЛАЗМЫ С НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ИНГИБИТОРА С-1

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/002791, поданной 31 марта 2020 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Полученные из плазмы препараты крови применяют для лечения не только различных заболеваний крови, но также заболеваний другого происхождения. Например, продукты иммунного глобулина (IgG) из плазмы человека впервые применили в 1952 г. для лечения иммунодефицита. С того времени препараты IgG нашли широкое применение по меньшей мере в трех основных категориях медицинских состояний: (1) иммунодефициты, такие как агаммаглобулинемия, сцепленная с X-хромосомой, гипогаммаглобулинемия (первичные иммунодефициты), и приобретенные состояния, связанные со сниженным иммунитетом (вторичные иммунодефициты), включая низкий уровень антител; (2) воспалительные и аутоиммунные заболевания; и (3) острые инфекции.

[0003] В то время, как лечение IVIG может быть очень эффективным для управления первичными иммунодефицитными состояниями, данная терапия является только временным замещением антител, которые не вырабатываются в организме, а не лечением заболевания. Соответственно, пациентам, зависимым от терапии IVIG, необходимы повторные дозы, обычно около одного раза в месяц в течение жизни. Данная потребность предъявляет значительные требования к непрерывному производству композиций IVIG. Тем не менее, в отличие от других биопрепаратов, которые получают посредством экспрессии *in vitro* рекомбинантных векторов ДНК, IVIG получают из донорской крови и плазмы человека. Таким образом, количество продуктов IVIG нельзя увеличить, просто увеличивая объем производства. Скорее уровень имеющихся в продаже IVIG ограничен имеющимся запасом донорской крови и плазмы.

[0004] Ряд способов получения IVIG применяется коммерческими поставщиками продуктов IVIG. Одна из распространенных проблем, связанных с существующими способами производства IVIG, заключается в существенной потере IgG в ходе процесса очистки, которая по оценкам составляет по меньшей мере от 30% до 35% общего содержания IgG в сырье. Одной из задач является поддержание качества инактивации вирусов и отсутствие примесей, которые могут вызывать побочные реакции, при одновременном повышении выхода IgG.

[0005] При нынешнем уровне производства IVIG то, что может считаться небольшим увеличением выхода, на самом деле является очень значительным. Например, при уровнях производства 2007 г. повышение эффективности на 2%, равное дополнительным 56 миллиграммам на литр, будет образовывать 1,5 дополнительные

метрические тонны IVIG.

[0006] При производстве и разработке биологических препаратов на основе плазмы необходимо принимать во внимание различные меры предосторожности. Они включают способы удаления и/или инактивации переносимых с кровью патогенов (*например*, вирусных и бактериальных патогенов), антикомплементарной активности и других нежелательных загрязняющих примесей, возникающих вследствие применения донорской плазмы. Исследования показали, что введение высоких уровней амидолитической активности может привести к нежелательным тромбоэмболическим осложнениям (Wolberg AS *et al.*, Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. Am J Hematol 2000;65:30-34; and Alving BM *et al.*, Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. J Lab Clin Med 1980; 96:334-346; раскрытие которых включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей).

[0007] Об этой озабоченности свидетельствует недавний добровольный отзыв Octagam® (Octapharma) в США и прекращение разрешения на медицинское применение препарата Octagam® и Octagam 10% Европейской комиссией после растущего числа сообщений о случаях тромбоэмболии. Вполне вероятно, что увеличение явлений тромбоза было вызвано высоким уровнем амидолитической активности в биологическом препарате, вызванным примесями сериновой протеазы и зимогена сериновой протеазы, таких как фактор XI, фактор XIa, фактор XII и фактор XIIa (Заметка FDA: добровольный отзыв с рынка - 23 сентября 2010 г. Octagam [иммунный глобулин для внутривенного введения (человеческий)] 5% жидкий препарат; Octagam 50 мг/мл, раствор - Octapharma France - Mise en quarantaine de tous les lots, опубликованная онлайн 9 сентября 2010 г. в AFSSAPS; и Вопросы и ответы о прекращении разрешения на медицинское применение препарата для Octagam (человеческий нормальный иммуноглобулин 5% и 10%), опубликованной онлайн 23 сентября 2010 г. Европейским агентством лекарственных средств).

[0008] В WO2014113659A1 раскрыт способ выделения одного или более препаратов крови из материала препаратов крови с низким содержанием интер-альфа ингибиторного белка (IaIр). Препарат крови выделяют хроматографически из криосупернатантной плазмы с низким содержанием IaIр посредством контакта указанной криосупернатантной плазмы с низким содержанием IaIр в с поддержкой DEAE. Данная ссылка не описывает использование супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH для производства IgG. В нем также не раскрывается обработка супернатанта плазмы гепарином, что приводит к снижению амидолитической и прокоагулянтной активности IgG.

[0009] Вследствие растущих опасений по поводу ограниченного количества исходного материала для получения IgG и потери значительного количества IgG в процессе очистки в данной области существует неотложная потребность в разработке способа увеличения доступности значительного количества альтернативных исходных материалов для производства IgG.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Настоящее описание направлено на указанные и другие проблемы. В одном варианте осуществления настоящее изобретение основано на обнаружении того, что супернатант плазмы с низким содержанием C1-INH можно применять в качестве исходного материала для получения фракции с высоким содержанием иммуноглобулина G (IgG), получая таким образом доступность другого исходного материала для получения IgG. Недавние опасения по поводу амидолитического содержания данных композиций в сочетании с возникновением тромбоэмболических явлений у пациентов, получающих белковые композиции из плазмы, высветили потребность в данной области в способе снижения уровня сериновых протеаз (*например*, FXIa и FXIIa) и зимогены сериновых протеаз (*например*, FXI и FXII) в ходе производства данных биопрепаратов. Преимущественно, настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном заключении, что гепарин можно применять для снижения прокоагулянтной и амидолитической активности до приемлемых уровней в ходе процесса фракционирования. Также представлены терапевтические образованные из плазмы белковые композиции со сниженной активностью сериновой протеазы, содержанием сериновой протеазы и/или содержанием зимогена сериновой протеазы. Также представлены способы лечения или предупреждения заболевания посредством введения композиции по настоящему изобретению.

[0011] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ получения фракции с высоким содержанием иммуноглобулина G (IgG) из супернатантной фракции с низким содержанием C1-INH, содержащей IgG. Способ включает следующее:

(a) обеспечение контакта супернатантной фракции с низким содержанием C1-INH с гепарином, образуя таким образом гепаринизированную фракцию с низким содержанием C1-INH; и

(b) выделение IgG из гепаринизированной фракции с низким содержанием C1-INH, образуя таким образом фракцию с высоким содержанием IgG.

[0012] В одном варианте осуществления способов, описанных в данном документе, супернатантная фракция представляет собой супернатант, полученный после адсорбции C1-ингибитора.

[0013] В одном иллюстративном варианте осуществления супернатантная фракция представляет собой супернатант плазмы.

[0014] В одном варианте осуществления супернатант плазмы представляет собой криосупернатантную плазму с низким содержанием C1-INH.

[0015] В различных вариантах осуществления супернатант плазмы образован из дважды обедненной криосупернатантной плазмы (DDCPP).

[0016] В одном иллюстративном варианте осуществления супернатантная фракция имеет низкое содержание одного или более других факторов коагуляции крови, выбранных из фактора II, VII, IX, X и их смеси.

[0017] В одном варианте осуществления супернатантную фракцию концентрируют

до значения белка нормальной плазмы перед последующей обработкой.

[0018] В одном иллюстративном варианте осуществления гепарин добавляют в количестве от около 1 до около 20 единиц на мл супернатантной фракции.

[0019] В одном иллюстративном варианте осуществления гепарин добавляют в количестве от около 5 до около 10 единиц на мл супернатантной фракции.

[0020] В одном варианте осуществления гепарин добавляют в количестве около 5 единиц на мл супернатантной фракции.

[0021] В различных вариантах осуществления гепарин добавляют в количестве около 10 единиц на мл супернатантной фракции.

[0022] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает в себя:

(с) удаление ингибитора эстеразы C1-INH (C1-INH) из фракции криосупернатантной плазмы, содержащей C1-INH, образуя таким образом супернатантную фракцию с низким содержанием C1-INH.

[0023] В одном варианте осуществления фракция с высоким содержанием IgG содержит от около 60% до около 80% содержания IgG в супернатантной фракции.

[0024] В одном варианте осуществления фракция с высоким содержанием IgG содержит по меньшей мере около 50% содержания IgG в супернатантной фракции.

[0025] В одном варианте осуществления способов, описанных выше, чистота γ -глобулинов во фракции с высоким содержанием IgG составляет по меньшей мере около 95%.

[0026] В одном варианте осуществления способов, описанных выше, чистота γ -глобулинов во фракции с высоким содержанием IgG составляет от около 95% до около 99,9%.

[0027] В одном иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен способ выделения IgG из гепаринизированной фракции, включающий одну или более из следующих стадий в любом порядке или комбинации:

(i) осаждение гепаринизированной фракции, содержащей от около 6% до около 10% этанола, например, водного раствора этанола, при pH от около 7,0 до около 7,5 с получением осадка фракции I и супернатанта фракции I; и

(ii) осаждение IgG из супернатанта фракции I, содержащего от около 18% до около 27% этанола, например, водного раствора этанола, при pH от около 6,7 до около 7,3 с образованием осадка фракции II+III.

[0028] В одном варианте осуществления способов, раскрытых выше, способ дополнительно включает осаждение IgG из гепаринизированной фракции, содержащей от около 18% до около 27% этанола, например, водного раствора этанола, при pH от около 6,7 до около 7,3 с образованием осадка фракции I+II+III.

[0029] В одном варианте осуществления способов дополнительно включает одну или более из следующих стадий в любом порядке или комбинации:

(iii) суспендирование осадка фракции II+III или фракции I+II+III в суспензионном

буфере, с образованием таким образом суспензии IgG;

(iv) смешивание мелкодисперсного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией IgG, например, в течение по меньшей мере около 30 минут;

(v) фильтрование суспензии IgG, с образованием таким образом фильтрата и осадка на фильтре.

[0030] В одном варианте осуществления способ дополнительно включает одну или более из следующих стадий в любом порядке или комбинации:

(vi) промывка осадка на фильтре по меньшей мере с около 1 мертвым объемом фильтр-пресса промывочного буфера с pH от около 4,9 до около 5,3, с образованием таким образом промывочного раствора;

(vii) объединение фильтрата с промывочным раствором, с образованием таким образом объединенного раствора, и обработка объединенного раствора моющим средством;

(viii) регулирование pH объединенный раствор со стадии (vii) до около 7,0 и добавление к нему этанола до конечной концентрации от около 20% до около 30%, с образованием таким образом осажденного осадка G;

(ix) растворение осажденного осадка G в водном растворе, содержащем составляющее, выбранное из растворителя, моющего средства и их комбинации, и инкубация раствора, например, в течение по меньшей мере около 60 минут, с образованием инкубированного раствора;

(x) пропускание инкубированного раствора через катионообменную хроматографическую колонку и элюирование белков, абсорбированных на колонке в элюате;

(xi) пропускание элюата через анионообменную хроматографическую колонку с образованием проточной фракции;

(x) пропускание потока через фракцию через нанофильтр с образованием нанофильтрата;

(xi) концентрация нанофильтрата посредством ультрафильтрации с образованием первого ультрафильтрата;

(xii) диафильтрация первого ультрафильтрата через диафильтрационный буфер с образованием диафильтрата; и

(xiii) концентрация диафильтрата посредством ультрафильтрации с образованием второго ультрафильтрата с концентрацией белка от около 8% (вес/об.) до около 22% (вес/об.), с образованием таким образом фракции с высоким содержанием IgG.

[0031] В одном варианте осуществления способ включает добавление SiO_2 к конечной концентрации от около 0,02 до около 0,10 грамм SiO_2 на грамм осадка фракции II+III или фракции I+II+III.

[0032] В одном варианте осуществления способ включает промывку осадка на фильтре по меньшей мере с около 3 мертвыми объемами фильтр-пресса промывочный буфер.

[0033] В одном варианте осуществления способ включает промывку осадка на фильтре по меньшей мере с около 2 мертвыми объемами фильтр-пресса промывочный буфер.

[0034] В одном варианте осуществления способ включает элюирование по меньшей мере одного белка с использованием по меньшей мере около 35 мМ натрия дигидрофосфата дигидрата.

[0035] В одном варианте осуществления диафильтрационный буфер содержит от около 200 мМ до около 300 мМ глицина.

[0036] В одном варианте осуществления способ дополнительно включает обработку раствора IgG растворителем и/или моющим средством по меньшей мере на одной стадии инактивации или удаления вируса.

[0037] В одном варианте осуществления способов, описанных выше, способ дополнительно включает стадию инкубации при низком pH, от около 4,0 до около 5,2.

[0038] В одном варианте осуществления способов, описанных выше, способ дополнительно включает стадию инкубации при низком pH, от около 4,4 до около 4,9.

[0039] В одном иллюстративном варианте осуществления в настоящем изобретении представлен супернатант после адсорбционной фракции C1-ингибитора, содержащей IgG, причем указанная фракция представляет собой фракцию криосупернатантной плазмы с низким содержанием C1-INH по меньшей мере на около 70% общего процента во фракции криосупернатантной плазмы.

[0040] В четвертом аспекте настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция, содержащая фракцию с высоким содержанием IgG, полученную в соответствии с настоящим изобретением.

[0041] В одном варианте осуществления композиция содержит по меньшей мере около 80-220 грамм IgG на литр композиции.

[0042] В одном варианте осуществления pH фармацевтической композиции составляет от около 4,4 до около 4,9.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

[0043] В отличие от других биопрепаратов, которые получаю посредством рекомбинантной экспрессии векторов ДНК в линии клеток-хозяев, образованные из плазмы белки фракционированы из донорской человеческой крови и плазмы. Таким образом, поставку таких продуктов невозможно повысить посредством простого повышения объема производства. Скорее уровень имеющихся в продаже препаратов крови ограничен имеющимся запасом донорской крови и плазмы. Данная динамика приводит к нехватке сырой человеческой плазмы для производства новых факторов крови, полученных из плазмы, которые имеют менее развитые коммерческие рынки, включая фактор комплемента H (CFH) и белки-ингибиторы интер-альфа-трипсина (α_1 tr).

[0044] Опасения по поводу амидолитического содержания композиций, полученных из плазмы, выдвинули на первый план потребность в способе снижения сериновых протеаз

(например, FXIa и FXIIa) и зимогенов сериновых протеаз (например, FXI и FXII) при производстве IgG и других биопрепаратов.

[0045] C1-ингибитор (C1-INH, ингибитор эстеразы C1) является наиболее важным физиологическим ингибитором калликреина плазмы, фактора XIa и фактора XIIa. Снижение концентрации C1-ингибитора может обеспечивать накопление данных факторов в исходных материалах для производства коммерческих терапевтических средств на основе IgG, таких как GAMMAGARD® LIQUID (GGL), затрудняя производство препаратов IgG для внутривенного введения без повышенного риска тромбоэмболических осложнений. Вследствие сложности производства иммуноглобулинов из супернатантов плазмы после адсорбции C1-ингибитора, называемого двойной обедненной криосупернатантной плазмой (DDCPP), нативную супернатантную плазму не используют в качестве исходного материала для производства IgG. Таким образом, для обеспечения достаточного удаления калликреина плазмы, фактора XIa и фактора XIIa со сниженной концентрацией C1-ингибитора, рассчитанное количество 10,000 МЕ/л гепарина добавляют к DDCPP до начала процесса спиртового фракционирования.

[0046] Настоящее раскрытие на части выявления того, что супернатант плазмы с низким содержанием C1-INH, а также супернатантная фракция с низким содержанием одного или более других факторов свертывания крови, выбранных из фактора II, VII, IX и X и их смеси, можно применять в качестве исходного материала для получения фракции, обогащенной иммуноглобулином G (IgG), делая таким образом доступный другой исходный материал для получения IgG. Преимущественно, настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном заключении, что гепарин можно применять для усиленного снижения прокоагулянтной активности в ходе процесса фракционирования.

[0047] Для преодоления данных проблем, авторы настоящего изобретения разработали процесс, включающий стадию очистки, например, стадию исходной очистки, в ходе которого совместно осаждаются супернатант плазмы с низким содержанием C1-INH с гепарином, с образованием таким образом гепаринизированной фракции; а затем выделения IgG из гепаринизированной фракции. Таким образом, гепарин, обработанный гепарином супернатант плазмы с низким содержанием C1-INH можно применять в качестве исходный материал для получения обогащенной иммуноглобулином G (IgG) фракции, получая новый исходный материал для получения IgG.

[0048] В определенных аспектах настоящего изобретения представлены способы для производства IVIG со сниженной прокоагулянтной и амидолитической активностью.

[0049] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения представлены композиции IgG, полученные в соответствии с улучшенными способами производства, представленными в данном документе. Преимущественно, данные композиции являются менее дорогостоящими при получении, чем коммерческие продукты, доступные в настоящее время, вследствие улучшенного выхода, обеспечиваемого способами, представленными в данном документе. Кроме того, данные композиции

являются такими же чистыми, возможно, даже более чистыми, чем композиции, полученные с использованием коммерческих способов. Важно отметить, что данные композиции подходят для применения в терапии IVIG для иммунодефицитов, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, и острых инфекций. В одном варианте осуществления композиция IgG имеет концентрацию IgG, равную или практически равную 10%, для внутривенного введения. В другом варианте осуществления композиция IgG имеет концентрацию, равную или практически равную 20%, для подкожного или внутримышечного введения.

[0050] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения представлены фармацевтические композиции и составы композиций IgG, полученных из супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH, как представлено в данном документе. В определенных вариантах осуществления данные композиции и составы обеспечивают улучшенные свойства по сравнению с другими композициями IVIG, представленными в настоящее время на рынке. Например, в определенных вариантах осуществления композиции и составы, представленные в данном документе, стабильны в течение длительного периода времени.

[0051] В одном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения представлен способ лечения иммунодефицитов, воспалительных и аутоиммунных заболеваний, и острых инфекций, включающий введение композиции IgG, полученной из супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH. В различных вариантах осуществления композицию IgG получают посредством способа по настоящему изобретению.

[0052] Иллюстративные способы получения содержащей ингибитор C1-INH-эстеразы (C1-INH) композиции можно найти в WO2001046219A2, где описаны анионообменники при кислотном pH (т.е., ниже pH 7), для выделения C1-INH.

В. Определения

[0053] В контексте данного документа термин “IgG для внутривенного введения” или “лечение IVIG” в целом относится к терапевтическому способу внутривенного, подкожного или внутримышечного введения фармацевтической композиции иммуноглобулинов IgG пациенту для лечения состояния, такого как, например, иммунодефициты, воспалительные заболевания и аутоиммунные заболевания. Иммуноглобулины IgG обычно объединяют и получают из плазмы. Можно применять полные антитела или фрагменты. Иммуноглобулины IgG могут быть составлены с более высокими концентрациями (например, более 10%) для подкожного введения, или составлены для внутримышечного введения. Это особенно характерно для специальных препаратов IgG, которые получают с титрами выше среднего для специфических антигенов (например, фактора Rho D, коклюшного токсина, столбнячного токсина, токсин ботулизма, бешенство и т.д.). Для простоты обсуждения в настоящей заявке такие композиции IgG для подкожного или внутримышечного введения также включены в термин «IVIG».

[0054] В контексте данного документа термин “амидолитическая активность”

относится к способности полипептида катализировать гидролиз по меньшей мере одной пептидной связи в другом полипептиде. Профиль амидолитической активности для композиции иммуноглобулина IgG может быть определен посредством исследования с различными хромогенными субстратами, с различными специфичностями к протеазам, обнаруженным в человеческой плазме, включая без ограничения следующие: PL-1 (широкий спектр), S-2288 (широкий спектр), S-2266 (FXIa, железистые калликреины), S-2222 (FXa, трипсин), S-2251 (плазмин), и S-2302 (калликреин, FXIa и FXIIa). Способы определения амидолитической активности композиции хорошо известны в данной области, например, как указано в M. Etscheid et al. (Identification of kallikrein and FXIa as impurities in therapeutic immunoglobulins: implications for the safety and control of intravenous blood products, Vox Sang 2011; раскрытие которой включено в настоящий документ во всей своей полноте для всех целей.)

[0055] В контексте данного документе "антитело" относится к полипептиду, по существу кодированному геном иммуноглобулинов или генами иммуноглобулинов, или их фрагментами, который специфически связывается и распознает аналит (антиген). Распознанные гены иммуноглобулинов включают гены константных областей каппа, лямбда, альфа, гамма, дельта, эpsilon и мю, а также множество генов переменных областей иммуноглобулинов. Легкие цепи классифицируются как каппа или лямбда. Тяжелые цепи классифицируются как гамма, мю, альфа, дельта или эpsilon, которые, в свою очередь, определяют классы иммуноглобулинов, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. Структурная единица типового иммуноглобулина (антитела) состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара содержит одну «легкую» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). N-конец каждой цепи определяет переменную область от примерно 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Термины переменная легкая цепь (V_L) и переменная тяжелая цепь (V_H) относятся к данным легким и тяжелым цепям, соответственно.

[0056] В контексте данного документа термин "ультрафильтрация (UF)" охватывает различные способы мембранной фильтрации, в которых гидростатическое давление выталкивает жидкость через полупроницаемую мембрану. Суспендированные твердые вещества и растворенные вещества с высокой молекулярной массой задерживаются, тогда как вода и растворенные вещества с низкой молекулярной массой проходят через мембрану. Данный процесс разделения зачастую применяют для очистки и концентрации макромолекулярных растворов (10^3 - 10^6 Да), в частности, растворов белков. Ряд мембран для ультрафильтрации доступны в зависимости от размера молекул, которые они задерживают. Ультрафильтрация обычно характеризуется размером пор мембраны от 1 до 1000 кДа и рабочими давлениями от 0,01 до 10 бар, и ее конкретно применяют для разделения коллоидов, таких как белки из малых молекул, таких как сахара и соли.

[0057] В контексте данного документа термин "диафильтрация" осуществляется с теми же мембранами, что и ультрафильтрация, и она представляет собой тангенциальную поточную фильтрацию. В ходе диафильтрации буфер вводят в бак для рециркуляции, тогда

как фильтрат удаляют из отдельной операции. В процессах, в которых продукты находятся в ретентате (например, IgG), диафильтрация обеспечивает вымывание компонентов ряда продуктов в фильтрат, обменивая таким образом буферы и снижая концентрацию нежелательных форм.

[0058] В контексте данного документа термин "около" означает приблизительный диапазон относительно указанного значения. В некоторых вариантах осуществления диапазон составляет плюс или минус 1%-10% от указанного значения. Таким образом, "около" охватывает плюс или минус 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% и 10% от указанного значения. Например, выражение "около 20%" охватывает диапазон 18-22%.

[0059] В контексте данного документа термин "растворитель" охватывает любое жидкое вещество, способное растворять или диспергировать одно или более других веществ. Растворитель может иметь неорганическую природу, например, вода, или он может представлять собой органическую жидкость, такую как этанол, ацетон, метилацетат, этилацетат, гексан, петролейный эфир *и т.д.* В контексте данного термина "обработка растворителем и моющим средством" растворитель означает органический растворитель (*например*, три-N-бутилфосфат), который является частью смеси растворителя и моющего средства, применяемой для инактивации окруженных жидкостью вирусов в растворе.

[0060] В контексте данного документа термин "моющее средство" применяют взаимозаменяемо с термином "поверхностно-активное вещество" или "поверхностно-активное средство". Поверхностно-активные вещества обычно представляют собой органические соединения, которые являются амфифильными, *т.е.*, содержащими как гидрофобные группы ("хвосты"), так и гидрофильные головы ("головные области"), которые делают поверхностно-активные вещества растворимыми как в органических растворителях, так и в воде. Поверхностно-активное вещество может быть классифицировано по наличию формально заряженных групп в его головной области. Неионное поверхностно-активное вещество не имеет заряженных групп в его головной области, тогда как ионное поверхностно-активное вещество имеет суммарный заряд в его головной области. Цвиттерионное поверхностно-активное вещество содержит головную область с двумя противоположно заряженными группами. Некоторые примеры распространенных поверхностно-активных веществ включают следующие: анионные (на основе сульфатных, сульфонатных или карбоксилатных анионов): перфтороктаноат (PFOA или PFO), перфтороктансульфонат (PFOS), додецилсульфат натрия (SDS), лаурилсульфат аммония и другие алкилсульфатные соли, лауретсульфат натрия (также известный как лаурилэфирсульфат натрия или SLES), алкилбензолсульфонат; катионные (на основе катионов четвертичного аммония): цетилтриметиламмония бромид (СТАВ), также известный как гексадецилтриметиламмония бромид, и другие соли алкилтриметиламмония, цетилпиридиния хлорид (CPC), полиэтоксифирированный талловый амин (POEA), бензалкония хлорид (BAC), бензентония хлорид (BZT); доинноцепочечные жирные кислоты и их соли: в том числе каприлат, каприловая кислота, гептаноат, гексановая кислота, гептановая кислота, нонановая кислота, декановая кислота и т.д.;

цвиттерионные (амфотерные): додецилбетаин; кокамидопропилбетаин; кокоамфоглицинат; неионные: алкилполи(этиленоксид), алкилфенолполи(этиленоксид), сополимеры поли(этиленоксида) и поли(пропиленоксида) (известны под торговыми названиями полуксамеры или полуксамины), алкилполигглюкозиды, в том числе октилглюкозид, децилмальтозид, жирные спирты (*например*, цетиловый спирт и олеиловый спирт), кокамид MEA, кокамид DEA, полисорбаты (Tween 20, Tween 80 и т.д.), моющие средства Triton и додецилдиметиламиноксид.

[0061] В контексте данной заявки термин "распыление" относится к средствам доставки жидкого вещества в систему, *например*, в ходе стадии осаждения спиртом, например, I или II+III стадии осаждения модифицированного фракционирования по Кону в виде мелких капель или тумана жидкого вещества. Распыление может быть достигнуто с использованием любого устройства под давлением, такого как контейнер (*например*, флакон с распылителем), который имеет распылительную головку или сопло и управляется вручную или автоматически для образования мелкого тумана из жидкости. Как правило, распыление осуществляют в то время, как система, получающая жидкое вещество, непрерывно перемешивается или иным образом смешивается для обеспечения быстрого и равномерного распределения жидкости в системе.

[0062] В контексте данного документа "криосупернатантная плазма" относится к супернатанту, образованному после холодного осаждения (крио-осаждения) плазмы или объединенной плазмы при температурах, близких к температурам замерзания, например, при температурах ниже около 10°C. В контексте настоящего изобретения плазма может взаимозаменяемо относиться к восстановленной плазме (т.е., плазме, которая была отделена от цельной крови *ex vivo*) или свежесамороженной плазме (т.е., плазмы, собранной посредством плазмафереза). Крио-осаждение обычно осуществляют, например, посредством оттаивания предварительно замороженной объединенной плазмы, которая уже прошла испытание из соображений безопасности и качества, хотя можно применять также и свежесобранную плазму. Оттаивание обычно осуществляют при температуре не более 6°C. После полного оттаивания замороженной плазмы при низкой температуре, выполняют центрифугирование на холоде (*например*, не более 6°C) для отделения твердых крио-осадков от жидкого супернатанта. В качестве альтернативы, стадию отделения можно выполнять посредством фильтрации, а не центрифугирования.

[0063] В контексте данного документа "объединенные вещества по Кону" относятся к исходному материалу, применяемому для фракционирования образца плазмы или объединенных образцов плазмы. Объединенные вещества по Кону включают цельную плазму, образцы криосупернатантной плазмы и объединенные образцы криосупернатантной плазмы, которые могут подвергаться стадии предварительной обработки или не подвергаться ей. В определенных вариантах осуществления объединенные вещества по Кону представляют собой образец криосупернатантной плазмы, из которого были удалены один или более факторов крови на стадии предварительной обработки, например, адсорбции на твердой фазе (*например*, гидроксиде алюминия,

мелкодисперсный диоксид кремния и т.д.), или стадии хроматографии (например, ионообменной или афинной хроматографии с гепарином). Различные факторы крови, включая без ограничения ингибиторную шунтирующую активность фактора VIII (FEIBA), комплекса фактора IX, концентрата фактора VII или комплекса антитромбина III, могут быть выделены из образца криосупернатантной плазмы с образованием объединенных веществ по Кону.

[0064] В контексте данного документа термин “образец плазмы” относится к любому подходящему материалу, например, восстановленной плазме или свежзамороженной плазме, или фракциям плазмы, или супернатантам плазмы, или полученные из плазмы белковые препараты. Иллюстративный “образец плазмы” включает IgG, образованный из плазмы или фракций плазмы, IgG, образованный из криосупернатантной плазмы, IgG, образованный из адсорбции ингибитора C-1 эстеразы криосупернатантной плазмы, IgG, образованный из дважды обедненной криосупернатантной плазмы (DDCPP).

[0065] В контексте данного документа “дважды обедненная криосупернатантная плазма (также известная как DDCPP/криосупернатантная плазма с низким содержанием ингибитора C-1 эстеразы)” относится к адсорбции супернатанта, образованной после адсорбции C1-ингибитора криосупернатантной плазмы при температурах, близких к температурам заморзания, например, при температурах ниже около 8°C. В способе производства GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare Corporation, Вестлейк Виллидж, Калифорния) применяется модифицированная процедура холодного фракционирования этанолом по Кону-Онкли для выделения промежуточной фракции иммуноглобулина G (IgG), называемой осадок G (PptG), из замороженных объединенных образцов человеческой плазмы. PptG дополнительно очищают посредством последующего использования слабой катионообменной и слабой анионообменной хроматографии. В последующую очистку PptG включены три специальные стадии снижения количества вирусов, а именно: обработка растворителем/моющим средством, нанофльтрация и инкубация при низком pH и повышенной температуре в конечном составе. Исходный материал для процесса фракционирования этанолом может подвергаться различным стадиям потребления для получения промежуточных продуктов для очистки факторов свертывания крови и ингибиторов белков плазмы. Адсорбция супернатанта, полученная после дозирования C1-ингибитора в процессе производства CINRYZE®, называется дважды обедненной криосупернатантной плазмой (DDCPP).

[0066] В контексте данного документа термин “нативный или вариантно-нативный” относится к применению DDCPP в качестве исходного материала без какого-либо регулирования/модификации и “вариантный гепарин” относится к добавлению 5000 МЕ гепарина/л DDCPP или 10000 МЕ гепарина/л DDCPP к исходному материалу. «Вариантный NaCl» относится к добавлению раствора хлорида для повышения проводимости DDCPP.

[0067] В контексте данного документа термин “C1-ингибитор (C1-inh, ингибитор C1 эстеразы)” представляет собой ингибитор протеазы, принадлежащий к надсемейству

серпинов. Его основная функция заключается в ингибировании системы комплемента для предотвращения спонтанной активации. C1-ингибитор представляет собой белок острой фазы, который циркулирует в крови на уровне около 0,25 г/л. Уровни повышаются примерно в 2 раза во время воспаления. C1-ингибитор необратимо связывается и инактивирует протеазы C1r и C1s в комплексе C1 классического пути комплемента. Протеазы MASP-1 и MASP-2 в маннозо-связывающих лектиновых (MBL) комплексах лектинового пути также инактивированы. Таким образом, C1-ингибитор предотвращает протеолитическое расщепление более поздних компонентов комплемента C4 и C2 под действием C1 и MBL. Несмотря на то, что C1-ингибитор назван в честь его ингибирующей активности в отношении комплемента, он также ингибирует протеазы фибринолитического, свертывающего и кининового путей. Следует отметить, что C1-ингибитор является наиболее важным физиологическим ингибитором калликреина плазмы, FXIa и FXIIa.

1. Получение супернатантной фракции с низким содержанием C1-INH

[0068] Исходный материал, применяемый для получения фракции с высоким содержанием IgG, обычно состоит из супернатанта после адсорбции C1-ингибитора или замороженной плазмы после адсорбции C1-ингибитора, или незамороженной плазмы после адсорбции C1-ингибитора. Иллюстративный образец, например, супернатант плазмы, состоит из адсорбции супернатанта, полученной после адсорбции C1-ингибитора в ходе процесса производства CINRYZE®. Процесс очистки обычно начинают с оттаивания ранее замороженной объединенной плазмы, которая предпочтительно уже была проанализирована с точки зрения безопасности и качества. Оттаивание обычно проводят при температуре не выше 6°C. После полного оттаивания замороженной плазмы при низкой температуре проводят центрифугирование на холоду (например, не более 6°C) для отделения твердых крио-осадков от жидкого супернатанта. В качестве альтернативы, стадию разделения выполняют посредством фильтрации, а не центрифугирования. Жидкий супернатант (также называемый «криосупернатантной плазмой» после удаления холодонерастворимых белков посредством центрифугирования из свежей размороженной плазмы) затем подвергают одной или более стадиям адсорбции для получения промежуточных продуктов для очистки факторов свертывания и ингибиторов белков плазмы. Адсорбция супернатанта, полученная после дозирования C1-ингибитора из криосупернатантной плазмы, также называют дважды обедненной криосупернатантной плазмой (DDCPP).

2. Получение гепаринизированной фракции

[0069] Супернатантная фракция с низким содержанием C1-INH обычно считается не идеальным исходным материалом для производства IgG, поскольку снижение содержания C1-INH обеспечивает накопление калликреина плазмы, фактора XIa и Factor XIIa. Для обеспечения адекватного удаления данных факторов с явно сниженной концентрацией C1-INH, расчетное количество гепарина (5000 Ед./кг DDCPP или 10000 Ед./кг DDCPP) добавляют к супернатантной фракции с низким содержанием C1-INH до начала процесса

спиртового фракционирования. Показано, что конечный полученный продукт IgG содержит остаточные концентрации гепарина менее 1 МЕ/мл.

3. Первое явление осаждения - Модифицированное фракционирование I

[0070] Исходным материалом для фракционирования I был DDCPP (супернатант после адсорбции C1-ингибитора). DDCPP обычно охлаждают до около $0 \pm 2^\circ\text{C}$ и pH регулируют до значения от около 7,0 до около 7,5, предпочтительно от около 7,1 до около 7,3, наиболее предпочтительно около 7,2 посредством добавления кислоты, например, уксусной кислоты. В одном варианте осуществления pH криосупернатантной плазмы регулируют до pH около 7,2. Затем предварительно охлажденный этанол добавляют при перемешивании плазмы до целевой концентрации этанола около 8% об./об или около. В то же время температуру дополнительно снижают до значения от около -2°C до около $+2^\circ\text{C}$. В предпочтительном варианте осуществления температуру снижают до значения $-1,5^\circ\text{C}$ или около, для осаждения загрязняющих веществ, таких как α_2 -макроглобулин, β_{1A} - и β_{1C} -глобулин, фибриноген и фактор VIII. Как правило, явление осаждения будет включать время выдержки менее по меньшей мере около 1 часа, несмотря на то, что также могут быть использованы более короткие или более длительные периоды времени выдержки. Затем супернатант (супернатант I), в идеале содержащий большую часть содержимого IgG, присутствующего в DDCPP, собирают посредством центрифугирования, фильтрования или другого подходящего способа.

[0071] По сравнению с общепринятыми способами, применяемыми в качестве первой стадии фракционирования для криосупернатантной плазмы (Cohn *et al.*, *выше*; Oncley *et al.*, *выше*), в настоящем изобретении в некоторых вариантах осуществления представлены способы, которые обеспечивают улучшенные выходы IgG из фракции супернатанта I. В одном варианте осуществления улучшенного выхода IgG достигают посредством добавления спирта посредством распыления. В другом варианте осуществления улучшенного выхода IgG достигают посредством добавления pH-модифицирующего средства посредством распыления. В другом варианте осуществления улучшенного выхода IgG достигают посредством регулирования pH раствора после добавления спирта. В связанном варианте осуществления улучшенного выхода IgG достигают посредством регулирования pH раствора в ходе добавления спирта.

[0072] В одном конкретном аспекте улучшение относится к способу, в котором уменьшенное количество IgG представляет собой потерю в осажденной фракции на первой стадии осаждения. Например, в определенных вариантах осуществления уменьшенное количество IgG представляет собой потерю в осажденной фракции на первой стадии осаждения по сравнению с количеством IgG, утерянным на первой стадии осаждения протокола способа 6 по Кону.

[0073] В определенных вариантах осуществления улучшение процесса реализовано посредством регулирования pH раствора до значения от около 7,0 до около 7,5 после добавления спирта для осаждения. В других вариантах осуществления pH раствора регулируют до значения от около 7,1 до около 7,3 после добавления спирта для осаждения.

В следующих вариантах осуществления pH раствора регулируют до значения около 7,0 или около 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5 после добавления спирта для осаждения. В конкретном варианте осуществления pH раствора регулируют до значения около 7,2 после добавления спирта для осаждения. Соответственно, в определенных вариантах осуществления уменьшенное количество IgG утеряно в осажженной фракции на первой стадии осаждения по сравнению с аналогичной стадией осаждения, в которой pH раствора регулируют до, но не после добавления спирта для осаждения. В одном варианте осуществления pH поддерживают на необходимом уровне в ходе выдерживания для осаждения или времени инкубации посредством непрерывного регулирования pH раствора. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

[0074] В других определенных вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством добавления спирта для осаждения и/или раствора, применяемого для регулирования pH посредством распыления, а не посредством добавления потоком. Соответственно, в определенных вариантах осуществления уменьшенное количество IgG утеряно в осажженной фракции на первой стадии осаждения по сравнению с аналогичной стадией осаждения, в которой спирт и/или раствор, применяемый для регулирования pH, вводят посредством добавления потоком. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

[0075] В следующих определенных вариантах осуществления улучшение реализуют посредством регулирования pH раствора до значения от около 7,0 до около 7,5. В предпочтительном варианте осуществления pH раствора регулируют до значения от около 7,1 до около 7,3. В других вариантах осуществления pH раствора регулируют до около 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5 после добавления спирта для осаждения и посредством добавления спирта для осаждения и/или раствора, применяемого для регулирования pH посредством распыления, а не посредством добавления потоком. В конкретном варианте осуществления pH раствора регулируют до около 7,2 после добавления спирта для осаждения и посредством добавления спирта для осаждения и/или раствора, применяемого для регулирования pH посредством распыления, а не добавления потоком. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

4. Второе явление осаждения - модифицированное фракционирование II+III

[0076] Для дальнейшего повышения содержания IgG и чистоты фракционирования супернатант I подвергают второй стадии осаждения, которая представляет собой модифицированное фракционирование фракции II+III по Кону-Онкли. В целом, pH раствора регулируют до значения от около 6,6 до около 6,8. В предпочтительном варианте осуществления pH раствора регулируют до около 6,7. Затем в раствор добавляют спирт, предпочтительно этанол, при перемешивании до конечной концентрации от около 20% до около 25% (об./об.) для осаждения IgG во фракции. В предпочтительном варианте осуществления спирт добавляют до конечной концентрации около 25% (об./об.) для осаждения IgG во фракции. В целом, загрязняющие вещества, такие как α_1 -липопротеин, α_1 -антитрипсин, Gc-глобулины, α_{1X} -гликопротеин, гаптоглобулин, церулоплазмин,

трансферрин, гемопексин, фракция плазменный компонент тромбопластина, глобулин сыворотки, связывающий тироксин, холинэстераза, гипертензиноген и альбумин не будут осаждаться при данной температуре.

[0077] До или совместно с добавлением спирта раствор дополнительно охлаждают до температуры от около -7°C до около -9°C . В предпочтительном варианте осуществления раствор охлаждают до температуры около -7°C . После завершения добавления спирта pH раствора немедленно регулируют до значения от около 6,8 до около 7,0. В предпочтительном варианте осуществления pH раствора регулируют до около 6,9. Как правило, явление осаждения будет включать время выдержки менее по меньшей мере около 10 часов, несмотря на то, что также могут быть использованы более короткие или более длительные периоды времени выдержки. Затем осадок (модифицированная фракция II+III), которая в идеале содержит по меньшей мере около 85%, предпочтительно по меньшей мере около 90%, более предпочтительно по меньшей мере около 95% содержания IgG, присутствующего в криосупернатантной плазме, отделяют от супернатанта посредством центрифугирования, фильтрации или другого подходящего способа и собирают. По сравнению с общепринятыми способами, применяемыми в качестве стадии второго фракционирования для криосупернатантной плазмы (Cohn *et al.*, *выше*; Oncley *et al.*, *выше*), в настоящем изобретении в некоторых вариантах осуществления представлены способы, которые обеспечивают улучшенные выходы IgG в осадке модифицированной фракции II+III. В связанном варианте осуществления настоящего изобретения представлены способы, которые обеспечивают сниженную потерю IgG в модифицированном супернатанте II+III.

[0078] По сравнению с общепринятыми способами, применяемыми в качестве стадии второго фракционирования для криосупернатантной плазмы (Cohn *et al.*, *выше*; Oncley *et al.*, *выше*), в настоящем изобретении в некоторых вариантах осуществления представлены способы, которые обеспечивают улучшенные выходы IgG в осадке модифицированной фракции II+III. В одном варианте осуществления улучшение реализуют посредством добавления спирта посредством распыления. В другом варианте осуществления улучшение реализуют посредством добавления pH-модифицирующего средства посредством распыления. В другом варианте осуществления улучшение реализуют посредством регулирования pH раствора после добавления спирта. В связанном варианте осуществления улучшение реализуют посредством регулирования pH раствора в ходе добавления спирта. В другом варианте осуществления улучшение реализуют посредством повышения концентрации спирта (*например*, этанола) до около 25% (об./об.). В другом варианте осуществления улучшение реализуют посредством снижения температуры стадии осаждения до температуры от около -7°C до около -9°C . В предпочтительном варианте осуществления улучшение реализуют посредством повышения концентрации спирта (*например*, этанола) до около 25% (об./об.) и снижения температуры до значения от около -7°C до около -9°C . Для сравнения, как в Cohn *et al.*, так и в Oncley *et al.* осаждение осуществляют при температуре -5°C , при этом в Oncley *et al.*

применяют 20% спирта с целью снижения уровня загрязняющих веществ в осадке. Преимущественно, способы, представленные в данном документе, обеспечивают максимальный выход IgG без высоких уровней загрязнения конечного продукта.

[0079] Было обнаружено, что если перед добавлением осаждающего спирта pH раствора регулируют до около 6,9, pH раствора сдвигается от 6,9 до значения от около 7,4 до около 7,7, частично вследствие осаждения белка. По мере того, как pH раствора сдвигается от 6,9, осаждение IgG становится менее благоприятным, а осаждение некоторых загрязняющих веществ становится более благоприятным. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что при регулировании pH раствора после добавления осаждающего спирта в осадке фракции II+III извлекается более высокий процент IgG.

[0080] В различных вариантах осуществления улучшение, реализуемое посредством настоящего изобретения, связано со способом, в котором сниженное количество IgG утеряно в супернатантной фракции на стадии осаждения модифицированной фракции II+III по сравнению с идентичным способом, в котором улучшение настоящего изобретения не включено. Другими словами повышенный процент исходного IgG присутствует в осадке фракции II+III. В определенных вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством регулирования pH раствора до значения от около 6,7 до около 7,1 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения. В некоторых вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством поддержания pH раствора от около 6,7 до около 7,1 непрерывно в ходе периода осаждения и/или инкубации. В некоторых вариантах осуществления pH раствора регулируют до значения от около 6,8 до около 7,0 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения, или до pH около 6,7, 6,8, 6,9, 7,0 или 7,1 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения. В конкретном варианте осуществления pH раствора регулируют до около 6,9 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения. В определенных вариантах осуществления pH раствора поддерживают на значении от около 6,8 до около 7,0 непрерывно в ходе периода осаждения и инкубации, или при pH около 6,9 непрерывно в ходе периода осаждения и инкубации. Применение параметров процесса по настоящему изобретению в определенных вариантах осуществления уменьшенное количество IgG утеряно в супернатантной фракции второй стадии осаждения по сравнению с аналогичной стадией осаждения, в которой pH раствора регулируют до, но не после добавления спирта для осаждения, или с аналогичной стадией осаждения, в которой pH раствора не поддерживают в ходе всего периода осаждения и инкубации. В одном варианте осуществления pH поддерживают на необходимом уровне в ходе выдерживания для осаждения или времени инкубации посредством непрерывного регулирования pH раствора. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

[0081] В некоторых вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством добавления спирта для осаждения и/или раствора, применяемого для регулирования pH посредством распыления, а не добавления потоком. Соответственно, в определенных вариантах осуществления уменьшенное количество IgG утеряно в

супернатантной фракции на второй стадии осаждения по сравнению с аналогичной стадией осаждения, в которой спирт и/или раствор, применяемый для регулирования pH, вводят посредством порционного добавления потоком. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

[0082] В другом варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством осуществления стадии осаждения при температуре от около -7°C до около -9°C . В одном варианте осуществления стадию осаждения осуществляют при температуре около -7°C . В одном иллюстративном варианте осуществления стадию осаждения осуществляют при температуре около -8°C . В различных вариантах осуществления стадию осаждения осуществляют при температуре около -9°C . В определенных вариантах осуществления концентрация спирта на стадии осаждения составляет от около 23% до около 27%. В предпочтительном варианте осуществления концентрация *is* спирта составляет от около 24% до около 26%. В одном иллюстративном варианте осуществления концентрация спирта составляет около 25%. В некоторых вариантах осуществления концентрация спирта может составлять 23%, 24%, 25%, 26% или 27%, или около. В одном иллюстративном варианте осуществления вторую стадию осаждения осуществляют при температуре -7°C или около при концентрации спирта около 25%. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

[0083] Эффект увеличения концентрации спирта во втором осаждении с 20%, как это было использовано в Oncley *et al.*, *выше*, до 25% и снижения температуры инкубации -5°C , как это было использовано в способах по Кону и Онкли, до около -7°C заключается в неожиданном повышении содержания IgG в осадке модифицированной фракции II+III на 5-6%.

[0084] В другом варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством регулирования pH раствора до значения от около 6,7 до около 7,1, предпочтительно до значения 6,9 или около, сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения, поддерживая pH раствора на значении от около 6,7 до около 7,1, предпочтительно при 6,9 или около, посредством непрерывного регулирования pH в ходе периода осаждения и инкубации, и посредством добавления спирта для осаждения и/или раствора, применяемого для регулирования pH посредством распыления, а не посредством добавления потоком.

[0085] В одном иллюстративном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством осуществления стадии осаждения при температура от около -7°C до около -9°C , например, -7°C и посредством осаждения IgG с концентрацией спирта от около 23% до около 27%, например, 25%. В различных вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством введения всех улучшений модифицированной фракции II+III, представленных выше, в процесс. В одном иллюстративном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством осаждения IgG при температуре -7°C с 25% этанола, добавленного посредством распыления, а затем регулирования pH раствора до 6,9 после добавления спирта для осаждения. В другом

предпочтительном варианте осуществления pH раствора поддерживают на значении 6,9 в течение всего времени осаждения, инкубации или удержания.

5. Экстракция осадка модифицированной фракции II+III

[0086] Для солубилизации IgG, содержащегося в осадке модифицированной фракции II+III, для повторного суспендирования осадка фракционирования II+III используют холодный буфер для экстракции в соотношении примерно 1 часть осадка на около 15 частей буфера для экстракции. Можно использовать другие подходящие соотношения повторного суспендирования, например, от около 1:8 до около 1:30, например, от около 1:10 до около 1:20, от около 1:12 до около 1:18, от около 1:13 до около 1:17, от около 1:14 до около 1:16. В определенных вариантах осуществления соотношение повторного суспендирования может составлять 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 более.

[0087] Подходящие растворы для экстракции модифицированного осадка II+III обычно имеют pH от около 4,0 до около 5,5. В определенных вариантах осуществления раствор имеет pH от около 4,5 до около 5,0. В некоторых вариантах осуществления раствор для экстракции имеет pH около 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 или 5,5. В одном иллюстративном варианте осуществления pH экстракционного буфера составляет около 4,5. В одном иллюстративном варианте осуществления pH экстракционного буфера составляет около 4,7. В одном иллюстративном варианте осуществления pH экстракционного буфера будет составлять около 4,9. Как правило, данные требования к pH могут быть удовлетворены с использованием буферного средства, выбранного, например, из ацетата, цитрата, одноосновного фосфата, двухосновного фосфата, их смесей и т.п. Подходящие концентрации буфера обычно варьируют от около 5 до около 100 мМ, или от около 10 до около 50 мМ, или около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, или 100 мМ буферного средства.

[0088] Иллюстративные экстракционные буферы имеют проводимость от около 0,5 мСм/см⁻¹ до около 2,0 мСм/см⁻¹. Например, в определенных вариантах осуществления проводимость экстракционного буфера составляет около 0,5 мСм/см⁻¹, или около 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 около 2,0 мСм/см⁻¹. Специалисту в данной области техники известно, как создавать экстракционные буферы, имеющие соответствующую проводимость.

[0089] В одном конкретном варианте осуществления иллюстративный экстракционный буфер может содержать примерно 5 мМ одноосновного фосфата натрия и примерно 5 мМ ацетата при pH около $4,5 \pm 0,2$ и проводимости около 0,7-0,9 мСм/см.

[0090] В целом, экстракцию осуществляют при температуре от около 0°C до около 10°C или от около 2°C до около 8°C. В определенных вариантах осуществления экстракцию можно осуществлять при температуре около 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C. В одном иллюстративном варианте осуществления экстракцию осуществляют при температуре от около 2°C до около 10°C. Как правило, процесс экстракции будет проходить в течение от около 60 до около 300 минут, или в течение от около 120 до около

240 мин., или от около 150 до около 210 мин. при непрерывном перемешивании суспензии. В определенных вариантах осуществления процесс экстракции будет проходить в течение 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 около 300 мин. В предпочтительном варианте осуществления процесс экстракции будет проходить в течение по меньшей мере около 160 мин. при непрерывном перемешивании.

[0091] Было обнаружено, что в способах с использованием экстракционного буфера, содержащего 5 мМ одноосновного фосфата натрия, 5 мМ ацетата и от 0,051% до 0,06% ледяной уксусной кислоты (об./об.), существенное увеличение выхода в конечной композиции IgG может быть получено без ущерба для чистоты конечного продукта. В предпочтительном варианте осуществления осадок фракции II+III экстрагируют пастой до отношения буфера 1:15 или около при pH $4,5 \pm 0,2$ или около.

[0092] Преимущественно, было обнаружено, что по сравнению с существующим в настоящее время процессом производства GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare), в котором используют экстракционный буфер, содержащий 5 мМ одноосновного фосфата натрия, 5 мМ ацетата и 0,051% ледяной уксусной кислоты (об./об.), посредством повышения содержания ледяной уксусной кислоты до 0,06% (об./об.) или около можно получить существенное увеличение выхода конечной композиции IgG. По сравнению со способами, ранее использовавшимися для экстракции осадка, образованного на второй стадии осаждения (GAMMAGARD® LIQUID), в настоящем изобретении в нескольких вариантах осуществления представлены способы, которые приводят к повышению выхода IgG в суспензии модифицированной фракции II+III.

[0093] В одном варианте осуществления улучшение относится к способу, в котором уменьшенное количество IgG утеряно в нерастворимой фракции осадка модифицированной фракции II+III. В одном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством экстракции осадка модифицированной фракции II+III с соотношением 1:15 (осадка к буферу) раствором, содержащим 5 мМ одноосновного фосфата натрия, 5 мМ ацетата и 0,06% ледяной уксусной кислоты (об./об.). В другом варианте осуществления улучшение реализуют посредством поддержания pH раствора относительно постоянным в ходе процесса экстракции. В одном варианте осуществления pH раствора поддерживают на значении от около 4,1 до около 4,9 в ходе процесса экстракции. В одном иллюстративном варианте осуществления pH раствора поддерживают на значении от около 4,2 до около 4,8 в ходе процесса экстракции. В некоторых вариантах осуществления pH раствора поддерживают на значении от около 4,3 до около 4,7 в ходе процесса экстракции. В различных вариантах осуществления pH раствора поддерживают на значении от около 4,4 до около 4,6 в ходе процесса экстракции. В некоторых вариантах осуществления pH раствора поддерживают на значении 4,5 в ходе процесса экстракции.

[0094] В одном иллюстративном варианте осуществления улучшение относится к способу, в котором повышенное количество IgG солюбилизируют из осадка фракции II+III на стадии растворения фракции II+III. В одном варианте осуществления улучшение

процесса реализуют посредством солюбилизации осадка фракции II+III в буфере для растворения, содержащем около 600 мл ледяной уксусной кислоты на около 1000 л. В другом варианте осуществления улучшение относится к способу, в котором количество примесей снижается после солюбилизации IgG в осадке фракции II+III. В одном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством смешивания мелкодисперсного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией фракции II+III в течение по меньшей мере около 30 минут.

6. Предварительная обработка и фильтрация суспензии модифицированной фракции II+III

[0095] С целью улучшения несолюбилизированной фракции осадка модифицированной фракции II+III (*т.е.*, осадка на фильтре модифицированной фракции II+III) суспензию фильтруют, обычно с использованием глубоинной фильтрации. Глубинные фильтры, которые можно применять в способах, представленных в настоящем документе, включают металлические, стеклянные, керамические, органические (такие как диатомовая земля) глубинные фильтры и т.п. Пример подходящих фильтров включает без ограничения фильтры Cuno 50SA, Cuno 90SA и Cuno VR06 (Cuno). В качестве альтернативы, стадию разделения можно осуществлять посредством центрифугирования, а не фильтрации.

[0096] Несмотря на то, что описанные выше усовершенствования производственного процесса сводят к минимуму потери IgG на начальных стадиях процесса очистки, критические примеси, в том числе активность РКА, амидолитическая активность и содержание фибриногена, намного выше, если, например, пасту II+III экстрагируют при pH 4,5 или 4,6 по сравнению с тем, когда экстракцию осуществляют при pH от 4,9 до 5,0.

[0097] В настоящее время обнаружено, что для уменьшения примесей, экстрагируемых в способах, представленных в настоящем документе, чистота композиции IgG может быть значительно повышена за счет добавления стадии предварительной обработки перед фильтрацией/центрифугированием. В одном варианте осуществления данная стадия предварительной обработки включает добавление частиц мелкодисперсного диоксида кремния (*например*, коллоидного диоксида кремния, Aerosil®). В одном иллюстративном варианте осуществления после данной обработки следует период инкубации 40-80 минут, при котором суспензия постоянно перемешивается. В определенных вариантах осуществления период инкубации составляет от около 50 мин. до около 70 мин. В различных вариантах осуществления период инкубации составляет около 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 минут или более. В целом, обработку будут осуществлять при температуре от около 0°C до около 10°C, или от около 2°C до около 8°C. В определенных вариантах осуществления экстракцию можно осуществлять при температуре около 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 осуществления обработку осуществляют при температуре от около 2°C до около 10°C.

[0098] Обработка коллоидным диоксидом кремния проиллюстрирована в WO2011150284A2. В данной заявке на патент осадок фракции II+III суспендируют и разделяют на два образца, один из которых осветляют с использованием фильтрующего материала только перед фильтрацией, а другой обрабатывают коллоидным диоксидом кремния перед добавлением фильтрующего материала и фильтрации. Как видно из хроматографических и количественных данных, образец фильтрата, предварительно обработанный коллоидальным диоксидом кремния, имел гораздо более высокую чистоту IgG, чем образец, обработанный только вспомогательным фильтрующим средством.

[0099] В определенных вариантах осуществления коллоидный диоксид кремния добавляют в концентрации от около 20 г/кг пасты II+III до около 100 г/кг пасты II+III (например, осадка модифицированной фракции II+III, который экстрагируют в соотношении 1:15, коллоидный диоксид кремния необходимо добавлять в концентрации от около 20 г/16 кг суспензии II+III до около 100 г/16 кг суспензии II+III, или в конечной концентрации около 0,125% (вес/вес) до около 0,625% (вес/вес)). В определенных вариантах осуществления коллоидный диоксид кремния можно добавлять в концентрации около 20 г/кг пасты II+III, или около 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 осуществления коллоидный диоксид кремния (например, Aerosil 380 или эквивалент) добавляют к суспензии модифицированной фракции II+III до конечной концентрации около 40 г/16 кг II+III. Смешивание происходит при температуре от около 2 до около 8°C в течение по меньшей мере от около 50 до около 70 мин.

[00100] В определенных вариантах осуществления SiO₂ добавляют к композиции IgG при концентрации от около 0,01 г/г белка до около 10 г/г белка. В другом варианте осуществления SiO₂ добавляют к композиции IgG в концентрации от около 0,01 г/г белка до около 5 г/г белка. В другом варианте осуществления SiO₂ добавляют к композиции IgG в концентрации от около 0,02 г/г белка до около 4 г/г белка. В одном варианте осуществления SiO₂ добавляют в конечной концентрации по меньшей мере 0,1 г на грамм общего белка. В другом конкретном варианте осуществления коллоидный диоксид кремния добавляют в концентрации по меньшей мере 0,2 г на грамм общего белка. В другом конкретном варианте осуществления коллоидный диоксид кремния добавляют в концентрации по меньшей мере 0,25 г на грамм общего белка. В других конкретных вариантах осуществления коллоидный диоксид кремния добавляют в концентрации по меньшей мере 1 г на грамм общего белка. В другом конкретном варианте осуществления коллоидный диоксид кремния добавляют в концентрации по меньшей мере 2 г на грамм общего белка. В другом конкретном варианте осуществления коллоидный диоксид кремния добавляют в концентрации по меньшей мере 2,5 г на грамм общего белка. В других конкретных вариантах осуществления мелкодисперсный диоксид кремния добавляют в концентрации по меньшей мере 0,01 г/г общего белка или по меньшей мере 0,02 г, 0,03 г, 0,04 г, 0,05 г, 0,06 г, 0,07 г, 0,08 г, 0,09 г, 0,1 г, 0,2 г, 0,3 г, 0,4 г, 0,5 г, 0,6 г, 0,7 г, 0,8 г, 0,9 г, 1,0 г, 1,5 г, 2,0 г, 2,5 г, 3,0 г, 3,5 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г,

9,0 г, 9,5 г, 10,0 г или более на грамм общего белка.

[00101] В определенных вариантах осуществления фильтрующая добавка, например Celpure C300 (Celpure) или Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), добавляют после обработки диоксидом кремния для облегчения глубинной фильтрации. Фильтрующую добавку можно добавлять в конечной концентрации от около 0,01 кг/кг пасты II+III до около 1,0 кг/кг пасты II+III, или от около 0,02 кг/кг пасты II+III до около 0,8 кг/кг пасты II+III, или от около 0,03 кг/кг пасты II+III до около 0,7 кг/кг пасты II+III. В других вариантах осуществления фильтрующую добавку можно добавлять в конечной концентрации от около 0,01 кг/кг пасты II+III до около 0,07 кг/кг пасты II+III, или от около 0,02 кг/кг пасты II+III до около 0,06 кг/кг пасты II+III, или от около 0,03 кг/кг пасты II+III до около 0,05 кг/кг пасты II+III. В определенных вариантах осуществления фильтрующую добавку будут добавлять в конечной концентрации около 0,01 кг/кг пасты II+III, или около 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 кг/кг пасты II+III.

[00102] В предыдущих способах очистки IgG значительная фракция IgG была утеряна в ходе стадии фильтрации указанного процесса. Установлено, что стандартные способы постфильтрационной промывки с использованием 1,8 мертвых объемов суспензионного буфера для очистки рам и линий фильтр-пресса недостаточны для максимального извлечения IgG на данной стадии. Неожиданно было обнаружено, что по меньшей мере 3,0 мертвых объема, например, 3,6 мертвых объемов суспензионного буфера были полезны для эффективного извлечения IgG в осветленной суспензии модифицированной фракции II+III. В определенных вариантах осуществления фильтр-пресс промывают любым подходящим суспензионным буфером. В одном иллюстративном варианте осуществления промывочный буфер будет содержать, например, 5 мМ одноосновного фосфата натрия, 5 мМ ацетата и 0,015% ледяной уксусной кислоты (об./об.).

[00103] В одном варианте осуществления улучшение относится к способу, в котором сниженное количество IgG утеряно в ходе стадии фильтрации суспензии фракции II+III. В одном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством последующей промывки фильтра с использованием по меньшей мере около 3,6 мертвых объемов буфера для растворения, содержащего 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л. В одном варианте осуществления pH экстракционного буфера для последующей промывки составляет от около 4,6 до около 5,3. В предпочтительном варианте осуществления pH промывочного буфера для последующей промывки составляет от около 4,7 до около 5,2. В другом предпочтительном варианте осуществления pH промывочного буфера для последующей промывки составляет от около 4,8 до около 5,1. В другом предпочтительном варианте осуществления pH промывочного буфера для последующей промывки составляет от около 4,9 до около 5,0.

[00104] По сравнению со способами, ранее использовавшимися для осветления суспензии, полученной на второй стадии осаждения, в настоящем изобретении в нескольких вариантах осуществления представлены способы, которые обеспечивают

повышение выхода IgG и повышение чистоты в осветленной суспензии фракции II+III. В одном аспекте улучшение относится к способу, в котором уменьшенное количество IgG утеряно в осадке на фильтре модифицированной фракции II+III. В другом аспекте улучшение относится к способу, в котором в осветленной суспензии фракции II+III обнаруживается уменьшенное количество примеси.

[00105] В одном варианте осуществления улучшения процесса реализуют посредством включения обработки коллоидным диоксидом кремния перед фильтрацией или очисткой в центрифуге суспензии фракции II+III. В определенных вариантах осуществления обработка коллоидным диоксидом кремния будет включать добавление от около 0,01 кг/кг пасты II+III до около 0,07 кг/кг пасты II+III, или от около 0,02 кг/кг пасты II+III до около 0,06 кг/кг пасты II+III, или от около 0,03 кг/кг пасты II+III до около 0,05 кг/кг пасты II+III, или около 0,02 кг/кг пасты II+III, 0,03 кг/кг пасты II+III, 0,04 кг/кг пасты II+III, 0,05 кг/кг пасты II+III, 0,06 кг/кг пасты II+III, 0,07 кг/кг пасты II+III, 0,08 кг/кг пасты II+III, 0,09 кг/кг пасты II+III, или 0,1 кг/кг пасты II+III, и смесь будут инкубировать в течение от около 50 мин. до около 70 мин., или около 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 минут или более при температуре от около 2°C до около 8°C. В другом варианте осуществления улучшения процесса реализуют посредством включения обработки коллоидным диоксидом кремния, которая обеспечивает снижение уровней остаточного фибриногена, амидолитической активности и/или активности активации прекалликреина. В конкретном варианте осуществления улучшения процесса реализуют посредством включения обработки коллоидным диоксидом кремния, которая обеспечивает снижение уровней FXI, FXIa, FXII и FXIIa в препарате иммуноглобулина.

[00106] В другом варианте осуществления улучшения процесса реализуют посредством промывки глубинного фильтра с использованием от около 3 до около 5 мертвого объема фильтра после завершения стадии фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III. В определенных вариантах осуществления фильтр промывают с использованием от около 3,5 объемов до около 4,5 объемов, или по меньшей мере около 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 объемов мертвого объема фильтра. В конкретном варианте осуществления фильтр-пресс промывают с использованием по меньшей мере около 3,6 мертвых объемов суспензионного буфера.

7. Обработка моющим средством

[00107] С целью удаления дополнительных примесей из модифицированного фильтра фракции II+III образец затем подвергают обработке моющим средством. Способы обработки моющим средством фракций, полученных из плазмы, хорошо известны в данной области. В целом, любая стандартная обработка неионным моющим средством может быть использована в сочетании со способами, представленными в настоящем документе. Например, иллюстративный протокол для обработки моющим средством представлен ниже.

[00108] Вкратце, в одном иллюстративном варианте осуществления моющее

средство, например, полисорбат-80, добавляют к фильтрату модифицированной фракции II+III в конечной концентрации около 0,2% (вес/об.) при перемешивании и образец инкубируют в течение по меньшей мере около 30 мин. при температуре от около 2°C до около 8°C. Затем к раствору подмешивают обезвоженный цитрат натрия до конечной концентрации около 8 г/л и образец инкубируют в течение еще 30 мин. при непрерывном перемешивании при температуре от около 2 до 8°C.

[00109] В определенных вариантах осуществления применяют любое подходящее неионогенное моющее средство. Примеры подходящих неионных моющих средств включают без ограничения октилглюкозид, дигитонин, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (*т.е.*, полисорбит-20), Tween-80 (*т.е.*, полисорбат-80), алкил поли(этиленоксид), моющее средство Brij, алкилфенол поли(этиленоксид), полоксамер, октилглюкозид, децилмальтозид и т.п.

[00110] В одном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством добавления моющих реагентов (*например*, полисорбат-80 и дегидрат цитрата натрия) посредством распыления, а не посредством добавления потоком. В других вариантах осуществления моющие реагенты можно добавлять в виде твердых веществ к фильтрату модифицированной фракции II+III при перемешивании образца для обеспечения быстрого распределения добавок. В определенных вариантах осуществления предпочтительным является добавление твердых реагентов посредством орошения твердых веществ по делокализованной площади поверхности фильтрата, локальная избыточная концентрация не возникает, как при добавлении потоком.

8. Третье явление осаждения - осаждение G

[00111] В иллюстративных вариантах осуществления с целью удаления нескольких остаточных малых белков, например, альбумина и трансферрина, третье осаждение осуществляют в концентрации 25% спирта. В кратце, pH обработанного моющим средством фильтрата II+III регулируют до значения от около 6,8 до около 7,2, например, от около 6,9 до около 7,1, например, около 7,0 с использованием подходящего pH-модифицирующего раствора (*например*, 1 М гидроксида натрия или 1 М уксусной кислоты). Затем к раствору добавляют спирт до конечной концентрации около 25% (об./об.) и смесь инкубируют при перемешивании при температуре от около -6°C до около -10°C в течение по меньшей мере 1 часа с образованием третьего осадка (*т.е.*, осадка G). В одном варианте осуществления смесь инкубируют в течение по меньшей мере 2 ч., 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 ч. или более. В предпочтительном варианте осуществления смесь инкубируют в течение по меньшей мере 2 ч. В одном иллюстративном варианте осуществления смесь инкубируют в течение по меньшей мере 4 ч. В некоторых вариантах осуществления смесь инкубируют в течение по меньшей мере 8 ч.

[00112] В одном варианте осуществления улучшение процесса по настоящему изобретению относится к способу, в котором сниженное количество IgG утеряно в супернатантной фракции на третьей стадии осаждения. В определенных вариантах

осуществления улучшение процесса реализую посредством регулирования pH раствора до значения от около 6,8 до около 7,2 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения. В другом варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством поддержания pH раствора на значении от около 6,8 до около 7,2 непрерывно в ходе периода осаждения и инкубации. В некоторых вариантах осуществления pH раствора регулируют до значения от около 6,9 до около 7,1 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения, или до pH около 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 или 7,2 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения. В конкретном варианте осуществления pH раствора регулируют до около 7,0 сразу после или в ходе добавления спирта для осаждения. В определенных вариантах осуществления pH раствора поддерживают на значении от около 6,9 до около 7,1 непрерывно в ходе периода осаждения и инкубации, или при pH около 7,0 непрерывно в ходе периода осаждения и инкубации. В соответствии с улучшенным способом, в определенных вариантах осуществления сниженное количество IgG утеряно в супернатантной фракции на третьей стадии осаждения по сравнению с аналогичной стадией осаждения, в которой pH раствора регулируют до, но не после добавления спирта для осаждения, или аналогичной стадией осаждения, в которой pH раствора не поддерживают в ходе всего периода осаждения и инкубации. В одном варианте осуществления pH поддерживают на необходимом уровне в ходе выдерживания для осаждения или времени инкубации посредством непрерывного регулирования pH раствора. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

[00113] В некоторых вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством добавления спирта для осаждения и/или раствора, применяемого для регулирования pH посредством распыления, а не порционного добавления потоком. Соответственно, в определенных вариантах осуществления уменьшенное количество IgG утеряно в супернатантной фракции на третьей стадии осаждения по сравнению с аналогичной стадией осаждения, в которой спирт и/или раствор, применяемый для регулирования pH, вводят посредством добавления потоком. В одном варианте осуществления спирт представляет собой этанол.

9. Суспензия и фильтрация осадка G (PptG)

[00114] С целью растворения IgG, содержащегося в осадке G, для ресуспендирования PptG используют холодный экстракционный буфер. Вкратце, осадок G растворяют от 1 до 3,5 в воде для инъекций (WFI) при температуре от около 0°C до около 8°C для достижения значения AU₂₈₀₋₃₂₀ от около 40 до 95. Конечный pH раствора, который перемешивают в течение менее 2 часов, затем регулируют до около $5,2 \pm 0,2$. В одном варианте осуществления данное регулирование pH осуществляют с использованием 1 М уксусной кислоты. Для повышения растворимости IgG проводимость суспензии повышают от около 2,5 до около 6,0 мСм/см. В одном варианте осуществления проводимость повышают посредством добавления хлорида натрия. Затем взвешенный раствор PptG фильтруют с использованием подходящего глубинного фильтра с номинальным размером пор от около 0,1 мкм до около 0,4 мкм для удаления любых нерастворенных частиц. В

одном варианте осуществления номинальный размер пор глубинного фильтра составляет около 0,2 мкм (*например*, фильтр Cuno VR06 или аналогичный) для получения осветленного фильтрата. В другом варианте осуществления суспендированный раствор PptG центрифугируют для восстановления очищенного супернатанта. Последующая промывка фильтра с использованием раствора хлорида натрия с проводимостью от около 2,5 до около 6,0 мСм/см. Как правило, подходящие растворы для экстракции осадка G включают WFI и буферы с низкой проводимостью. В одном варианте осуществления буфер с низкой проводимостью имеет проводимость менее около 10 мСм/см. В предпочтительном варианте осуществления буфер с низкой проводимостью имеет проводимость менее около 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мСм/см. В предпочтительном варианте осуществления буфер с низкой проводимостью имеет проводимость менее около 6 мСм/см. В другом варианте осуществления буфер с низкой проводимостью имеет проводимость менее около 4 мСм/см. В другом варианте осуществления буфер с низкой проводимостью имеет проводимость менее около 2 мСм/см.

10. Обработка растворяющим моющим средством

[00115] С целью инактивации различных вирусных загрязняющих веществ, которые могут присутствовать в продуктах, полученных из плазмы, очищенный фильтрат PptG затем подвергают обработке растворяющим моющим средством (S/D). Способы обработки моющим средством полученных из плазмы фракций хорошо известны в данной области (обзор см. в, Pelletier JP *et al.*, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(1):205-42). Как правило, любую стандартную обработку S/D можно применять в сочетании со способами, представленными в настоящем документе. Иллюстративный протокол для обработки S/D представлен ниже.

[00116] Вкратце, в осветленный фильтрат PptG добавляют Triton X-100, Tween-20 и три(н-бутил)фосфат (TNBP) в конечных концентрациях около 1,0%, 0,3% и 0,3%, соответственно. Затем смесь перемешивают при температуре от около 18°C до около 25°C в течение по меньшей мере около часа.

[00117] В одном варианте осуществления улучшение процесса реализуют посредством добавления реагентов S/D (*например*, Triton X-100, Tween-20, и TNBP) путем распыления, а не порционного добавления потоком. В других вариантах осуществления моющие реагенты можно добавлять в виде твердых веществ в очищенный фильтрат PptG, который перемешивают для обеспечения быстрого распределения компонентов S/D. В определенных вариантах осуществления предпочтительным является добавление твердых реагентов посредством орошения твердых веществ по делокализованной площади поверхности фильтрата, локальная избыточная концентрация не возникает, как при добавлении потоком.

11. Ионообменная хроматография

[00118] Для дальнейшей очистки и концентрирования IgG из обработанного S/D фильтрата PptG можно использовать катионообменную и/или анионообменную хроматографию. Способы очистки и концентрирования IgG с использованием

ионообменной хроматографии хорошо известны в данной области. Например, в Патенте США № 5886154 описан способ, в котором осадок фракции II+III экстрагируют при низком pH (от около 3,8 до 4,5), с последующим осаждением IgG с использованием каприловой кислоты и, наконец, осуществлением двух стадий анионообменной хроматографии. В патенте США № 6069236 описана схема хроматографической очистки IgG, которая вообще не основана на осаждении спиртом. В публикации РСТ № WO 2005/073252 описан способ очистки IgG, включающий экстракцию осадка фракции II+III, обработку каприловой кислотой, обработку ПЭГ и единственную стадию анионообменной хроматографии. В патенте США № 7186410 описан способ очистки IgG, включающий экстракцию либо осадка фракции I+II+III, либо фракции II с последующей единственной стадией анионообмена, проводимой при щелочном pH. В патенте США № 7553938 описан способ, включающий экстракцию осадка фракции I+II+III или фракции II+III, обработку каприлатом и либо одну, либо две стадии анионообменной хроматографии. В патенте США № 6093324 описан способ очистки, включающий использование макропористой анионообменной смолы, работающей при pH от около 6,0 до около 6,6. В патенте США № 6835379 описан способ очистки, основанный на катионообменной хроматографии в отсутствие спиртового фракционирования. Описание вышеупомянутых публикаций настоящим включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00119] В одном варианте осуществления способов по настоящему изобретению обработанный S/D фильтрат PptG можно подвергать как катионообменной хроматографии, так и анионообменной хроматографии. Например, в одном варианте осуществления обработанный S/D фильтрат PptG пропускают через катионообменную колонку, которая связывает IgG в растворе. Затем реагенты S/D можно отмыть от абсорбированного IgG, который затем элюируют с колонки элюирующим буфером с высоким pH, имеющим pH около 8,0 и 9,0. Таким образом, стадию катионообменной хроматографии можно использовать для удаления реагентов S/D из препарата, концентрирования раствора, содержащего IgG, или для того и другого. В определенных вариантах осуществления элюирующий буфер с высоким pH может иметь pH от около 8,2 до около 8,8, или от около 8,4 до около 8,6, или pH около 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В предпочтительном варианте осуществления pH элюирующего буфера составляет около $8,5 \pm 0,1$.

[00120] В определенных вариантах осуществления pH элюата из катионообменной колонки можно регулировать до более низкого значения, например, от около 5,5 до около 6,5, и разбавить соответствующим буфером для уменьшения проводимости раствора. В определенных вариантах осуществления pH катионообменного элюата можно регулировать до pH от около 5,7 до около 6,3, или от около 5,9 до около 6,1, или pH около 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5. В предпочтительном варианте осуществления pH элюата регулируют до pH около $6,0 \pm 0,1$. Затем элюат загружают в анионообменную колонку, которая связывает несколько загрязняющих веществ,

обнаруженных в препарате. Поток через колонку, содержащий фракцию IgG, собирают во время загрузки и промывки колонки. В определенных вариантах осуществления стадии ионообменной хроматографии по настоящему изобретению можно проводить в колоночном режиме, периодическом режиме или в их комбинации.

[00121] В определенных вариантах осуществления улучшение процесса реализуют посредством добавления раствора, используемого для регулирования pH, с использованием распыления, а не порционного добавления потоком.

12. Нанофильтрация и ультра/диафильтрация

[00122] Для дальнейшего снижения вирусной нагрузки композиции IgG, представленной в настоящем документе, анионообменную жидкость, вытекающую из колонки, в некоторых вариантах осуществления подвергают нанофильтрации с использованием подходящего устройства для нанофильтрации. В определенных вариантах осуществления устройство для нанофильтрации имеет средний размер пор от около 15 нм до около 200 нм. Примеры нанофильтров, подходящих для данного применения включают без ограничения DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, и 75N (Planova). В конкретном варианте осуществления нанофильтр может иметь средний размер пор от около 15 нм до около 72 нм, или от около 19 нм до около 35 нм, или около 15 нм, 19 нм, 35 нм или 72 нм. В предпочтительном варианте осуществления нанофильтр будет иметь средний размер пор около 35 нм, такой как фильтр Asahi PLANOVA 35N или его аналог.

[00123] Необязательно, ультрафильтрацию/диафильтрацию можно осуществлять для дополнительного концентрирования нанофильтрата. В одном варианте осуществления мембрану с открытым каналом применяют со специально разработанной рецептурой после промывки и ближе к концу производственный процесс обеспечивает в два раза большую концентрацию белка в полученной композиции IgG (200 мг/мл) по сравнению с современными IVIG (*например*, GAMMAGARD® LIQUID) без негативного влияния на выход или стабильность при хранении. С большинством имеющихся в продаже мембран для ультрафильтрации концентрация IgG 200 мг/мл не может быть достигнута без больших потерь белка. Данные мембраны будут заблокированы на ранней стадии, поэтому трудно добиться адекватной последующей промывки. Поэтому необходимо использовать конфигурации мембран с открытым каналом. Даже с мембранами с открытым каналом необходимо использовать специально разработанную процедуру последующей промывки для получения требуемой концентрации без значительной потери белка (потеря менее 2%). Еще более неожиданным является тот факт, что более высокая концентрация белка 200 мг/мл не снижает инактивационную способность вируса на стадии хранения с низким pH.

[00124] После нанофильтрации фильтрат может быть дополнительно сконцентрирован посредством ультрафильтрации/диафильтрации. В одном варианте осуществления нанофильтрат концентрируют посредством ультрафильтрации до концентрации белка от около 2% до около 10% (вес/об.). В определенных вариантах осуществления ультрафильтрацию проводят в кассете с экраном с открытым каналом, а

ультрафильтрационная мембрана имеет номинальную отсечку по молекулярной массе (NMWCO) менее около 100 кДа или менее около 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 или менее кДа. В предпочтительном варианте осуществления мембрана для ультрафильтрации имеет NMWCO не более 50 кДа.

[00125] После завершения стадии ультрафильтрации концентрат может быть дополнительно сконцентрирован посредством диафильтрации относительно раствора, пригодного для внутривенного или внутримышечного введения. В определенных вариантах осуществления раствор для диафильтрации может содержать стабилизирующее и/или буферное средство. В предпочтительном варианте осуществления стабилизирующее и буферное средство представляет собой глицин в соответствующей концентрации, например от около 0,20 М до около 0,30 М, или от около 0,22 М до около 0,28 М, или от около 0,24 М до около 0,26 ММ, или в концентрации около 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 осуществления диафильтрационный буфер содержит глицин в концентрации 0,25 М или около.

[00126] Как правило, минимальный обменный объем не менее чем в 3 раза превышает исходный объем концентрата или менее около 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более раз исходный объем концентрата. Раствор IgG может быть концентрирован до конечной концентрации от около 5% до около 25% (вес/об.), или от около 6% до около 18% (вес/об.), или от около 7% до около 16% (вес/об.), или от около 8% до около 14% (вес/об.), или от около 9% до около 12%, или до конечной концентрации около 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 осуществления конечной концентрации белка по меньшей мере около 23% достигают без добавления послепромывочной фракции в концентрированный раствор. В другом варианте осуществления конечной концентрации белка по меньшей мере около 24% достигают без добавления послепромывочной фракции в концентрированный раствор. Конечной концентрации белка по меньшей мере около 25% достигают без добавления послепромывочной фракции в концентрированный раствор. Как правило, в конце процесса концентрирования pH раствора составляет от около 4,6 до 5,1.

[00127] В одном иллюстративном варианте осуществления pH композиции IgG регулируют до около 4,5 перед ультрафильтрацией. Раствор концентрируют до концентрации белка $5 \pm 2\%$ вес/об. посредством ультрафильтрации. UF-мембрана имеет номинальную отсечку по молекулярной массе (NMWCO) 50000 дальтон или менее (полиэфирсульфоновая мембрана Millipore Pellicon). Концентрат подвергают диафильтрации через десять объемов 0,25 М раствора глицина, pH $4,5 \pm 0,2$. В ходе всей операции ультрадиафильтрации раствор поддерживают при температуре от около 2°C до около 8°C. После диафильтрации раствор концентрируют до концентрации белка по меньшей мере 11% (вес/об.).

13. Состав

[00128] По завершении стадии диафильтрации концентрацию белка в растворе регулируют посредством диафильтрационного буфера до конечной концентрации от около

5% до около 20% (вес/об.), или от около 6% до около 18% (вес/об.), или от около 7% до около 16% (вес/об.), или от около 8% до около 14% (вес/об.), или от около 9% до около 12%, или до конечной концентрации около 5%, или 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20%. В одном иллюстративном варианте осуществления конечная концентрация белка в растворе составляет от около 9% до около 11%, например, 10%.

[00129] В различных вариантах осуществления составленный объединенный раствор дополнительно стерилизуют посредством фильтрования через мембранный фильтр с абсолютным размером пор не более примерно 0,22 мкм, например примерно 0,2 мкм. Раствор необязательно распределяют в асептических условиях в конечные контейнеры для надлежащей герметизации, а образцы отбирают для испытания.

[00130] В одном варианте осуществления композицию IgG дополнительно регулируют до концентрации около $10,2 \pm 0,2\%$ (вес/об.) с использованием диафильтрационного буфера. При необходимости pH регулируют до значения от около 4,4 до около 4,9. Наконец, раствор фильтруют в стерильных условиях и инкубируют в течение трех недель при температуре около 30°C.

14. Способы лечения

[00131] В соответствии с обычной практикой в современной медицине стерилизованные препараты концентрированных иммуноглобулинов (особенно IgG) применяют для лечения заболеваний, которые относятся к трем основным классам: иммунодефициты, воспалительные и аутоиммунные заболевания и острые инфекции. Данные препараты IgG также могут быть полезны для лечения рассеянного склероза (особенно рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза или RRMS), болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Очищенный препарат IgG по настоящему изобретению подходит для данных целей, а также для других клинически приемлемых применений препаратов IgG.

[00132] FDA одобрило использование IVIG для лечения различных показаний, включая аллогенную трансплантацию костного мозга, хронический лимфолейкоз, идиопатическую тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП), детский ВИЧ, первичный иммунодефицит, болезнь Кавасаки, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIPD) и трансплантацию почки с реципиентом с высоким уровнем антител или с несовместимым по системе ABO донором. В определенных вариантах осуществления композиции IVIG, представленные в настоящем документе, полезны для лечения или контроля данных заболеваний и состояний.

[00133] Кроме того, IVIG не по прямому назначению обычно назначают пациентам для лечения или контроля различных показаний, например, синдрома хронической усталости, колита, вызванного *Clostridium difficile*, дерматомиозит и полимиозит, офтальмопатии Грейвса, синдрома Гийена-Барре, мышечной дистрофии, миозита с тельцами включения, синдрома Ламберта-Итона, красной волчанки, мультифокальной моторной невропатии, рассеянного склероза (РС), тяжелой миастении, неонатальной

аллоиммунной тромбоцитопенией, парвовирусной инфекции В19, пузырчатки, посттрансфузионной пурпury, отторжения почечного трансплантата, самопроизвольного аборта/выкидыша, синдрома ригидности, опсиклонус-миоклонуса, тяжелого сепсиса и септического шока у взрослых в критическом состоянии, токсического эпидермального некролиза, хронического лимфолейкоза, множественной миеломы, агаммаглобулинемии, сцепленной с X-хромосомой, и гипогаммаглобулинемии. В определенных вариантах осуществления композиции IVIG, представленные в настоящем документе, полезны для лечения или контроля данных заболеваний и состояний.

[00134] Наконец, было предложено экспериментальное использование IVIG для лечения или контроля заболеваний, включая первичный иммунодефицит, RRMS, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (публикация заявки на патент США № 2009/0148463, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки для всех целей). В определенных вариантах осуществления композиции IVIG, представленные в данном документе, подходят для лечения или управления первичного иммунного дефицита, RRMS, болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления, включающих ежедневное введение, эффективное количество, вводимое субъекту, может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, тяжести заболевания, способе введения (*например*, внутривенном или подкожном) и реакции на терапию. В определенных вариантах осуществления препарат иммуноглобулина по настоящему изобретению можно вводить субъекту в количестве от 5 мг/кг до около 2000 мг/кг ежедневно. В дополнительных вариантах осуществления препарат иммуноглобулина можно вводить в количествах по меньшей мере около 10 мг/кг, по меньшей мере 15 мг/кг, по меньшей мере 20 мг/кг, по меньшей мере 25 мг/кг, по меньшей мере 30 мг/кг или по меньшей мере 50 мг/кг. В дополнительных вариантах осуществления препарат иммуноглобулина можно вводить субъекту в дозах до около 100 мг/кг, до около 150 мг/кг, до около 200 мг/кг, до около 250 мг/кг, до около 300 мг/кг, до около 400 мг/кг ежедневно. В других вариантах осуществления дозы препарата иммуноглобулина могут быть больше или меньше. Кроме того, препараты иммуноглобулина можно вводить в одной или более дозах в сутки. Клиницисты, знакомые с заболеваниями, которые лечат препаратами IgG, могут определить подходящую дозу для пациента в соответствии с критериями, известными в данной области.

[00135] В соответствии с настоящим изобретением время, необходимое для завершения курса лечения, может определять врач и оно может варьировать от одного дня до более месяца. В определенных вариантах осуществления курс лечения может составлять от 1 до 6 месяцев.

[00136] Эффективное количество препарата IVIG вводят субъекту внутривенно. Термин «эффективное количество» относится к количеству препарата IVIG, которое приводит к улучшению или излечению заболевания или состояния у субъекта. Эффективное количество, которое следует вводить субъекту, может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, заболевании или состоянии,

которое подлежит лечению, тяжести заболевания и реакции на терапию. В определенных вариантах осуществления препарат IVIG можно вводить субъекту в дозе от около 5 мг/кг до около 2000 мг/кг на одно введение. В определенных вариантах осуществления доза может составлять по меньшей мере около 5 мг/кг, или по меньшей мере около 10 мг/кг, или по меньшей мере около 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 около 2000 мг/кг.

[00137] Дозировка и частота лечения IVIG будут зависеть, помимо прочего, от других факторов: заболевания или состояния, подвергаемого лечению, и тяжести заболевания или состояния у пациента. Как правило, при первичной иммунной дисфункции дозу от около 100 мг/кг до около 400 мг/кг массы тела вводят примерно каждые 3-4 недели. При неврологических и аутоиммунных заболеваниях вводят до 2 г/кг массы тела в течение трех-шести месяцев пятидневным курсом один раз в месяц. Обычно введение дополняют поддерживающей терапией, включающей введение от около 100 мг/кг до около 400 мг/кг массы тела примерно один раз каждые 3-4 недели. Как правило, пациент будет получать дозу или лечение примерно раз в 14-35 дней или примерно каждые 21-28 дней. Частота лечения будет зависеть, помимо прочих факторов, от заболевания или состояния, подвергаемого лечению, и тяжести заболевания или состояния у пациента.

[00138] В предпочтительном варианте осуществления представлен способ лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у человека, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение фармацевтической композиции IVIG по настоящему изобретению. В связанном варианте осуществления в настоящем изобретении представлены композиции IVIG, полученные в соответствии со способом, представленным в настоящем документе, для лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у человека, нуждающегося в этом.

[00139] В определенных вариантах осуществления иммунодефицит, аутоиммунное заболевание или острая инфекция выбраны из аллогенной трансплантации костного мозга, хронического лимфолейкоза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТП), детского ВИЧ, первичных иммунодефицитов, болезни Кавасаки, хронической воспалительной демиелинизирующей полинейропатии (CIDP), трансплантации почки реципиенту с высоким уровнем антител или донору, несовместимому по системе ABO, синдрома хронической усталости, колита, вызванного *clostridium difficile*, дерматомиозита и полимиозита, офтальмопатии Грейвса, синдрома Гийена-Барре, мышечной дистрофии, миозита с включениями, синдрома Ламберта-Итона, красной волчанки, мультифокальной моторной невропатии, рассеянного склероза (MS), тяжелой миастении, неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении, парвовирусной инфекции B19, пузырчатки, посттрансфузионной пурпуры, отторжения почечного трансплантата, самопроизвольного

аборта/выкидыша, синдрома ригидности, опсуклонус-миоклонуса, тяжелого сепсиса и септического шока у взрослых в критическом состоянии, токсического эпидермального некролиза, хронического лимфолейкоза, множественной миеломы, агаммаглобулинемии, сцепленной с X-хромосомой, гипогаммаглобулинемии, первичного иммунодефицита, RRMS, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона.

15. Фармацевтические композиции

[00140] В другом аспекте в настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции и составы, содержащие очищенный IgG, полученные посредством способов, представленных в настоящем документе. Как правило, фармацевтические композиции и составы IgG, приготовленные с использованием новых способов, описанных в настоящем документе, будут иметь высокое содержание и чистоту IgG. Например, фармацевтические композиции IgG и составы, представленные в настоящем документе, могут иметь концентрацию белка по меньшей мере около 7% (вес/об.) и содержание IgG чистоты более около 95%. Данные фармацевтические композиции и составы IgG высокой чистоты подходят для терапевтического введения, *например*, для терапии IVIG. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция IgG составлена для внутривенного введения (*например*, терапия IVIG).

[00141] В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем документе, готовят посредством составления водной композиции IgG, выделенного с использованием способа, представленного в настоящем документе. Как правило, составленную композицию будут подвергать по меньшей мере одной, предпочтительно по меньшей мере двум, наиболее предпочтительно по меньшей мере трем стадиям инактивации или удаления вирусов. Неограничивающие примеры стадий инактивации или удаления вирусов, которые можно применять посредством способов, представленных в настоящем документе, включают обработку растворяющим моющим средством (Horowitz *et al.*, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 и Kreil *et al.*, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, обе из которых непосредственно включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей 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, обе из которых прямо включены в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.), и инкубацию при низком pH при высоких температурах (Kempf *et al.*, *Transfusion* 1991 (31)423-427 и Louie *et al.*, *Biologicals* 1994 (22):13-19).

[00142] В определенных вариантах осуществления представлены фармацевтические препараты с содержанием IgG от около 80 г/л IgG до около 220 г/л IgG. Как правило, данные составы IVIG готовят посредством выделения композиции или IgG из плазмы с использованием описанного в данном документе способа, концентрирования композиции и получения концентрированной композиции в растворе, подходящем для внутривенного введения. Композиции IgG можно концентрировать с использованием любого подходящего

способа, известного специалисту в данной области. В одном варианте осуществления композицию концентрируют посредством ультрафильтрации/диафильтрации. В некоторых вариантах осуществления в устройстве для ультрафильтрации, используемом для концентрирования композиции, будет применяться мембрана для ультрафильтрации, имеющая номинальную отсечку по молекулярной массе (NMWCO) менее около 100 кДа или менее около 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 кДа или менее. В предпочтительном варианте осуществления мембрана для ультрафильтрации имеет NMWCO не более 50 кДа. Буферный обмен можно осуществлять с использованием любого подходящего способа, известного специалисту в данной области. В конкретном варианте буферный обмен достигают посредством диафильтрации.

[00143] В одном конкретном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция IgG, в которой композиция IgG очищена от супернатантной фракции, лишенной C1-INH, содержащей IgG, при этом способ включает следующее:

(а) связывание обедненной C1-INH супернатантной фракции с гепарином, в результате чего образуется гепаринизированная фракция; а также

(b) выделение IgG из гепаринизированной фракции с образованием обогащенной IgG фракции.

[00144] В конкретном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция IgG, причем композиция IgG была очищена от гепаринизированной фракции посредством способа, включающего стадии (а) осаждения белковой гепаринизированной фракции, на первой стадии осаждения, с использованием от около 6% до около 10% этанола при pH от около 7,0 до 7,5 с получением первого осадка и первого супернатанта; (b) регулирования концентрации этанола гепаринизированной фракции со стадии (а) до около 25% (об./об.) при температуре от около -5°C до около -9°C, с образованием таким образом смеси, (c) отделения жидкости и осадка от смеси со стадии (b), (d) повторного суспендирования осадка со стадии (c) в буфере, содержащем фосфат и ацетат, при этом pH буфера регулируют посредством добавления 600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера с образованием суспензии, (e) смешивания мелкодисперсного диоксида кремния (SiO₂) с суспензией со стадии (d) в течение по меньшей мере около 30 минут, (f) фильтрации суспензии на фильтр-прессе с образованием фильтрата, (g) промывка фильтр-пресса по меньшей мере с 3 мертвыми объемами фильтр-пресса буфера, содержащего фосфат и ацетат, при этом pH буфера регулируют с использованием 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, образуя при этом промывочный раствор, (h) объединения фильтрата со стадии (f) с промывочным раствором со стадии (g), образуя таким образом раствор, и обработки раствора моющим средством, (i) регулирования pH раствора со стадии (h) до около 7,0 и добавления этанола до конечной концентрации около 25%, образуя таким образом осадок, (j) отделения жидкости и осадка от смеси со стадии (i), (k) растворения осадка в водном растворе, содержащем растворитель или моющее средство, и поддерживая раствор в течение по меньшей мере 60 мин., (l) пропускания раствора после стадии (k) через катионообменную хроматографическую колонку и элюирования белков, абсорбированных

на колонке в элюате, (m) пропускания элюата со стадии (l) через анионообменную хроматографическую колонку с образованием выходящего потока, (n) пропускания выходящего потока со стадии (m) через нанофильтр с образованием нанофильтрата, (o) пропускания нанофильтрата со стадии (n) через мембрану для ультрафильтрации с образованием ультрафильтрата, и (p) диафильтрации ультрафильтрата со стадии (o) через диафильтрационный буфер с образованием диафильтрата с концентрацией белка от около 8% (вес/об.) до около 12% (вес/об.), с получением таким образом композиции концентрированного IgG.

[00145] В определенных вариантах осуществления представлена фармацевтическая композиция IgG, в которой композицию IgG получают с использованием способа, представленного в данном документе, который включает улучшения двух или более стадий процесса фракционирования, описанных выше. Например, в некоторых вариантах осуществления улучшения могут быть обнаружены на первой стадии осаждения, на стадии осаждения с модифицированной фракцией II+III, на стадии растворения с модифицированной фракцией II+III и/или на стадии фильтрации суспензии с модифицированной фракцией II+III.

[00146] В определенных вариантах осуществления представлена фармацевтическая композиция IgG, в которой композицию IgG получают с использованием способа очистки, описанного в настоящем документе, причем способ включает добавление распылением одного или более растворов, которые в противном случае были бы введены во фракцию плазмы посредством добавления потоком. Например, в определенных вариантах осуществления способ будет включать введение спирта (*например*, этанола) во фракцию плазмы посредством распыления. В других вариантах осуществления растворы, которые можно добавлять во фракцию плазмы посредством распыления, включают без ограничения pH-модифицирующий раствор, раствор растворителя, раствор моющего средства, буфер для разведения, раствор, модифицирующий проводимость и т.п. В предпочтительном варианте осуществления одну или более стадий осаждения спиртом осуществляют посредством добавления спирта в фракцию плазмы посредством распыления. Во втором предпочтительном варианте одну или более стадий регулирования pH осуществляют посредством добавления pH-модифицирующего раствора к фракции плазмы посредством распыления.

[00147] В определенных вариантах осуществления представлена фармацевтическая композиция IgG, причем композицию IgG получают посредством способа очистки, описанного в данном документе, причем способ включает регулирование pH фракции плазмы, осаждаемой после и/или совместно с добавлением осаждающего средства (*например*, спирта или полиэтиленгликоля). В некоторых вариантах осуществления представлено улучшение процесса, при котором pH активно осаждаемой фракции плазмы поддерживается на протяжении всей стадии инкубации или выдержки осаждения посредством непрерывного контроля и регулирования pH. В предпочтительных вариантах осуществления регулирования pH осуществляют посредством распыления pH-

модифицирующего раствора.

[00148] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция IgG, имеющая концентрацию белка от около 70 г/л до около 130 г/л. В определенных вариантах осуществления концентрация белка композиции IgG составляет от около 80 г/л до около 120 г/л, например, от около 90 г/л до около 110 г/л, например, около 100 г/л, или представляет собой любую подходящую концентрацию в указанных диапазонах, например, около 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 осуществления представлена фармацевтическая композиция с концентрацией белка 100 г/л или около. В особенно предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция будет иметь концентрацию белка около 102 г/л.

[00149] В другом варианте осуществления настоящего изобретения представлена фармацевтическая композиция IgG, имеющая концентрацию белка от около 170 г/л до около 230 г/л. В определенных вариантах осуществления концентрация белка в композиции IgG составляет от около 180 г/л до около 220 г/л, например, от около 190 г/л до около 210 г/л, например, около 200 г/л, или представляет собой любую подходящую концентрацию в указанных диапазонах, например, около 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 осуществления представлена фармацевтическая композиция с концентрацией белка 200 г/л или около.

[00150] Способы, представленные в данном документе, обеспечивают получение фармацевтических композиций IgG с очень высокими уровнями чистоты. Например, в одном варианте осуществления по меньшей мере около 95% общего белка в композиции, представленной в данном документе, будет представлять собой IgG. В других вариантах осуществления по меньшей мере около 96% белка представляет собой IgG, или по меньшей мере около 97%, 98%, 99%, 99,5% или более общего белка композиции будет представлять собой IgG. В предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере 97% общего белка в композиции будет представлять собой IgG. В другом предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере 98% общего белка в композиции будет представлять собой IgG. В другом предпочтительном варианте осуществления по меньшей мере 99% общего белка в композиции будет представлять собой IgG.

[00151] Подобным образом, способы, представленные в данном документе, обеспечивают получение фармацевтических композиций IgG, которые содержат чрезвычайно высокие уровни загрязняющих веществ. Например, в определенных вариантах осуществления представлены композиции IgG, которые содержат менее около 100 мг/л IgA. В других вариантах осуществления композиция IgG будет содержать менее около 50 мг/л IgA, предпочтительно менее около 35 мг/л IgA, наиболее предпочтительно менее около 20 мг/л IgA.

[00152] Представленные в данном документе фармацевтические композиции обычно содержат один или более буферных средств или средств, стабилизирующих pH,

подходящих для внутривенного, подкожного и/или внутримышечного введения. Неограничивающие примеры буферных средств, подходящих для составления композиции IgG, представленных в настоящем документе, включают глицин, цитрат, фосфат, ацетат, глутамат, тартрат, бензоат, лактат, гистидин или другие аминокислоты, глюконат, малат, сукцинат, формиат, пропионат, карбонат или любую их комбинацию, доведенную до соответствующего pH. Как правило, буферного средства будет достаточно для поддержания подходящего pH в составе в течение продолжительного периода времени. В предпочтительном варианте осуществления буферное средство представляет собой глицин.

[00153] В некоторых вариантах осуществления концентрация буферного средства в составе будет составлять от около 100 мМ до около 400 мМ, например, от около 150 мМ до около 350 мМ, например, от около 200 мМ до около 300 мМ, например, 250 мМ. В особенно предпочтительном варианте осуществления композиция IVIG будет содержать от около 200 мМ до около 300 мМ глицина, например, около 250 мМ глицина.

[00154] В определенных вариантах осуществления pH состава будет составлять от около 4,1 до около 5,6, например, от около 4,4 до около 5,3, например, от 4,6 до около 5,1. В конкретных вариантах осуществления pH состава может составлять около 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 или 5,6. В предпочтительном варианте осуществления pH состава будет составлять от около 4,6 до около 5,1.

[00155] В некоторых вариантах осуществления представленные в данном документе фармацевтические композиции могут дополнительно содержать средство для регулирования осмолярности композиции. Неограничивающие примеры средств для регулирования осмолярности включают маннит, сорбит, глицерин, сахарозу, глюкозу, декстрозу, левулозу, фруктозу, лактозу, полиэтиленгликоли, фосфаты, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, глюконоглюкогептонат кальция, диметилсульфон и т.п.

[00156] Как правило, представленные в данном документе составы будут иметь осмолярность, сравнимую с физиологической осмолярностью, от около 285 до 295 мОсмоль/кг (Lacy *et al.*, *Drug Information Handbook - Lexi-Comp* 1999:1254. В определенных вариантах осуществления осмолярность препарата будет составлять от около 200 мОсмоль/кг до около 350 мОсмоль/кг, предпочтительно от около 240 до около 300 мОсмоль/кг. В конкретных вариантах осуществления осмолярность состава будет составлять около 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, или 350 мОсмоль/кг.

[00157] Предлагаемые в данном документе составы IgG обычно стабильны в жидкой форме в течение продолжительного периода времени. В определенных вариантах осуществления составы стабильны в течение по меньшей мере около 3 месяцев при комнатной температуре, или по меньшей мере около 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 обычно

стабилен в течение 6 или по меньшей мере менее около 18 месяцев в условиях охлаждения (обычно от около 2°C до около 8°C), или по меньшей мере менее около 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 или 45 месяцев в условиях охлаждения.

ПРИМЕРЫ

[00158] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения. Специалистам в данной области будет легко распознать множество некритических параметров, которые можно изменить или модифицировать для получения по существу таких же или подобных результатов.

Использованные условные сокращения:

САЕ, электрофорез ацетата целлюлозы; CZE, капиллярный зональный электрофорез; FC, конечный контейнер; NAPTТ, неактивированное частичное тромбопластиновое время; НП, нормальная плазма; РКА, прекалликреиновая активность; PL-1, амидолитическая активность, измеренная с хромогенным субстратом PL-1; PptG, осадок G; TGA, анализ образования тромбина; TP, общий белок

Пример 1

[00159] В настоящем примере показано, что значительные количества фибриногена, амидолитической активности, прекалликреиновой активности могут быть удалены из осадка PptG, полученного из супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH (DDCPR).

[00160] Содержание фибриногена из исходного материала в супернатанте I снижается с 0,94 до 0,26 г/л DDCPR для варианта нативного (см. таблицу 1), с 1,23 до 0,34 г/л DDCPR для варианта гепарина (см. таблицу 2) и с 1,4 до 0,37 г/л DDCPR для варианта NaCl (см. таблицу 3). Дальнейшее снижение происходит при аэрозольной обработке и фильтрации до 0,01 г/л для варианта гепарина (таблица 2) и до 0,02 г/л DDCPR для обоих других вариантов (таблица 1 и таблица 3). Фибриноген в растворенных образцах PptG из 6 партий составляет 0,1%-0,3% от общего белка (таблица 4). Содержание фибриногена на данной стадии равно содержанию в соответствующих партиях, полученных из PptG (0,1-0,3% общего белка). Фибриноген был ниже предела обнаружения на уровне конечного контейнера (см. таблицу 15).

[00161] Фракционирование II+III обеспечивает отделение необработанных иммуноглобулинов (осадка II+III) от необработанного альбумина (супернатант II+III). Гаптоглобин и трансферрин в основном сохраняются в супернатантах II+III (см. таблицу 1, таблицу 2 и таблицу 3). Комплемент C3 является низким в исходных объединенных веществах по Кону и удаляется при обработке аэросилом и стадии фильтрации от 0,03-0,05 г/л DDCPR до 0,004 г/л DDCPR для гепарина и 0,01 г/л DDCPR для обоих других вариантов. Белок FXI снижается от около 1000 ЕД/л DDCPR до 148 ЕД/л DDCPR для гепарина, до 383 ЕД/л DDCPR для нативного и до 461 ЕД/л DDCPR для варианта NaCl. Обработка аэросилом и стадия фильтрации снижает уровень фибриногена, гаптоглобина, а также части белка IgA, IgM и FXI.

[00162] В PptG обнаружено низкое содержание низкомолекулярных компонентов, измеренное распределением молекулярных размеров (см. таблицу 4). Трансферрин и

макроглобулин $\alpha 2$ остаются в супернатанте PptG (таблицы 1-3). Содержание IgA (от 7,7% до 10,9% общего белка (TP), измеренное посредством ELISA) в растворенном PptG имеет несколько более низкий диапазон, чем в соответствующих партиях в VIE (9,6-12,7% TP). В растворенном PptG уровень $\alpha 2$ -макроглобулина колеблется от 4,7 до 5,6% от TP (таблица 4). Белок FXI является одинаково высоким для всех партий с вариантом нативным и вариантом NaCl (37,5-41,9 ЕД/г белка) в PptG, но ниже для партий, в которых был добавлен гепарин (12,1-12,4 ЕД/г белка) (см. таблицу 4). Это еще лучше отражено значениями г/л DDCPP, которые показаны в таблице 4.

Таблица 1: Промежуточные результаты выше по потоку (объединенные вещества по Кону до супернатанта PptG) - нативные

Выше по потоку вариантно-нативный		Объединенные вещества DDCPP по Кону (4/4)	Супер- натант I (4/8)	Супер- натант II-i- III(5/8)	Суспензия II-i-III (6/5)	Фильтрат CUNO (7/13)	Супернатант PptG (8/6)
Белок (Biuret)	[мг/мл]	48,23	42,66	31,03	17,54	8,52	1,07
Распределение молекулярного размера (HPLC) [% площади]	Агрегат	15,07		6,89	25,7	15,35	
	Олиго/димер	38,52		16,21	65,36	79,8	
	Мономер	46,13		76,71	5,82	4,64	
	Фрагменты	0,24		0,19	3,12	0,21	
IgA (ELISA)	[мг/мл]	1,47	1,27	0,25	1,43	0,81	
	[г/л DDCPP]	1,47	1,35	0,28	0,93	0,88	
IgM (ELISA)	[мг/мл]	0,48	0,29	0,001	0,58	0,26	
	[г/л DDCPP]	0,48	0,31	0,002	0,37	0,29	
Фибриноген	[мг/мл]	0,94	0,24	0,0002	0,48	0,02	
	[g/L]	0,94	0,26	0,0002	0,31	0,02	

	DDCPP]						
Комплемент СЗ	[мг/мл]	0,09	0,05	0,004	0,05	0,01	
	[г/л DDCPP]	0,09	0,05	0,005	0,03	0,01	
а1- антитрипсин	[мг/мл]	1,39	1,15		0,01	0,01	
	[г/л DDCPP]	1,39	1,21		0,01	0,01	
а2-макро- глобулин	[мг/мл]	1,33	1,14	0,31	1,26	0,76	0,19
	[г/л DDCPP]	1,33	1,21	0,35	0,82	0,83	0,27
Аполипопро- теин	[мг/мл]	1,25	1,11	0,71	более 0,019	0,003	
	[г/л DDCPP]	1,25	1,17	0,81		0,003	
Церулоплаз- мин	[мг/мл]	0,02		0,002	0,02	0,002	0,001
	[г/л DDCPP]	0,02		0,002	0,02	0,002	0,001
Белок FXI	[Ед./мл]	1,14	1,03	0,21	1,13	0,35	
	[Ед./л DDCPP]	1140	1089	241	737	383	
Гаптоглобин	[мг/мл]	1,06		0,94	0,04	0,01	0,01
	[г/л DDCPP]	1,06		1,08	0,02	0,01	0,01
Трансферри- н	[мг/мл]	2,32	2,08	1,91	0,18	0,11	0,08
	[г/л DDCPP]	2,32	2,20	2,18	0,12	0,12	0,12

Таблица 2: Промежуточные результаты выше по потоку (объединенные вещества по Кону до сепрнатанта PptG) - вариант гепарина

Вариант гепарина выше по потоку	Объединен- ные вещества	Супер- натант I (4/8)	Супер- натант II+III	Суспензия II+III (6/5)	Фильтра- т CUNO (7/13)	Супернат- ант PptG (8/6)
------------------------------------	-------------------------------	-----------------------------	----------------------------	---------------------------	------------------------------	--------------------------------

		по Кону (4/4)		(5/8)			
Белок (Biuret)	[мг/мл]	47,42	42,31	31,26	20,04	7,33	0,92
Распределение молекулярного размера (HPLC) [% площади]	Агрегат	12,79		10,38	22,80	15,39	
	Олиго/димер	37,78		13,96	69,88	79,99	
	Мономер	49,19		75,14	6,60	4,49	
	Фрагменты	0,24		0,51	0,72	0,13	
IgA (ELISA)	[мг/мл]	1,63	1,34	0,26	1,55	0,66	
	[г/л DDCPR]	1,63	1,42	0,30	1,00	0,81	
IgM (ELISA)	[мг/мл]	0,56	0,31	0,002	0,55	0,19	
	[г/л DDCPR]	0,56	0,33	0,002	0,35	0,23	
Фибриноген	[мг/мл]	1,23	0,32	0,0004	0,69	0,008	
	[г/л DDCPR]	1,23	0,34	0,0004	0,44	0,01	
Комплемент C3	[мг/мл]	0,09	0,05	0,0003	0,05	0,003	
	[г/л DDCPR]	0,09	0,05	0,0003	0,03	0,004	
α1- антитрипсин	[мг/мл]	1,49	1,40		0,04	0,007	
	[г/л DDCPR]	1,49	1,49		0,03	0,01	
α2-макро- глобулин	[мг/мл]	1,32	1,15	0,28	1,37	0,67	0,19
	[г/л DDCPR]	1,32	1,22	0,32	0,88	0,82	0,31
Церулоплазм ин	[мг/мл]	0,03		0,01	0,01	0,003	0,001
	[г/л DDCPR]	0,03		0,01	0,01	0,003	0,001
Белок FXI	[Ед./мл]	1,1	0,87	0,08	1,54	0,12	
	[Ед./л DDCPR]	1100	922	92	994	148	

Гаптоглобин	[мг/мл]	1,15		0,91	0,04	0,006	0,004
	[г/л DDCPR]	1,15		1,04	0,03	0,01	0,01
Трансферрин	[мг/мл]	2,27	1,96	1,68	0,16	0,08	0,06
	[г/л DDCPR]	2,27	2,07	1,93	0,10	0,10	0,10

Таблица 3: Промежуточные результаты выше по потоку (объединенные вещества по Кону до супернатанта PptG) -вариант NaCl

Выше по потоку Вариант NaCl		Объединенные вещества по Кону (4/4)	Супернатант I (4/8)	Супернатант II+III (5/8)	Суспензия II+III (6/5)	Фильтрат CUNO (7/13)	Супернатант PptG (8/6)
Белок (Biuret)	[мг/мл]	48,54	43,40	30,78	12,45	7,00	0,89
Распределение молекулярного размера (HPLC) [% площади]	Агрегат	13,16		11,13	22,22	16,99	
	Олиго/димер	38,93		14,49	70,79	78,57	
	Мономер	47,71		74,01	6,81	4,36	
	Фрагменты	0,18		0,38	0,17	0,10	
IgA (ELISA)	[мг/мл]	1,521	1,56	0,23	1,30	0,62	
	[г/л DDCPR]	1,52	1,70	0,27	0,95	0,87	
IgM (ELISA)	[мг/мл]	0,50	0,46	0,002	0,72	0,25	
	[г/л DDCPR]	0,50	0,50	0,002	0,53	0,34	
Фибриноген	[мг/мл]	1,4	0,34	0,0005	0,49	0,02	
	[г/л]	1,4	0,37	0,0006	0,36	0,02	

	DDCPP]						
Комплемент СЗ	[мг/мл]	0,09	0,08	0,0004	0,06	0,006	
	[г/л DDCPP]	0,09	0,09	0,0005	0,05	0,009	
а1- антитрипсин	[мг/мл]	1,29	1,14		0,07	0,006	
	[г/л DDCPP]	1,29	1,24		0,05	0,008	
а2-макро- глобулин	[мг/мл]	1,40	1,19	0,25	1,19	0,59	0,18
	[г/л DDCPP]	1,40	1,30	0,30	0,87	0,83	0,32
Церулоплаз мин	[мг/мл]	0,02		0,007	0,015	0,001	< 0,00032
	[г/л DDCPP]	0,02		0,008	0,01	0,002	н.а.
Белок FXI	[Ед./мл]	0,99	0,96	0,25	1,1	0,33	
	[Ед./л DDCPP]	990	1047	295	807	461	
Гаптоглобин	[мг/мл]	1,02		0,91	0,048	0,008	0,005
	[г/л DDCPP]	1,02		1,08	0,035	0,011	0,010
Трансферри н	[мг/мл]	2,44	2,02	1,76	0,15	0,08	0,06
	[г/л DDCPP]	2,44	2,21	2,08	0,11	0,11	0,11

Таблица 4: Характеристика осадка G

Растворенный осадок G		Нативный	Гепарин	NaCl
		35mM	35mM	35mM
Испытание	Единица			
Белок (Biuret)	[мг/мл]	69,58	73,80	75,25
Распределение молекулярных размеров (HPLC) [% площади]	Агрегат	10,60	9,12	11,21
	Олиго/димер	13,76	13,44	12,76
	Мономер	75,53	77,31	75,90
	Фрагменты	0,11	0,13	0,13
IgA (ELISA)	[мг/мл]	6,22	7,46 ¹⁾	6,06

	[% TP]	8,9	10,1 ¹⁾	8,1
	[г/л DDCPP]	0,79	0,78 ¹⁾	0,66
IgM (ELISA)	[мг/мл]	1,81	1,80	2,43
	[% TP]	2,6	2,4	3,2
	[г/л DDCPP]	0,23	0,19	0,27
Фибриноген	[мг/мл]	0,18	0,09	0,21
	[% TP]	0,25	0,12	0,27
	[г/л DDCPP]	0,02	0,01	0,02
Комплемент С3	[мг/мл]	0,08	0,04	0,10
	[% TP]	0,12	0,05	0,13
	[г/л DDCPP]	0,01	0,004	0,01
α2-макро-глобулин	[мг/мл]	3,52	3,57	3,78
	[% TP]	5,06	4,84	5,02
	[г/л DDCPP]	0,45	0,37	0,41
Белок FXI	[Ед./мл]	2,75	0,89	2,82
	[Ед./г TP]	39,52	12,06	37,47
	[Ед./л DDCPP]	349,3	92,9	308,0

[00163] РКА в растворенном PptG колеблется от ниже предела количественного определения до 9,4 ед/мл. В порции РКА ниже предела количественного определения (см. Таблицу 5) для всех вариантов процесса. Калликреиноподобная активность является высокой на стадии растворения PptG (490-733 нмоль/мл*мин.), но может быть сильно снижена в ходе последующего процесса: при использовании 35 мМ элюирующего буфера для хроматографии на СМ сефарозе уровни являются ниже предела количественного определения (менее 10 нмоль/мл * мин.). Неактивированное частичное тромбопластиновое время, измеренное в плазме с дефицитом FXI, не укорачивается при растворении PptG при любом варианте. Амидолитическая активность, измеренная с использованием хромогенного субстрата PL-1, является высокой в растворенном PptG (97,2-163,1 нмоль/мл*мин.), но снижена в большинстве случаев до уровней ниже предела количественного определения при конечном общем уровне (менее 10 нмоль/мл*мин.). Генерацию тромбина измеряли на уровне растворенного PptG только для информации. Испытание варьирует, но TGA, измеренный на данной стадии, является ниже (113,14% и 103,33% от нормальной плазмы) (контрольный предел 132% NP для FC) для партии, в которой гепарин добавляли к DDCPP. В объединенном образце перед инкубацией при низком pH значение TGA выше предела мониторинга для обычных конечных контейнеров, составляющего 132% для всех образцов. Значение TGA составляет от 185% до 195% нормальной плазмы для опытов с 35 мМ элюирующего буфера независимо от добавления NaCl, гепарина или нативного. Значения FXIa находятся ниже предела количественного

определения для партии, полученной с вариантом гепарина при растворении PptG. Для обеих других партий значения являются довольно высокими (10,3-16,7 нг/г белка) по сравнению с другими исследованиями. Для всех партий значения FXIa были обнаружены в конечной партии. Снова самые низкие значения наблюдались при добавлении гепарина к DDCPP.

[00164] Высокая калликреиноподобная активность при растворении PptG отражается также профилем амидолитической активности. Субстрат позволяет специфически измерять калликреин, FXIa и FXIIa, который составляет от 570 до 1780 нмоль/мл*мин. Данные значения снижаются до 8 и 22 нмоль/мл*мин. в конечной массе (см. таблицу 5).

Таблица 5: Результаты РКА, прокоагулянтных примесей и амидолитической активности в PptG и порции

Эксперимент		Нативная	Добавление гепарина	Добавление NaCl
Буфер для элюирования СМ сефарозы		35 мМ	35 мМ	35 мМ
Растворенный PptG	РКА Ед./мл	<4	7,5	<4
	Калликреиноподобная активность [нмоль/мл*мин.]	555	733	490
	НАРТТ [мг]	более 6,6	Более 7,4	Более 6,6
	Амидолитическая активность (PL-1) [нмоль/мл*мин.]	143,6	163,1	97,2
	TGA [%NP]	155,85	113,14	177,01
	Белок FXI	[Ед./мл]	2,75	0,89
		[Ед./г белка]	39,52	12,06
	FXIa	[нг/мл]	0,719	<0,25
		[нг/г белка]	10,33	н.а.
	Профиль амидолитической активности [нмоль/мл*мин.]		28,40	28,30
			32,20	39,50
			661	927,0
			1242	1716
	РКА [Ед./мл]	<4	<4	<4

Порция	Калликреиноподобная активность [нмоль/мл*мин.]		<10	<10	11
	Амидолитическая активность (PL-1) [нмоль/мл*мин.]		2,30	<10	<10
	TGA [%NP]		195,49	186,59	184,96
	Белок FXI	[Ед./мл]	0,42	0,10	0,34
		[Ед./г белка]	4,10	1,02	3,34
	FXIa	[нг/мл]	4,18	1,97	1,42
		[нг/г белка]	40,77	20,01	13,95
	Профиль амидолитической активности [нмоль/мл*мин.]		<5	<5	<5
			<5	<5	<5
			7,2	5,68	7,4
			8,22	7,63	9,29

Пример 2

[00165] Чистоту в объединенных веществах по Кону, в супернатанте II+III (альбумин) и в промежуточной пасте PptG определяют посредством электрофореза ацетата целлюлозы (см. таблицу 6). Согласно текущим спецификациям Gammagard Liquid/KIOVIG, промежуточный продукт, осадок G, должен соответствовать спецификации чистоты не менее 86% гамма-глобулина, измеренной с использованием электрофореза САЕ или эквивалентного. Пасты PptG, полученные из DDCPP (плазма после C1-ингибитора дозирования), явно соответствовали промежуточному пределу спецификации Gammagard Liquid/KIOVIG более 86% (см. таблицу 6). Добавление гепарина и хлорида натрия повышало чистоту от 88% до 93%.

[00166] Чистоту также измеряют посредством CZE на стадии растворения PptG и конечного контейнера. Ppt G имеет чистоту γ -глобулина 92%-93% и чистота в конечном контейнере составляла 100% γ -глобулина (см. таблицу 7).

Таблица 6: Чистота объединенных веществ по Кону, супернатанта II+III и PptG по данным САЕ

Электрофорез с ацетатом целлюлозы спец. ед. не менее 86%			
Описание эксперимента	Нативная	Добавление гепарина	Добавление NaCl
№ партии выше по			

потоку							
Объединенные вещества по Кону (DDCPR)	Альбумин	67,6		68,1		68,5	
	α, β - глобулин	18,9		18,9		18,6	
	γ - глобулин	9,2		12,0		12,9	
	Преальбумин	0		0		0	
	Фибриноген	4,3		0		0	
супернатант II+III	Альбумин	83		81,2		79,7	
	α, β - глобулин	15,1		17,2		18	
	γ - глобулин	1,9		1,6		2,3	
	Преальбумин	0		0		0	
	Фибриноген	0		0		0	
№ партии ниже по потоку							
Растворенный PptG	Альбумин	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	α, β - глобулин	11,7	11,2	6,5	8,9	9,7	8,6
	γ - глобулин	88,2	88,7	93,4	91,0	90,2	91,3
	Den. Белок	-	-	-	-	-	-

Таблица 7: Чистота растворенного PptG и конечного контейнера (FC), измеренная посредством CZE

Чистота при электрофорезе с ацетатом целлюлозы [%]						
Вариант	Нативная		Добавление гепарина		Добавление NaCl	
№ партии ниже по потоку						
Растворенный PptG	92	не обнаружено	93	93	93	93
Конечный контейнер	100	100	100	100	100	100

Пример 3

[00167] Высокое выделение IgG и выход белка определяют для подтверждения того, что исходный материал подходит для использования в производстве IgG. Выходы белков и IgG приведены в % и г/л плазмы для демонстрации эффективности процесса. Высокая степень извлечения IgG из объединенных веществ по Кону до порции отражает очень хорошую эффективность процесса. Было получено восстановление от 68% до 75% на основе измерения IgG (см. таблицы 8-10). Добавление хлорида натрия к объединенным веществам по Кону для регулирования проводимости приводит к несколько более низкому общему извлечению по сравнению с двумя другими вариантами (68% по сравнению с более 70%).

Таблица 8: Восстановление белка и IgG - нативное с использованием 35 мМ элюирующего буфера CM

Нативная	Корр. веса	Белок	Способ определения белка	Выход белка			Восстановление IgG		
				[%]	[%]	[г/л плазмы]	[%]	Чистота	[г/л плазмы]
Объединенные вещества по Кону (DDCPP)	149,0	4,82	Биурет	100		48,23	100	14,7	7,09
супернатант I	157,5	4,27	Биурет	93,5		45,10	89,7	14,1	6,36
супернатант II+III	170,7	3,10	Биурет	73,7		35,56	2,2	0,4	0,16
Экстракт II+III	97,1	1,75	Биурет	23,7		11,43	88,6	54,9	6,28
фильтрат Cuno	163,0	0,85	Биурет	19,3		9,32	82,1	62,4	5,82
супернатант RptG	209,8	0,11	Биурет	3,1		1,51	1,0	4,8	0,07
Растворенный RptG	3,1	6,96	Биурет	18,3	100	8,84	100	72,6	6,41
		6,65	UV	17,5	100	8,44			
Фильтрат растворенного RptG	6,1	3,45	Биурет	18,2	99,1	8,76	100	72,6	6,41
CM-элюат	6,6	2,77	Биурет	15,7	85,8	7,58	92,8	78,5	5,95
		2,54	UV	14,4	82,2	6,94			
ANX поток	13,2	1,02	UV	11,6	66,2	5,59	86,9	99,7	5,58
Наночелюат	16,0	0,83	UV	11,4	65,1	5,49	79,0	92,3	5,07

Стерильная порция	1,21	10,25	UV	10,7	60,9	5,14	70,8	88,4	4,54
-------------------	------	-------	----	------	------	------	------	------	------

¹⁾ измерено посредством QC VIE

Таблица 9: Восстановление белка и IgG - вариант гепарина с использованием 35 мМ элюирующего буфера CM

NG2C134/P00215 NG	Корр. веса	Белок	Способ определ	Выход белка			Восстановление IgG ¹⁾		
Стадия способа	[кг]	[%]	ения белка	[%]	[%]	[г/л плазмы]	Чистот а	[г/л плазмы]	
Объединенные вещества по Кону	150,0	4,74	Биурет	100		47,42	100	16,2	7,67
супернатант I	159,0	4,23	Биурет	94,6		44,86	89,8	15,4	6,89
супернатант II+III	172,2	3,13	Биурет	75,7		35,89	2,0	0,4	0,15
Экстракт II+III	96,9	2,00	Биурет	27,3		12,94	85,0	50,4	6,52
фильтрат Cuno	185,0	0,73	Биурет	19,1		9,04	79,3	67,2	6,08
супернатант RptG	238,5	0,09	Биурет	3,1		1,46	0,8	4,2	0,06
Растворенный RptG	2,8	7,38	Биурет	16,2	100	7,70	100	73,4	5,66
		6,54	UV	14,4	100	6,82			
Фильтрат растворенного RptG	5,5	3,66	Биурет	16,1	99,2	7,64			
CM-элюат	6,4	2,65	Биурет	13,4	82,5	6,35	66,6	59,3	3,77
		2,55	UV	12,9	89,8	6,13			
ANX поток	12,5	1,04	UV	10,4	72,4	4,94	78,5	89,9	4,44
Нанофильтрат	15,3	0,83	UV	10,0	69,8	4,76	71,1	84,5	4,02
Стерильная порция	1,1	9,84	UV	8,8	61,4	4,19	71,9	97,1	4,07

¹⁾ измерено посредством QC VIE

Таблица 10: Восстановление белка и IgG - вариант NaCl с использованием 35 мМ элюирующего буфера CM

Вариант NaCl	Корр. веса	Белок	Способ определ	Выход белка			Восстановление IgG ¹⁾²⁾		
--------------	---------------	-------	-------------------	-------------	--	--	------------------------------------	--	--

Стадия способа	[кг]	[%]	ения белка	[%]	[%]	[г/л плазмы]	[%]	Чистот а	[г/л плазмы]
Объединенные вещества по Кону	146,4	4,85	Биурет	100		48,54	100	15,5	7,54 ¹⁾
супернатант I	159,7	4,34	Биурет	97,5		47,34	98,4	15,7	7,42 ¹⁾
супернатант II+III	172,9	3,08	Биурет	74,9		36,36	3,6	0,7	0,27 ¹⁾
Экстракт II+III	107,4	1,25	Биурет	18,8		9,13	91	75,1	6,86 ¹⁾
фильтрат Cuno	204,3	0,70	Биурет	20,1		9,77	85,7	66,2	6,46 ¹⁾
супернатант RptG	262,2	0,09	Биурет	3,3		1,60	0,6	2,9	0,05 ¹⁾
Растворенный RptG	3,02	7,53	Биурет	6,9	100	8,22	100	75,1	6,18 ¹⁾
		6,79	UV	15,3	100	7,42			
Фильтрат растворенного RptG	6,0	3,88	Биурет	17,4	102,8	8,44	92,9	68,5	5,78 ²⁾
СМ-элюат	7,2	2,75	Биурет	14,7	86,9	7,15	83,9	73,1	5,22 ²⁾
		2,17	UV	11,6	76,0	5,64			
ANX поток	15,3	1,04	UV	11,8	77,3	5,74	85,7	93,0	5,34 ²⁾
Нанофильтрат	18,4	0,83	UV	11,4	74,4	5,52	85,4	96,2	5,31 ²⁾
Стерильная порция	1,3	10,19	UV	9,8	63,9	4,74	68,5	89,2	4,23 ¹⁾

¹⁾ измерено посредством QC VIE

²⁾ измерено посредством PSP/PSTO

Пример 4

[00168] Окончательные параметры высвобождения из контейнера испытывали в соответствии со схемой производства Gammagard Liquid/KIOVIG и приведены в таблице 11 для опытов с 35 мМ элюирующего буфера. Результаты титра антитела по параметрам высвобождения сведены в таблицу 12 и таблицу 13.

Таблица 11: Результаты испытаний спецификации конечного контейнера с использованием элюирующего буфера 35 мМ СМ сефарозы

Параметр	Единиц а	Спец.	Нативна я	Добавлен ие гепарина	Добавлен ие NaCl	Соответству ющие партии [1]
----------	-------------	-------	--------------	----------------------------	---------------------	-----------------------------------

№ партии с 35 мМ						
АСА	[%]	US/EU: NMT 50% или 1 CH50Ед./мг белка.	31	30	31	
Глицин	[М]	US: 0,21-0,26 EU: 0,20-0,30	0,234	0,229	0,228	0,227-0,234
IgA	[р.г/мл]		42,0	41,2	32,9	-
	[р.г/мл] 10% белка]	EU/US менее 0,14 мг/мл	43,2	39,4	32,7	36-53
IgM	[мг/дл]	для US менее 100	< 4,17	< 4,17	< 4,17	< 1,6
Распределение молекулярных размеров Мономер IgG и Димер полимер IgG Фрагменты IgG (US)	[%]	2 95% менее 2% менее 3% (только US)	99,6 0,13 0,28	99,6 0,13 0,25	99,6 0,16 0,27	н.а.
Осмоляльность	[мОсмо ль/ кг]	EU/US: 240-300	269	265	266	261-269
Плотность	[г/см³]	Инфо	1,032	1,033	1,032	1,031-1,033
рН (разведенный)	-	EU/US: 4,6-5,1, разведено до 1% раствора белка с использованием 0,9% NaCl	4,5	4,5	4,5	4,7-4,8
Активность РКА	[МЕ/мл]	EU: менее 10 МЕ/мл US: менее 10% эталонная	< 4	< 4	< 4	н.а.

		партия CBER 3				
Калликреинопод обная активность	[нмоль/ мл *мин.]	Инфо	< 10	< 10	< 10	
Идентификация белка (человеческого белка)		EU/US: человеческий белок: положительный	положит ельный	положител ьный	положител ьный	положительны й
Композиция белка: чистота		2 98% гамма- глобулин	100	100	100	н.а.
Эндотоксины (LAL)	[МЕ/мл]	менее 1,0 МЕ/мл	< 0,500	< 0,500	< 0,500	н.а.
Общее содержание белка (UV)	[мг/мл]	EU/US: 9,0-11,0 г/100 мл	97,0	104,5	100,9	н.а.
TNBP (три-N- бутил-фосфат)	[м. д.]	менее 1,0 ppm	< 0,2	< 0,2	< 0,2	н.а.
Triton X-100 (Octoxynol 9)	[м. д.]	менее 1,0 ppm	< 0,4	< 0,4	< 0,1	н.а.
TWEEN 80 (полисорбат 80)	[м. д.]	менее 100 ppm	< 26	< 26	< 26	н.а.

Пример 5

[00169] Испытания высвобождения для гемагглютининов к А/к В и антител к D, антител против дифтерии (только US), ВГА (только EU), HBsAg, кори (только US), парвовируса В19 (только EU) и полиомиелита (только US) выполняли для конечных партий контейнеров (см. таблицу 12-35 мМ элюирующего буфера). Все испытания с антителами соответствуют требованиям.

Таблица 12: Уровни антител в FC (МЕ/г белка, рассчитанные относительно общего белка) - 35 мМ элюирующего буфера

Испытание с антителами	Единица	Описание	Нативная	Гепарин	NaCl
Антитела к D	Удовлетворитель но	EU/US: Титр равен или менее эталонного препарата	Удовлетво рительно	Удовлетв орительно	Удовлет воритель

		NIBSC 02/228 или эквивалентного	1:< 2	1:< 2	но 1:< 2
Гемагглютинины, антитела к А/к В	Антитела к А	1:32 (US) или 1:64 (EU)	1:16	1:16	1:16
	Антитела к В	разведения не показывают агглютинации для растворов, содержащих макс. 30 г/л иммуноглобулина	1:16	1:16	1:8
Антитела к дифтерии	[МЕ/мл]	Только US: более 1,2 Ед. US	8,2	9,0	8,6
	[МЕ/г белка]	стандарта антитоксин/мл	77,6	91,5	84,0
Антитела HAV	[МЕ/мл]	EU: более 3,5 МЕ/мл	10,5	10,9	11,0
	[МЕ/г белка]		99,3	110,8	107,5
Антитела HBsAg	[мМЕ/мл]	EU/US: более 0,20 МЕ/мл	9787	14240	>10000
	[МЕ/г белка]	(EU: 2 МЕ/г общего белка)	92,6	144,7	н.а.
Антитела к цистицеркозу	[Частное]	Только US: более чем 0,30-кратный уровень антител эталонного иммуноглобулина против кори СBER	0,63	0,58	0,53
Антитела к парвовирусу В19	[МЕ/мл]	EU: более 50 МЕ/мл	418	401	307
	[МЕ/г белка]		3954	4075	3000
Антитела к полиомиелиту	Частное	Только US: более чем 0,2-кратный уровень антител эталонного иммуноглобулина против полиомиелита СBER	0,98	не обнаружено	0,90

Пример 6

[00170] С целью определения остаточного содержания сериновой протеазы и активности, присутствующих в белковых композициях, полученных из плазмы, определяли профиль амидолитической активности для препаратов IgG из супернатанта плазмы с низким содержанием C1-INH.

Вкратце, был определен профиль амидолитической активности белковых композиций, полученных из плазмы. Испытывал PL-1, профиль амидолитической активности, TGA, NAPTТ, FXIa и белок FXI, результаты суммировали в таблице 13 (35 мМ элюирующего буфера). Как показано в таблице 13, амидолитическая активность,

измеренная с использованием хромогенного субстрата PL-1, была ниже предела количественного определения для всех партий, что демонстрирует высокий восстановительный потенциал последующих процессов, независимо от содержания фосфатов в элюирующем буфере СМ. Данные амидолитической активности, полученные с различными хромогенными субстратами, также показывают очень низкие значения NARTT, в соответствии с испытанием в плазме с дефицитом FXI, не сокращается в образцах конечных контейнеров. FXIa был ниже предела количественного определения при использовании 35 мМ буфера для элюирования СМ при добавлении гепарина. Испытание белка FXI, который обнаруживает не только FXI, но и FXIa, имеет очень низкие значения при добавлении гепарина к DDCPP с использованием 35 мМ элюирующего буфера СМ.

Таблица 13: Амидолитическая активность и прокагулянтная активность, измеренные при FC с использованием 35 мМ элюирующего буфера

Испытание (SOP#)	Единица	Нативный	Гепарин	NaCl
Амидолитическая активность (PL-1) (KVAACPLM)	[нмоль/мл мин.]	< 10	< 10	< 10
Профиль амидолитической активности [нмоль/мл*мин.]	S-2222	< 5	< 5	< 5
	S-2251	< 5	< 5	< 5
	S-2288	< 5	< 5	5,0
	S-2302	< 5	< 5	< 5
Белок FXI	[Ед./мл]	0,33	0,08	0,25
	[Ед. @ 10% белка]	0,34	0,08	0,25
FXIa	[нг/мл]	< 0,5	< 0,5	< 0,5
	[нг/г белка]	н.а.	н.а.	н.а.
NARTT	[мг]	более 10	более 10	более 10
TGA (LE13A18006)	[% нормальной плазмы]	125,21	120,45	190,11

Пример 7

[00171] Испытание белка FXI также является индикатором на протяжении всего производственного процесса. В таблице 14 суммировано общее снижение содержания белка FXI от DDCPP до конечного контейнера. Значения белка FXI в исходном материале установлены на 100%. Основное снижение происходит при обработке аэросилом с последующей фильтрацией. Последующий процесс дополнительно снижал содержание белка FXI до уровней 0,01% от начальных значений.

Таблица 14: Общее снижение белка FXI (% восстановления) из исходного материала DDCPP до FC

Восстановление белка FXI	5000 ME гепарина/л замороженн ого DDCPP	5000 ME гепарина/л незамороженный DDCPP				10000 ME гепарина/л замороженного DDCPP	
Объединенные вещества по Кону - DDCPP	100	100				100	
супернатант I	84	91				90	
Растворенный H+H1	90	88				74	
Фильтрат II+III после обработки аэросилом	14	1,3				Ниже предела количественного определения	
Эмульсионный буфер CM	35 mM pH 8,5	35 mM pH 8,65		35 mM pH 8,5		35 mM pH 8,65	
Суспензия Ppt G	1,5	1,3		1,3		0,08	
Составленный pH на порцию	pH 4,35	pH 4,5	pH 4,65	pH 4,5	pH 4,65	pH 4,5	pH 4,65
Стерильная порция	0,07	0,06	0,10	0,03	0,04	0,01	0,01
Конечный контейнер	0,05	0,06	0,08	0,03	0,04	0,01	0,01

Пример 8

[00172] Затем определяли уровень различных белковых примесей в препаратах IgG из супернатантной плазмы сниженным содержанием C1-INH. Как показано в таблице 15, фибриноген находится ниже предела обнаружения (менее 0,03 мкг/мл), а уровень C3 комплемента (0,04-0,07 мг/дл) значительно ниже предела мониторинга (менее 19,4 мг/дл).

Таблица 15: Содержание остаточного белка в конечном контейнере с использованием 35 mM элюирующего буфера.

[00173] Понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном

Испытание	Единица	Нативный	Гепарин	NaCl
C3 компонент	[мг/мл]	0,53	0,50	0,64
	[мг @ 10% белка]	0,55	0,48	0,63
Фибриноген	[мг/мл]	< 0,03	< 0,03	< 0,03

документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и сферу применения этой заявки и объема

прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патентные и патентные заявки, цитируемые в данном документе, в полном объеме и во всех целях включены посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения обогащенной иммуноглобулином G (IgG) фракции из супернатантной фракции с низким содержанием C1-INH, содержащей IgG, включающий следующее:

(а) связывание обедненной C1-INH супернатантной фракции с гепарином, в результате чего образуется гепаринизированная фракция; а также

(b) выделение IgG из гепаринизированной фракции с образованием обогащенной IgG фракции.

2. Способ по п. 1, в котором супернатантная фракция представляет собой супернатант после адсорбции C1-ингибитора.

3. Способ по п. 1 или 2, в котором супернатантная фракция представляет собой супернатант плазмы.

4. Способ по п. 3, в котором супернатант плазмы представляет собой криосупернатантную плазму с низким содержанием C1-INH.

5. Способ по любому из пп. 1-4, в котором супернатантная фракция имеет низкое содержание одного или более других факторов свертывания крови, выбранных из фактора II, VII, IX и X или их смеси.

6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором супернатантную фракцию концентрируют до значения белка нормальной плазмы перед дополнительной обработкой.

7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором гепарин добавляют в количестве от около 1 до около 20 единиц на мл супернатантной фракции.

8. Способ по п. 7, в котором гепарин добавляют в количестве около 5 единиц на мл супернатантной фракции.

9. Способ по п. 7, в котором гепарин добавляют в количестве около 10 единиц на мл супернатантной фракции.

10. Способ по любому из пп. 1-9, дополнительно включающий перед стадией (а) удаление ингибитора C1-INH-эстеразы (C1-INH) из фракции криосупернатантной плазмы, содержащей C1-INH, образуя таким образом супернатантную фракцию с низким содержанием C1-INH.

11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором фракция с высоким содержанием IgG содержит по меньшей мере около 50% содержания IgG, обнаруженного в супернатантной фракции.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором чистота IgG во фракции с высоким содержанием IgG составляет по меньшей мере 95%.

13. Способ по любому из пп. 1-12, в котором указанное выделение IgG из гепаринизированной фракции в b) включает следующее:

(i) осаждение гепаринизированной фракции с использованием от около 6% до около 10% этанола при pH от около 7,0 до 7,5 с получением осадка фракции I и супернатанта фракции I; и

(ii) осаждение IgG из супернатанта фракции I с использованием от около 18% до

около 27% спирта при pH от около 6,7 до около 7,3 с образованием осадка фракции II+III.

14. Способ по любому из пп. 1-12, в котором указанное выделение IgG из гепаринизированной фракции в b) включает следующее:

(i) осаждение IgG из гепаринизированной фракции с использованием от около 18% до около 27% спирта при pH от около 6,7 до около 7,3 с образованием осадка фракции I+II+III.

15. Способ по п. 13 или 14, дополнительно включающий следующее:

(iii) суспендирование осадка фракции II+III или фракции I+II+III в суспензионном буфере, с образованием таким образом суспензии IgG;

(iv) смешивание мелкодисперсного диоксида кремния (SiO_2) с суспензией IgG в течение по меньшей мере около 30 мин.;

(v) фильтрование суспензии IgG, образуя таким образом фильтрата и осадка на фильтре.

16. Способ по п. 15, дополнительно включающий следующее:

(vi) промывка осадка на фильтре по меньшей мере с 1 мертвым объемом фильтр-пресса промывочного буфера с pH от около 4,9 до около 5,3, с образованием таким образом промывочного раствора;

(vii) объединение фильтрата с промывочным раствором, с образованием таким образом раствора, и обработка раствора моющим средством;

(viii) регулирование pH раствора со стадии (vii) до около 7,0 и добавление этанола до конечной концентрации от около 20% до около 30%, с образованием таким образом осажденного осадка G;

(ix) растворение осадка G в водном растворе, содержащем растворитель и/или моющее средство/моющие средства, и поддержание раствора в течение по меньшей мере 60 мин.;

(x) пропускание раствора через катионообменную хроматографическую колонку и элюирование белков, абсорбированных на колонке в элюате;

(xi) пропускание элюата через анионообменную хроматографическую колонку с образованием проточного выходящего потока;

(x) пропускание выходящего потока через нанофильтр с образованием нанофильтрата;

(xi) концентрация нанофильтрата посредством ультрафильтрации с образованием первого ультрафильтрата;

(xii) диафильтрация первого ультрафильтрата через диафильтрационный буфер с образованием диафильтрата; и

(xiii) концентрация диафильтрата посредством ультрафильтрации с образованием второго ультрафильтрата с концентрацией белка от около 8% (вес/об.) до около 22% (вес/об.), с образованием таким образом фракции с высоким содержанием IgG.

17. Способ по п. 15 или 16, в котором (iv) включает добавления SiO_2 до конечной концентрации от около 0,02 до около 0,10 граммов на грамм осадка фракции II+III или

фракции I+II+III.

18. Способ по п. 16 или 17, в котором (vi) включает промывку осадка на фильтре по меньшей мере 2 мертвыми объемами фильтр-пресса промывочного буфера.

19. Способ по любому из пп. 16-18, в котором х) включает элюирование белков с использованием по меньшей мере 35 мМ дигидрата дигидрофосфата натрия.

20. Способ по любому из пп. 16-19, в котором диафильтрационный буфер в (xii) содержит от около 200 мМ до около 300 мМ глицина.

21. Способ по любому из пп. 16-20, в котором обработка раствора растворителем и/или моющим средством/моющими средствами в (vii) включает по меньшей мере одну стадию инактивации или удаления вирусов.

22. Способ по п. 21, в котором инактивация вируса представляет собой стадию инактивации вируса растворителем/моющим средством (S/D).

23. Способ по любому из пп. 16-22, причем способ дополнительно включает стадию инкубации при низком pH от около 4,0 до около 5,2.

24. Способ по любому из пп. 16-22, причем способ дополнительно включает стадию инкубации при низком pH от около 4,4 до около 4,9.

25. Супернатант после адсорбции фракции C1-ингибитора, содержащий IgG, причем указанная фракция представляет собой фракцию криосупернатантной плазмы с низким содержанием C1-INH по меньшей мере на около 70% общего содержания во фракции криосупернатантной плазмы.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая фракцию с высоким содержанием IgG, полученная в соответствии со способом по любому из пп. 1-24.

27. Фармацевтическая композиция по п. 26, причем композиция содержит по меньшей мере от около 80 до 220 грамм IgG на литр композиции.

28. Фармацевтическая композиция по п. 26 или 27, причем pH фармацевтической композиции составляет от около 4,4 до около 4,9.

По доверенности