

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391001** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.06.01**

(22) Дата подачи заявки  
**2021.10.01**

(51) Int. Cl. *C07K 1/36* (2006.01)  
*A61K 35/16* (2015.01)  
*A61K 9/16* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*B01D 1/18* (2006.01)

---

(54) **ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСУШЕННОЙ  
РАСПЫЛЕНИЕМ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА**

---

(31) **63/086,335**

(32) **2020.10.01**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2021/000680**

(87) **WO 2022/069945 2022.04.07**

(71) Заявитель:

**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:

**Пататаян Жорж, Мурти Рохит,  
Баддур Яссер, Зайденберг Александр  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В настоящем изобретении предложен способ фракционирования плазмы человека, в некоторых вариантах осуществления с применением процедуры фракционирования по Кону. Усовершенствование предусматривает использование для процедуры фракционирования физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека в качестве исходного материала.

---

**A1**

**202391001**

**202391001**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577198EA/026

### ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСУШЕННОЙ РАСПЫЛЕНИЕМ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Эта заявка претендует на приоритет по предварительной заявке на патент США № 63/086 335, поданной 1 октября 2020 г. и озаглавленной «ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ПЛАЗМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСУШЕННОЙ РАСПЫЛЕНИЕМ ПЛАЗМЫ ЧЕЛОВЕКА», которая полностью включена в данный документ посредством ссылки.

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области фракционирования плазмы для отделения терапевтически активных белков от плазмы.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Чтобы облегчить хранение и транспортировку плазмы крови до фракционирования, плазму обычно консервируют путем замораживания вскоре после ее забора у донора. Свежезамороженную плазму (FFP) получают с помощью ряда этапов, включающих центрифугирование цельной крови для отделения плазмы и последующее замораживание собранной плазмы не позже, чем через 8 часов после сбора цельной крови. В альтернативном варианте плазму отбирают у доноров с помощью оборудования для плазмафереза, при котором клетки крови отделяются от плазмы и возвращаются донору. В Соединенных Штатах, стандарт Американской ассоциации банков крови (ААВВ) для хранения FFP составляет до 12 месяцев с момента сбора при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  или ниже. FFP также можно хранить до 7 лет с момента сбора при температуре  $-65^{\circ}\text{C}$  или ниже. Согласно европейским стандартам срок годности FFP составляет 3 месяца при температуре от  $-18^{\circ}\text{C}$  до  $-25^{\circ}\text{C}$  и до 36 месяцев при температуре ниже  $-25^{\circ}\text{C}$ . В соответствии с европейскими стандартами размороженная плазма должна быть перелита немедленно или храниться при температуре от  $1^{\circ}\text{C}$  до  $6^{\circ}\text{C}$  и перелита в течение 24 часов. При хранении более 24 часов плазма должна быть перемаркирована для других целей или утилизирована.

Таким образом, FFP необходимо хранить в среде с контролируемой температурой на протяжении всего срока хранения, чтобы предотвратить деградацию определенных белков плазмы, что увеличивает сложность, стоимость и трудности хранения и транспортировки. Кроме того, FFP необходимо разморозить перед использованием, что приводит к задержке на 30-80 минут, прежде чем его можно будет использовать после извлечения из холодильной камеры. Очевидно, что способ, исключая потребность в холодильной цепи для предварительного фракционирования плазмы, будет означать значительный прогресс в фракционировании от 23 до 28 миллионов литров плазмы, фракционируемой ежегодно. *Burnouf, Transfus. Med. Rev. (2007); 21(2): 101-117.*

Возможным решением для устранения необходимости содержания плазмы в замороженном состоянии стала лиофилизированная плазма. Сухие продукты крови

известны в данной области техники, и преобладающей методикой получения сухого продукта является лиофилизация (сублимационная сушка). Например, в патентах США №№ 4 287 087 и 4 145 185 автора Brinkhous et al. описаны высушенные тромбоциты, которые были зафиксированы сшивающим реагентом, таким как формальдегид. В патентах США №№ 5 656 498; 5 651 966; 5 891 393; 5 902 608; и 5 993 804 описаны дополнительные сухие продукты крови. Такие продукты являются пригодными для терапевтических целей, поскольку они стабильны, имеют длительный срок хранения и потенциально могут использоваться в форме порошка для остановки кровотечения у пациентов, перенесших серьезную травму. Однако в этих публикациях не предлагается фракционирование восстановленной лиофилизированной плазмы.

Внедрение высушенной распылением плазмы в процесс фракционирования может устранить необходимость в холодной цепи предварительного фракционирования. Распылительная сушка - это технология, при которой раствор распыляется в потоке проточного газа для быстрого испарения растворителя (например, обезвоживания). В результате в субсекундном масштабе времени образуются микрочастицы, состоящие из остаточного растворителя. Распылительную сушку применяют в качестве промышленного процесса в материальной, пищевой и фармацевтической промышленности уже несколько десятилетий. В последнее время распылительная сушка облегчила приготовление белковых терапевтических препаратов в виде микрочастиц для ингаляции (Maltesen, et al., Eur J Pharm Biopharm 70, 828-838 (2008)).

Восстанавливаемая, высушенная распылением цельная плазма использовалась при травмах и на поле боя. Хотя она не идеальна, ее пригодность заключается в возможности хранения в самых разных условиях без морозильных или холодильных камер, доступности для использования специалистами первой медицинской помощи на начальном этапе ее оказания, а также в том, что ее можно перелить за считанные минуты без 30-45-минутной задержки, связанной с оттаиванием замороженной плазмы.

Несмотря на потенциально привлекательную целесообразность, процесс распылительной сушки при определенных условиях и параметрах может нанести вред белкам плазмы. При распылительной сушке белки плазмы подвергаются высоким нагрузкам во время процесса аэролизации, поскольку плазма проходит через узкое отверстие под воздействием высокой скорости воздушного потока, необходимого для создания капель подходящего размера для сушки. Во-вторых, при распылительной сушке белки плазмы подвергаются воздействию высоких температур, необходимых для вытеснения воды из аэролизированных капель. В-третьих, в процессе распылительной сушки белки плазмы подвергаются резкому и быстрому повышению pH в результате быстрого выделения CO<sub>2</sub> во время сушки.

Процесс распылительной сушки, в зависимости от параметров, может уменьшить количество некоторых крупных мультимерных белков (например, фактора фон Виллебранда (vWF)), разрушить крупные белки на более мелкие белковые фрагменты, и/или повлиять на активность/функциональность белков. Поскольку целью

фракционирования плазмы является выделение (или обогащение) физиологически функциональных белков плазмы в различные фракции, специалист в данной области техники не будет искать или находить предложения или мотивацию в области распылительной сушки или лиофилизации в отношении включения высушенной распылением плазмы в качестве исходного материала для фракционирования плазмы для получения интактных, физиологически активных белковых фармакологических агентов.

Соответственно, до изобретения, описанного в данном документе, не было очевидно, что белки в различных фракциях (например, фракции холодного этанола) могут быть регенерированы путем фракционирования восстановленной высушенной распылением плазмы в количествах, достаточно значимых для того, чтобы затраты на фракционирование восстановленной физиологически активной плазмы были оправданными. Кроме того, было неизвестно, будет ли восстановленная физиологически активная высушенная распылением плазма действовать аналогично свежемороженой плазме при фракционировании по методу Кона (Cohn) (или его известной модификации). Авторы изобретения обнаружили, что этот способ фракционирования действительно осуществим, и разработали экономически целесообразное фракционирование по Кону или фракционирование по Кистлеру-Нитшману (Kistler-Nitschman) или другой метод (например, методы Герлоу (Gerlough), Хинка (Hink) и Малфорда (Mulford)), начинающийся с восстановленной распылением высушенной плазмы. См., например, публикацию Kistler et al., *Vox. Sang.* (1962); 7(4), С. 414-424; Graham, et al. *Subcellular Fractionation, a Practical Approach*. Oxford University Press. 1997.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Учитывая широкое использование терапевтических композиций белков крови, полученных из плазмы, таких как композиции иммуноглобулинов, альбуминов, ингибиторов протеаз, факторов свертывания крови, ингибиторов факторов свертывания крови и белков системы комплемента, обеспечение адекватного, экономичного, экологически чистого и устойчивого доступа для эффективных и безопасных композиций белков крови, полученных из плазмы, имеет первостепенное значение.

Прогнозируется, что в 2019 году рынок продуктов плазмы крови вырастет по совокупному среднегодовому темпу роста (CAGR) на 6,8% и достигнет 28,5 млрд долларов в 2023 году с 20,5 млрд долларов в 2018 году. У 2016 году глобальная мощность фракционирования составила около 70,7 млн литров за год. Замороженная плазма транспортируется из донорских центров в центры фракционирования. Расходы на холодовую цепь в биофармацевтике, сектором которой является фракционирование плазмы, оценивались в 2020 году примерно в 17,2 млрд долларов по сравнению с 15,7 млрд долларов в 2019 году. “2020 Biopharma Cold Chain Sourcebook forecasts a \$17.2-billion logistics market” - *Pharmaceutical Commerce*, April 27, 2020. Очевидно, что экономические и экологические аспекты хранения и транспортировки многих миллионов литров замороженной плазмы, хранящейся в холодильной камере, продолжают оставаться важным фактором в индустрии плазмы. См., например, публикацию Robert P, Hotchko M.

Worldwide 2016 Plasma Protein Sales - Marketing Research Bureau, Inc. Published December 1, 2017.

Настоящее изобретение решает эти и другие проблемы, обеспечивая процесс фракционирования плазмы, полученной из физиологически активной плазмы, высушенной распылением. Помимо создания эффективных и безопасных композиций, настоящее изобретение обеспечивает способ выделения жизненно важных белков плазмы с использованием источника плазмы, который менее требовательный к компонентам холодной цепи, а также более прост и экономичен при транспортировке из донорских центров на объекты фракционирования, чем жидкая плазма.

В рамках настоящего изобретения было неожиданно обнаружено, что физиологически активная высушенная распылением и восстановленная плазма является эффективным исходным материалом для приготовления белковых терапевтических агентов путем фракционирования физиологически активной восстановленной плазмы. В различных вариантах осуществления белки, которые обычно обнаруживаются в различных фракциях по Кону, расположенных в производственном процессе ниже от физиологически активной плазмы, высушенной распылением, содержатся в этих фракциях с показателями выхода и чистоты, сравнимыми с теми, которые характерны для соответствующих фракций в процессе, начинающемся с замороженной плазмы.

Типовой способ по настоящему изобретению включает: получение восстановленного раствора физиологически активной плазмы, приготовленного путем восстановления порошка физиологически активной высушенной распылением плазмы в жидкости для восстановления; и подачу физиологически активной восстановленной плазмы на один или большее количество процессов фракционирования плазмы (например, фракционирование холодным этанолом).

Физиологически активная плазма, высушенная распылением, характеризуется преимуществами длительного хранения при комнатной температуре или стандартном охлаждении; удобством хранения и транспортировки благодаря уменьшенному весу и объему; универсальностью, долговечностью и простотой, а также возможностью легкого и быстрого восстановления и использования на месте фракционирования. Физиологически активную плазму, высушенную распылением, предпочтительно можно хранить по меньшей мере около 2-3 лет практически при любой температуре (например, от  $-180^{\circ}\text{C}$  до  $40^{\circ}\text{C}$ ). Публикация США 2019/0298765. Затраты, связанные с хранением и транспортировкой физиологически активной высушенной распылением плазмы, значительно ниже, чем для жидкой плазмы, благодаря ее меньшему весу и более широкому диапазону допустимых температур по сравнению с замороженной плазмой.

Физиологически активная высушенная распылением плазма, используемая в настоящем изобретении, может быть получена либо в периодическом (отдельная единица), либо в непрерывном (например, объединенные единицы) режиме производственного процесса.

В настоящем изобретении также предлагается система обработки плазмы,

предпочтительно система, соответствующая принципам cGMP, которая используется, *среди прочего*, для фракционирования плазмы, введенной в процесс фракционирования посредством раствора восстановленного физиологически активного порошка плазмы, высушенной распылением. Исходная физиологически активная высушенная распылением плазма может быть высушена из плазмы непосредственно в конечный, прикрепленный стерильный контейнер, который впоследствии может быть перенесен в резервуар для восстановления, где высушенная плазма быстро и легко восстанавливается до состояния и концентрации, подходящих для фракционирования. В месте фракционирования физиологически активная высушенная распылением плазма может быть быстро восстановлена.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фиг. 1** представляет собой обобщенную блок-схему типовой процедуры фракционирования по методу Кона.

**Фиг. 2.** представляет собой схему типового устройства для распылительной сушки, используемого при осуществлении настоящего изобретения.

**Фиг. 3** представляет собой таблицу, отображающую активность факторов свертывания для размороженной плазмы, полученной из FFP, для нескольких факторов свертывания. Порошок физиологически активной плазмы, высушенной распылением, описанного в данном документе типа, может проявлять по существу аналогичную коагуляционную активность в отношении одного или большего количества или всех перечисленных факторов. (2019/0298765).

**На Фиг. 3** представлены типовые этапы модельного процесса распылительной сушки, а также данные, полученные в результате восстановления и анализа композиции по настоящему изобретению.

**Фиг. 4** представляет собой таблицу параметров для образцов плазмы, полученных методом распылительной сушки.

**Фиг. 5А** и **Фиг. 5В**, вместе взятые, представляют собой таблицу результатов анализа после восстановления, подобного описанному в Примере 2.

**Фиг. 6** представляет собой типовые блок-схемы для двух различных процессов фракционирования, начиная с исходного материала плазмы, высушенной распылением, ТЕСТ 1 и ТЕСТ 2, подробно описанные в Примере 3 и на **Фиг. 7А-7Д**.

**Фиг. 7А-7Д** представляют собой таблицу результатов ТЕСТ 1, ТЕСТ 2 и ТЕСТ 3 (начатых на фракции V).

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

#### **I. Введение**

Составляя около 55% от общего объема цельной крови, плазма крови является компонентом цельной крови, в котором взвешены клетки крови и другие составляющие цельной крови. Кроме того, плазма крови содержит смесь из более чем 700 белков и дополнительных веществ, которые выполняют функции, необходимые для здоровья организма, включая свертывание крови, депонирование белков, электролитический баланс

и др. Плазма крови, выделенная из цельной крови, может использоваться для замены биологических жидкостей, антител и факторов свертывания. Соответственно, плазма крови широко используется в медицинских целях.

В настоящее время миллионы литров плазмы фракционируются в год в процессе, требующем холодной цепи для плазмы от центра сбора до места фракционирования, при этом замороженная плазма хранится в морозильных камерах и размораживается непосредственно перед фракционированием. Поддержание холодной цепи во время доставки плазмы из мест сбора в места фракционирования является сложным с точки зрения логистики, ресурсоемким и дорогостоящим элементом процесса и бизнеса фракционирования плазмы, который можно оптимизировать за счет инноваций, ориентированных на устойчивость. Устранение холодной цепи или компонента холодной цепи приводит к повышению технологической и экономической эффективности, а также к более «зеленому» и устойчивому процессу.

Как указано в следующих разделах, настоящее изобретение, в котором начинается фракционирование с восстановленной физиологически активной высушенной распылением плазмы, придает указанному процессу фракционирования многочисленные преимущества и другие выгоды.

Далее будет подробно описана реализация типовых вариантов осуществления настоящего изобретения, как показано в сопроводительных графических материалах. На всех графических материалах и в последующем подробном описании для обозначения одинаковых или подобных частей будут использоваться одинаковые ссылочные обозначения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что следующее подробное описание является только иллюстративным и ни в коей мере не является ограничивающим. Квалифицированным специалистам, извлекающим пользу из настоящего изобретения, будут легко предложены другие варианты осуществления настоящего изобретения.

В интересах ясности, не все обычные признаки описанных в данном документе вариантов осуществления показаны и описаны. Следует понимать, что при разработке любого такого фактического варианта осуществления принимаются многочисленные специфические решения для достижения конкретных целей производителя плазменных продуктов, таких как соблюдение ограничений, связанных с применением и бизнесом, и что эти конкретные цели будут отличаться от одного варианта осуществления к другому и от одного производителя плазменных продуктов к другому. Кроме того, следует понимать, что такая разработка может быть сложной и трудоемкой, но, тем не менее, будет обычным инженерным проектом для специалистов в данной области техники, извлекающим пользу из настоящего изобретения.

Множество модификаций и вариаций типовых вариантов осуществления настоящего изобретения, изложенных в этом документе, могут быть выполнены без отклонения от сущности и объема типовых вариантов осуществления, как будет очевидно специалистам в данной области техники. Конкретные типовые варианты осуществления,

описанные в данном документе, предлагаются только в качестве примера, и настоящее изобретение должно быть ограничено только условиями прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется такая формула изобретения.

## **II. Сокращения и определения**

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, обычно имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой относится данное изобретение. Как правило, номенклатура, используемая в настоящем документе, и лабораторные процедуры в области органической химии, фармацевтических препаратов и медицинской визуализации хорошо известны и широко применяются в данной области техники.

### ***a. Сокращения***

В контексте данного документа сокращение «aPTT» относится к активированному частичному тромбопластиновому времени, показателю эффективности, известному в данной области техники, измеряющему эффективность как «внутреннего» (иногда называемого контактным путем активации), так и общих путей коагуляции.

В контексте данного документа сокращение «PT» относится к протромбиновому времени, показателю эффективности, известному в данной области техники в отношении внешнего пути коагуляции.

В контексте данного документа сокращение «FGN» относится к фибриногену (также называемому в данной области техники Фактором I), нерастворимому гликопротеину плазмы, синтезируемому печенью, который преобразуется тромбином в фибрин в процессе коагуляции.

В контексте данного документа сокращение «PC» относится к белку C, также известному как аутопротромбин HA и фактор свертывания крови XIV.

В контексте данного документа сокращение «PS» относится к белку S, витамин K-зависимому гликопротеину плазмы, синтезируемому в эндотелии. В циркуляторном русле белок S существует в двух формах: свободная форма и комплексная форма, связанная с белком комплемента C4b. У человека белок S кодируется геном PROS1.

В контексте данного документа термин «Фактор», за которым следует римская цифра, относится к серии белков плазмы, которые связаны между собой посредством сложного каскада реакций, катализируемых ферментами, включающих последовательное расщепление больших белковых молекул с образованием пептидов, каждый из которых превращает неактивный предшественник зимогена в активный фермент, что приводит к образованию фибринового сгустка. К ним относятся: Фактор I (фибриноген), Фактор II (протромбин), Фактор III (тканевой тромбопластин), Фактор IV (кальций), Фактор V (проакцелерин), Фактор VI (более не считается активным в гемостазе), Фактор VII (проконвертин), Фактор VIII (антигемофильный фактор), Фактор IX (плазменный тромбопластин; Фактор Кристмаса), фактор X (фактор Стюарта), Фактор XI (плазменный предшественник тромбопластина), Фактор XII (фактор Хагемана) и Фактор XIII (фибрин-

стабилизирующий фактор).

Термин «FP24» относится к замороженной плазме, приготовленную из цельной крови, которая должна быть отделена и помещена при температуре  $-18^{\circ}\text{C}$  или ниже в течение 24 часов после взятия цельной крови. Используемый раствор антикоагулянта и объем компонента указаны на этикетке. В среднем, объемы составляют от 200 до 250 мл. Этот компонент плазмы является источником нелабильных белков плазмы. Уровни Фактора VIII значительно снижаются, а уровни Фактора V и других лабильных белков плазмы изменяются по сравнению с FFP. Этот компонент плазмы служит источником белков плазмы для пациентов с дефицитом или дефектом белков плазмы. Уровни факторов свертывания крови могут быть ниже, чем уровни в FFP, особенно лабильных Факторов свертывания крови V и VIII.

### ***в. Определения***

В контексте данного документа форма единственного числа используется для обозначения одного или более чем одного (т. е. по меньшей мере одного) грамматического объекта описания. В качестве примера, «белок» означает один белок или более одного белка.

В данном контексте термины «метод Кона» и «фракционирование по Кону» используются взаимозаменяемо и в общем понимании относятся к методу разделения плазмы человека посредством ряда этапов, включая осаждение этанолом при различных концентрациях, изменения pH, изменения температуры, изменения ионной силы, что приводит к получению фракций, обогащенных определенными белками плазмы. См., например, патент США № 2 390 074. **На Фиг. 1** представлена типовая блок-схема метода Кона. В контексте данного документа термины «метод Кона» и «фракционирование по Кону» также относятся к многочисленным вариациям и усовершенствованиям этого новаторского процесса, например, как описано в публикации Kistler-Nitschmann Process (Kistler et al. (1952), Vox Sang, 7, 414-424). Другие процессы, применяемые в способах по настоящему изобретению, включают способ выделения IgG, изложенный в патенте США № 8 940 877.

«Плазма» представляет собой жидкость, которая остается после центрифугирования крови (например) для удаления клеточных материалов, таких как эритроциты, лейкоциты и тромбоциты. Плазма обычно желтого цвета, прозрачная или непрозрачная. Кровь, которая сдаётся и обрабатывается для отделения плазмы от других определенных компонентов крови и не замораживается, называется «незамороженной» плазмой. Плазма, замороженная в течение 8 часов до температур, описанных в данном документе, называется в данном документе «свежезамороженной плазмой» («FFP»). Она содержит растворенные компоненты крови, такие как белки (6-8%; например, сывороточные альбумины, глобулины, фибриноген и т.д.), глюкоза, факторы свертывания (белки свертывания), электролиты ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  и т.д.), гормоны и т.д. Плазма цельной крови (WB) представляет собой плазму, выделенную из цельной крови без добавления агентов, кроме антикоагулянта(ов). Цитрат-фосфат-декстрозная (CPD)

плазма, как следует из названия, содержит цитрат, фосфат натрия и сахар, обычно декстрозу, которые добавляют в качестве антикоагулянтов.

«Жидкая плазма» относится к плазме, отличной от плазмы, высушенной распылением.

«Регенерированная плазма» относится к плазме, которая отделена не позднее, чем через 5 дней после истечения срока годности цельной крови, и хранится при температуре от 1 до 6° С. Профиль белков плазмы в жидкой плазме изучен недостаточно. Уровни и состояние активации коагуляционных белков в жидкой плазме зависят от времени контакта с клетками, а также от условий и продолжительности хранения и изменяются со временем. Этот компонент служит источником белков плазмы. Уровни и состояние активации белков свертывания переменны и меняются со временем.

«Размороженная плазма» относится к плазме, полученной из FFP или FP24, приготовленной с использованием асептических методов (закрытая система), размороженной при температуре от 30 до 37° С, и выдерживаемой при температуре от 1 до 6° С в течение 4 дней после истечения первоначального 24-часового периода после оттаивания. Размороженная плазма содержит стабильные факторы коагуляции, такие как Фактор II и фибриноген, в концентрациях, сходных с таковыми в FFP, но с переменным снижением количества других факторов.

«Свежезамороженная плазма» («FFP») относится к плазме, полученной из цельной крови или в результате аферезного сбора и замороженной при температуре -18° С или ниже в течение времени, указанного в инструкциях по применению для соответствующего сбора, обработки и хранения системы крови (например, замороженной в течение восьми часов после взятия). В среднем объемы составляют от 200 до 250 мл, но объемы, полученные при аферезе, могут составлять от 400 до 600 мл. FFP содержит белки плазмы, включая все факторы свертывания крови. FFP содержит высокие уровни лабильных Факторов свертывания крови V и VIII.

В контексте данного документа термин «высушенная распылением плазма» относится к физиологически активному порошку плазмы, который при восстановлении содержит белки, которые не были повреждены до такой степени, чтобы потерять по существу всю свою физиологическую активность. Физиологическая активность порошка плазмы в восстановленной форме может быть определена рядом параметров, известных в данной области техники, включая, помимо прочего: протромбиновое время (PT), активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT), уровень фибриногена, уровень белка С и уровень белка S. На физиологическую активность порошка плазмы в его восстановленной форме могут указывать уровни фактора свертывания крови или активности других белков, известных в данной области техники, включая, помимо прочего: Фактор II, Фактор V, Фактор VII, Фактор VIII, Фактор IX, и Фактор X; активность фибриногена; антигенсвязывающая активность IgG; активность A1PI; активность антитромбина III; активность альфа-2-антиплазмина; и активность альфа-1-антитрипсина. Эти параметры могут быть измерены с помощью методов, известных в

данной области техники, например, с помощью имеющихся в продаже инструментов. Типовую плазму, высушенную распылением, высушивают с помощью способов, описанных в патентах США №№ 8 601 712; 8 595 950; 8 533 972; 8 533 971; 8 434 242; и 8 407 912.

В контексте данного документа термин «физиологически активная восстановленная плазма» и варианты этого термина относятся к восстановленному порошку физиологически активной плазмы, высушенной распылением, который содержит белки, которые не были повреждены распылительной сушкой и/или восстановлением до такой степени, чтобы потерять по существу всю их физиологическую эффективность при терапевтической схеме, при котором белок(и) вводят для лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении. В типовом варианте осуществления физиологически активная восстановленная высушенная распылением плазма сохраняет по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40% или по меньшей мере около 50% активности фактора свертывания плазмы до распылительной сушки и восстановления. В некоторых вариантах осуществления физиологически активная восстановленная высушенная распылением плазма сохраняет от около 30% до около 70%, от около 40% до около 60% активности фактора свертывания плазмы до распылительной сушки и восстановления. В различных вариантах осуществления активность IgG в физиологически активной восстановленной плазме составляет не менее 50%, не менее 60%, не менее 70%, не менее 80%, не менее 90%, не менее 95%, не менее 99% активности IgG в плазме до распылительной сушки.

Физиологическая активность одного или большего количества компонентов порошка плазмы, высушенной распылением, в его восстановленной форме определяется стандартными тестами и может быть оценена рядом параметров, известных в данной области техники, включая, помимо прочего: протромбиновое время (PT), активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT), уровень фибриногена, уровень белка C и уровень белка S. На физиологическую активность порошка плазмы в его восстановленной форме могут указывать уровни фактора свертывания крови или активности других белков, известных в данной области техники, включая, помимо прочего: Фактор II, Фактор V, Фактор VII, Фактор VIII, Фактор IX, и Фактор X; активность фибриногена; антигенсвязывающая активность IgG; активность A1PI; активность антитромбина III; активность альфа-2-антиплазмина; и активность альфа-1-антитрипсина.

«Жидкость для восстановления» представляет собой водную жидкость, с которой контактирует порошок физиологически активной плазмы, высушенной распылением, для перевода порошка в раствор/суспензию с образованием «восстановленной плазмы» (т.е. физиологически активной восстановленной плазмы). Раствор для восстановления может включать одну или большее количество солей, один или большее количество буферов, одну или большее количество аминокислот, один или большее количество суспендирующих агентов и тому подобное, а также любую пригодную их комбинацию. Типовые добавки в жидкости для восстановления выбирают по их способности

стабилизировать белки в жидкости и предотвращать, уменьшать или замедлять повреждение белков и/или потерю активности белков во время процесса восстановления. Типовые жидкости для восстановления включают воду для инъекций, натрий-фосфатный буфер, ацетатный буфер, водные растворы, включающие одно или большее количество физиологически приемлемых поверхностно-активных веществ (например, полисорбат 80), и те, которые описаны в публикациях США 2017/0370952; 2017/0370952; а также 2010/0273141.

«Заболевание» представляет собой состояние здоровья животного, при котором животное не может поддерживать гомеостаз, и если заболевание не устраняется, то здоровье животного продолжает ухудшаться. В различных вариантах осуществления один или большее количество белков из фракционированной восстановленной физиологически активной плазмы, высушенной распылением, применяют для лечения одного или большего количества заболеваний.

### **III. Варианты осуществления**

#### ***A. Композиции и устройства***

Варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам фракционирования физиологически активной плазмы, восстановленной из плазмы, высушенной распылением, и белковых препаратов, полученных в результате такого фракционирования.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается одна или большее количество фракций плазмы, которые являются продуктом процесса фракционирования плазмы, начинающегося с восстановленной физиологически активной высушенной распылением плазмы. В типовом варианте осуществления фракция представляет собой фракцию, полученную по Кону, как этот термин понимается в данной области техники. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается раствор физиологически активной плазмы, восстановленной из высушенной распылением плазмы с использованием жидкости для восстановления, выбранной для обеспечения, облегчения или ускорения последующего фракционирования восстановленной плазмы. В различных вариантах осуществления физиологически активный раствор восстановленной плазмы помещают в резервуар для восстановления, совместимый с одним или большим количеством дополнительных компонентов, используемых при фракционировании плазмы. В типовом варианте осуществления восстановленная физиологически активная плазма в резервуаре для восстановления является компонентом системы фракционирования. В типовом варианте осуществления система фракционирования представляет собой систему фракционирования по Кону или известную модификацию этой системы.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается одна, две, три, четыре, пять или большее количество уникальных композиций фракций плазмы, расположенных в производственном процессе после исходного материала физиологически активной восстановленной высушенной плазмы. В типовом варианте

осуществления указанная композиция представляет собой криопасту и/или криообедненную плазму. В различных вариантах осуществления указанная композиция представляет собой пасту Фракции I и содержит фибриноген или супернатант Фракции I. В различных вариантах осуществления указанная композиция представляет собой пасту Фракции II+III и содержит IgG или супернатант Фракции II+III. В различных вариантах осуществления указанная композиция представляет собой пасту Фракции IV-1 и содержит A1PI и/или AT-III или супернатант Фракции IV-1. В типовом варианте осуществления указанная композиция представляет собой пасту Фракции IV-4 и/или супернатант Фракции IV-4. В различных вариантах осуществления указанная композиция представляет собой пасту Фракции V и содержит альбумин или супернатант Фракции V. В различных вариантах осуществления фракция по настоящему изобретению содержит в основном FVIII и/или Фактор фон Виллебранда. В некоторых вариантах осуществления фракция по настоящему изобретению включает в основном протромбин, и/или Фактор VII, и/или FIX, и/или FX. В некоторых вариантах осуществления фракция по настоящему изобретению содержит в основном IgG. В типовом варианте осуществления фракция по настоящему изобретению включает в основном A1PI и/или AT-III. В некоторых вариантах осуществления фракция по настоящему изобретению включает в основном альбумин. В типовом варианте осуществления фракция или фракции представляют собой одну или большее количество фракций по Кону.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается препарат фактора свертывания крови, полученный с помощью способа по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления препарат фактора свертывания крови выбирают из Фактора VIII, Фактора IX, протромбинового комплекса, Фактора фон Виллебранда, фибриногена и комбинации любых двух или большего количества из них.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается препарат поливалентных и/или гипериммунных иммуноглобулинов (IgG), полученный с помощью способа по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления IgG выбирают из гипериммунного иммуноглобулина против RhO, гипериммунного иммуноглобулина против гепатита В, гипериммунного иммуноглобулина против бешенства, гипериммунного иммуноглобулина IgG против столбняка и комбинации любых двух или большего количества из них.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается препарат ингибиторов протеазы, полученный с помощью способа по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления ингибитор протеазы выбирают из альфа-1-антитрипсина, С1-ингибитора и т.д.) и их комбинации.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается препарат одного или большего количества антикоагулянтов, приготовленный с помощью способа по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления указанный препарат содержит антитромбин, например, AT-III.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается препарат

альбумина, полученный с помощью способа по настоящему изобретению.

В типовом варианте осуществления фракция, выделенная в соответствии с настоящим изобретением, имеет характеристики, по существу идентичные характеристикам тех же самых фракций, выделенных таким же образом из замороженной плазмы с помощью известных в данной области техники способов. В различных вариантах осуществления характеристики фракции отличаются от характеристик тех же фракций, выделенных таким же образом из замороженной плазмы с помощью известных в данной области техники способов. В предпочтительном варианте осуществления изменяющиеся характеристики соответствуют одному или большему количеству параметров, имеющих нормативное значение, и характеристика изменяется в диапазоне таких одного или большего количества параметров на величину, считающуюся незначительной с точки зрения соответствующих нормативных требований для этой фракции, т. е. фармацевтическая композиция, включающая фракцию или белок, выделенный из фракции, не требует нового рассмотрения регулирующими органами или разрешения на продажу

В типовом варианте осуществления описанный способ обеспечивает получение водного раствора альбумина, содержащего по меньшей мере 5% или по меньшей мере 25% по объему альбумина и пригодного для внутривенной инъекции, при этом указанный раствор остается стабильным без осаждения альбумина после выдержки при температуре 45°C в течение одного месяца. Этот раствор выделяют путем фракционирования из раствора физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается препарат белка в криопасте, выделенного из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выбранного из Фактора VIII, Фактора IX и их комбинации. Препарат содержит белок в количестве не менее 80% от выхода, при котором этот белок выделяют из свежемороженой плазмы. В различных вариантах осуществления активность белка составляет не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% активности белка, выделенного из свежемороженой плазмы.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается препарат IgG, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека. Указанный препарат содержит IgG в количестве не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от количества, обнаруженного в идентичном препарате, в котором IgG выделен из свежемороженой плазмы. В различных вариантах осуществления активность IgG составляет не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% активности IgG, выделенного из свежемороженой плазмы.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается белок, выделенный из Фракции IV-1 фракционированной физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выбранный из A1PI, AT-III

и их комбинации, выделенный с выходом не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежзамороженной плазмы. В различных вариантах осуществления белок, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека во Фракции IV-1, имеет активность не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от активности белка, выделенного из свежзамороженной плазмы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ, в котором альбумин, выделенный из Фракции V физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежзамороженной плазмы. В различных вариантах осуществления альбумин, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, имеет активность не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от активности альбумина, выделенного из свежзамороженной плазмы.

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтический состав, содержащий одну из фракций по настоящему изобретению, или белковый компонент одной или большего количества таких фракций, дополнительно очищенный от такой фракции. Различные фармацевтические составы также включают фармацевтически приемлемый носитель, в котором содержатся белки во фракции (или расположенные ниже в производственном процессе, где они дополнительно очищаются).

В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается фармацевтический состав по настоящему изобретению, упакованному в устройство для введения фармацевтического состава субъекту, нуждающемуся в таком введении, например, шприц, инфузионный пакет и т.п. В различных вариантах осуществления указанное устройство содержит стандартную лекарственную форму активного белка для введения субъекту, нуждающемуся в таком введении. В типовом варианте осуществления стандартная доза представляет собой стандартную дозу, признанную в данной области техники, для субъекта.

### ***В. Способы***

В настоящем изобретении предлагается новый способ фракционирования плазмы, начинающийся с физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы в качестве исходного материала. Типовой способ по настоящему изобретению включает: получение раствора физиологически активной плазмы, приготовленного путем восстановления порошка физиологически активной плазмы в жидкости для восстановления; и подвергание восстановленной таким образом физиологически активной плазме одному или большему количеству процессов фракционирования. Типовым способом фракционирования является фракционирование по Кону, фракционирование по Кистлеру-Нитчману и их разновидности. **Фиг. 1.**

Высушенная распылением плазма, применяемая в способах по настоящему изобретению, может быть высушена после объединения в пул или по отдельности.

Объединение нескольких объемов плазмы имеет некоторые преимущества. Например, любой дефицит фактора регенерирования на основе равного объема может быть компенсирован путем добавления объема из пула к готовому продукту. Существуют и отрицательные черты. Восполнение объема из пула для оптимизации фактора регенерирования является дорогостоящим. Важно отметить, что объединенную в пул плазму необходимо постоянно тестировать на патогены, поскольку любые патогены, попадающие в пул, например, от одного донора, представляют риск нанесения вреда сотням или тысячам пациентов, если их не обнаружить.

В различных вариантах осуществления высушенная распылением плазма поступает на установку для дальнейшей обработки, например, фракционирования, в любой удобной форме. В типовом варианте осуществления высушенная распылением плазма поступает в установку в герметичном контейнере, например, в герметичном пластиковом пакете. Содержимое контейнера переносится в резервуар для восстановления. В типовом варианте осуществления перенос осуществляется в чистой комнате или в других асептических условиях. В некоторых вариантах осуществления контейнер сконфигурирован таким образом, что его можно присоединить к отверстию в резервуаре для восстановления, и высушенную распылением плазму можно переносить непосредственно в резервуар для восстановления, не подвергая воздействию атмосферы окружающей установки. В этой конфигурации перенос может выполняться в чистой комнате или вне этой среды. Перенос может быть облегчен различными средствами переноса порошка, включая механические (например, шнеки, вибраторы), пневматические и вакуумные средства.

В типовом варианте осуществления плазма контактирует с одним или большим количеством антикоагулянтов перед распылительной сушкой. Типовым антикоагулянтом является цитратная соль, например, цитрат натрия.

Порошок физиологически активной плазмы, высушенной распылением, восстанавливается в резервуаре для восстановления путем контакта порошка с жидкостью для восстановления. Приведение в контакт можно проводить в любом удобном формате (т. е. порядок добавления, температура, разбавление, перемешивание и т. д.).

Белки потенциально подвергаются физической деградации с помощью ряда механизмов (например, клиппирование, окисление, развертывание, агрегация, образование нерастворимых частиц). Многие белки структурно нестабильны в растворе и подвержены конформационным изменениям из-за различных воздействий, возникающих во время очистки, обработки и хранения. Эти воздействия включают температурный сдвиг, воздействие изменений рН и экстремальных значений рН, напряжение сдвига, поверхностную адсорбцию/напряжение на границе раздела и т.д. Типовая жидкость для восстановления оказывает защитное действие на один или большее количество белков в высушенной распылением плазме, предотвращая или уменьшая деградацию, агрегацию или другие негативные последствия во время восстановления, тем самым сохраняя физиологическую активность.

В одном варианте осуществления по меньшей мере часть порошка физиологически активной плазмы, высушенной распылением, добавляют в резервуар для восстановления, в который ранее была загружена по меньшей мере часть жидкости для восстановления. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть жидкости для восстановления добавляют по меньшей мере к части порошка физиологически активной плазмы, высушенной распылением, который был загружен в резервуар для восстановления. В любом из этих форматов содержимое резервуара можно перемешивать любым удобным способом в любой момент до, во время или после контакта порошка и жидкости для восстановления. В типовом варианте осуществления содержимое резервуара для восстановления взбалтывают путем перемешивания.

Один компонент восстанавливающей смеси (высушенная распылением плазма или жидкость для восстановления) добавляется к другому со скоростью и в таком объеме, которые определены для получения полезных результатов при восстановлении. Таким образом, один компонент может быть добавлен к другому, находящемуся в резервуаре для восстановления, медленно, быстро или в виде объемного болюса.

В различных вариантах осуществления плазму восстанавливают в резервуаре путем приведения в контакт перемешиваемой жидкости для восстановления в резервуаре с порошком физиологически активной плазмы, высушенной распылением. Жидкость для восстановления можно перемешивать или иным образом взбалтывать. Порошок физиологически активной плазмы, высушенной распылением, можно добавлять к жидкости быстро, медленно или в виде объемного болюса.

В некоторых вариантах осуществления резервуар для восстановления загружают по меньшей мере частью порошка физиологически активной плазмы, высушенной распылением, который необходимо восстановить, и порошок перемешивают или иным образом взбалтывают. В альтернативном варианте порошок физиологически активной плазмы не перемешивают или иным образом не взбалтывают. Жидкость для восстановления добавляется к порошку в резервуаре. Применяют многочисленные способы добавления, например, добавление жидкости непосредственно к порошку или добавление жидкости к порошку физиологически активной плазмы, высушенной распылением, путем выливания через боковые стенки резервуара. Жидкость можно добавлять быстро, медленно или в виде одного или большего количества болюсов.

В различных вариантах осуществления по меньшей мере часть порошка физиологически активной плазмы, высушенной распылением, и по меньшей мере часть жидкости для восстановления добавляют по существу одновременно в резервуар для восстановления, который может быть пустым или может уже содержать порошок физиологически активной плазмы, высушенной распылением, жидкость для восстановления или их комбинацию.

Как будет понятно специалистам в данной области техники, любой из этих способов контактирования можно осуществлять по отдельности или в любой комбинации или в любом порядке.

Типовой жидкостью для восстановления является физиологически совместимая жидкость.

Жидкость для восстановления представляет собой жидкость на водной основе, которая способна восстанавливать высушенную распылением плазму и минимизировать повреждение (например, денатурацию, агрегацию, потерю активности) белковых компонентов плазмы, а также потерю или снижение основных характеристик и активности(активностей).

Типовой жидкостью для восстановления является вода для инъекций (WFI) или физиологический солевой раствор. В различных вариантах осуществления pH жидкости для восстановления регулируют. Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, pH жидкости для восстановления легко регулируется добавлением кислот и оснований, например, HCl, бикарбоната натрия и т.п. В различных вариантах осуществления жидкость для восстановления представляет собой одну из этих жидкостей, и ее используют без регулирования pH.

В некоторых вариантах осуществления жидкость для восстановления включает по меньшей мере один буфер. Типовыми буферами являются, помимо прочего, соли фосфата, гидрофосфата, ацетата, цитрата, карбоната, бикарбоната и другие подобные буферы, обычно считающиеся совместимыми с белками плазмы.

В различных вариантах осуществления жидкость для восстановления включает по меньшей мере одну аминокислоту. Типовой аминокислотой является глицин.

В типовом варианте осуществления жидкость для восстановления включает один или большее количество антикоагулянтов. Типовым антикоагулянтом является цитратная соль, например, цитрат натрия.

Еще одним преимуществом способа по настоящему изобретению является возможность уменьшить количество обрабатываемой жидкости путем восстановления плазмы с более высокой концентрацией белка, чем в нативной плазме. В типовом варианте осуществления высушенную распылением плазму восстанавливают жидкостью для восстановления до около 100% исходного объема. В некоторых вариантах осуществления высушенную распылением плазму восстанавливают жидкостью для восстановления до около 75% исходного объема. В некоторых вариантах осуществления высушенную распылением плазму восстанавливают жидкостью для восстановления до около 50% исходного объема. В некоторых вариантах осуществления высушенную распылением плазму восстанавливают жидкостью для восстановления до от около 25% до около 50%, например, от около 30% до около 40% от исходного объема. В некоторых вариантах осуществления высушенную распылением плазму восстанавливают жидкостью для восстановления до от около 50% до около 75%, например, от около 60% до около 70% от исходного объема. В некоторых вариантах осуществления высушенную распылением плазму восстанавливают жидкостью для восстановления до около 20%, около 25%, около

30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или около 100%.

В различных вариантах осуществления физиологически активная восстановленная плазма состоит по меньшей мере из около 2%, 5%, 7%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18% или 20%. В некоторых вариантах осуществления при восстановлении в соотношении 0,09 грамма порошка на 1 мл жидкости восстановления восстановленная физиологическая плазма имеет концентрацию белка около 48 мг/мл, например, в диапазоне 45-55 мг/мл.

Учитывая удобство, обеспечиваемое способом по настоящему изобретению, заключающееся в том, что не требуется применение замороженной/размороженной плазмы, процесс восстановления может происходить при любой пригодной температуре. Типовые восстановления происходят при комнатной температуре (например, от около 22° С до около 25° С), при охлаждении (от около 10° С до около 20° С). В типовом варианте осуществления процесс восстановления проводят при температуре от около 2° С до около 28° С.

В типовом варианте осуществления после восстановления температуру восстановленной плазмы снижают для ускорения криопреципитации, а криопреципитат и супернатант разделяют. В различных вариантах осуществления температуру восстановленной плазмы снижают до около 6° С для криопреципитации. В типовом варианте осуществления восстановленный раствор плазмы охлаждают до температуры от около 1° С до около 6° С. **Фиг. 6.**

В различных вариантах осуществления после криопреципитации плазма разделяется на криопреципитат и криосупернатант. Криосупернатант необязательно подвергают дальнейшим этапам фракционирования. Разделение можно осуществить любым подходящим способом, таким как, помимо прочего, центрифугирование, фильтрация или их комбинация.

В тех вариантах осуществления, в которых желательно охлаждение физиологически активной восстановленной плазмы, можно использовать любые пригодные средства охлаждения. В различных вариантах осуществления сосуд или линия, содержащие восстановленную плазму, снабжены охлаждающим устройством. В типовых вариантах осуществления охлаждающий и/или плазменный раствор удерживается в сосуде, например, в сосуде с рубашкой, и в некоторых вариантах осуществления плазменный раствор охлаждается во время проточного потока («радиаторный метод»).

В различных вариантах осуществления охлаждение физиологически активной восстановленной плазмы, как обсуждалось выше, приводит к осаждению фибриногена. Осажденный фибриноген можно отделить от супернатанта. В некоторых вариантах осуществления фибронектин осаждается при охлаждении восстановленной плазмы и может быть отделен от супернатанта. В некоторых вариантах осуществления FVIII осаждается при охлаждении физиологически активной восстановленной плазмы и может быть отделен от супернатанта. В различных вариантах осуществления фактор фон Виллебранда осаждается при охлаждении физиологически активной восстановленной

плазмы и может быть отделен от супернатанта.

В типовом варианте осуществления физиологически активная восстановленная плазма подвергается одной или большему количеству процедур тестирования для подтверждения одной или большего количества видов активности перед фракционированием. Активности прокоагулянтных и антикоагулянтных белков, исследуемые в физиологически активной восстановленной плазме, включают, помимо прочего; следующие тесты: i. Протромбиновое время (PT) или международное нормализованное отношение (INR); ii. Активированное частичное тромбопластиновое время (aPTT); iii. Активность термолabile белков (например, Фактор V, Фактор VIII); iv. Активность антикоагулянтных белков (например, белок S, белок C); v. Антиген и активность крупных коагуляционных белков, подверженных агрегации и деградации (например, фибриноген, фактор фон Виллебранда); vi. Маркеры активации свертывания крови (например, тромбин-антитромбиновые комплексы, продукты деградации фибрина)

В некоторых вариантах осуществления порошок физиологически активной плазмы, высушенной распылением, при восстановлении проявляет физиологическую активность, по существу эквивалентную размороженной плазме, жидкой плазме, FP24 или FFP. В различных вариантах осуществления порошок плазмы демонстрирует скорость регенерирования белков плазмы между исходной, нативной плазмой и физиологически активной восстановленной плазмой по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% и т.д. В некоторых вариантах осуществления физиологически активная восстановленная плазма имеет уровни белка, сравнимые с FFP или FP24 или превышающие их.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется показателем aPTT около 65 секунд или менее, PT - около 31 секунды или менее и уровнем фибриногена - по меньшей мере около 100 мг/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется показателем aPTT около 35 секунд или менее, PT - около 15 секунды или менее и уровнем фибриногена - по меньшей мере около 223 мг/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная плазма, высушенная распылением, после восстановления характеризуется показателем aPTT в диапазоне 28-66 секунд, PT - в диапазоне 14-31 секунды и уровнем фибриногена - в диапазоне 100-300 мг/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная плазма, высушенная распылением, после восстановления характеризуется показателем aPTT в диапазоне 30-35 секунд, PT - в диапазоне 10-15 секунды и уровнем фибриногена - в диапазоне 223-500 мг/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из

следующих признаков: уровень Фактора VII по меньшей мере около 10 МЕ/дл, уровень Фактора IX по меньшей мере около 10 МЕ/дл, уровень белка С по меньшей мере около 10 МЕ/дл и уровень белка S по меньшей мере около 10 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора VII по меньшей мере около 30 МЕ/дл, уровень Фактора IX по меньшей мере около 25 МЕ/дл, уровень белка С по меньшей мере около 55 МЕ/дл и уровень белка S по меньшей мере около 54 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора VII по меньшей мере около 54 МЕ/дл, уровень Фактора IX по меньшей мере около 70 МЕ/дл, уровень белка С по меньшей мере около 74 МЕ/дл и уровень белка S по меньшей мере около 61 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора VII в диапазоне 30-110 МЕ/дл, уровень Фактора IX в диапазоне 25-135 МЕ/дл, уровень белка С в диапазоне 55-130 МЕ/дл и уровень белка S в диапазоне 55-110 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора VII в диапазоне 34-172 МЕ/дл, уровень Фактора IX в диапазоне 70-141 МЕ/дл, уровень белка С в диапазоне 74-154 МЕ/дл и уровень белка S в диапазоне 61-138 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора V по меньшей мере около 10 МЕ/дл и уровень Фактора VIII по меньшей мере около 10 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора V по меньшей мере около 30 МЕ/дл и уровень Фактора VIII по меньшей мере около 25 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора V по меньшей мере около 63 МЕ/дл и уровень Фактора VIII по меньшей мере около 47 МЕ/дл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная высушенная распылением плазма при восстановлении характеризуется по меньшей мере одним из следующих признаков: уровень Фактора V в диапазоне 63-135 МЕ/дл, уровень Фактора VIII в диапазоне 47-195 МЕ/дл.

См. **Фиг. 3.**

vWF, как правило, трудно поддается регенерированию, и он стал одним из индикаторов сохранения всех факторов. Настоящее изобретение включает регенерирование количества активного/неденатурированного фактора Виллебранда в количестве в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме перед фракционированием, которое составляет по меньшей мере около 60%, около 70%, по меньшей мере около 80%, около 90% или больше по сравнению с количеством активного/неденатурированного фактора Виллебранда в нативной плазме. Активность vWF обычно анализируют с помощью анализа, называемого анализ фактора фон Виллебранда: кофактора ристоцетина [vWF:RCo], который известен специалистам в данной области техники. Анализ vWF:RCo измеряет способность плазмы пациента к агрегации тромбоцитов в присутствии антибиотика ристоцетина. Скорость индуцированной ристоцетином агрегации связана с концентрацией и функциональной активностью фактора фон Виллебранда в плазме. Другой анализ, анализ антигена vWF, измеряет количество белка vWF, присутствующего в образце.

В некоторых вариантах осуществления физиологическая восстановленная высушенная распылением плазма содержит альбумин в количестве от около 3,5 до около 5,5 г/дл. В различных вариантах осуществления концентрация альбумина в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме составляет от около 40% до около 70%, например, от около 50% до около 60% от общего содержания белка в плазме физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы.

В различных вариантах осуществления альбумин в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме сохраняет по меньшей мере около 80%, 85%, 90% или по меньшей мере около 95% активности на единицу альбумина в плазме.

В некоторых вариантах осуществления физиологическая восстановленная высушенная распылением плазма содержит A1PI в количестве от около 50 до 300 мг/дл, например, от около 100 до около 200 мг/дл.

В различных вариантах осуществления A1PI в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме сохраняет по меньшей мере около 80%, 85%, 90% или по меньшей мере около 95% активности на единицу A1PI в плазме.

В различных вариантах осуществления физиологически восстановленная высушенная распылением плазма содержит IgG в количестве от около 500 до около 1600 мг/дл, например, от около 700 до около 1500 мг/дл.

В различных вариантах осуществления IgG в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме сохраняет по меньшей мере около 80%, 85%, 90% или по меньшей мере около 95% активности на единицу IgG в плазме.

В некоторых вариантах физиологически активная высушенная распылением плазма имеет средний размер частиц примерно 30 микрон или меньше. В некоторых вариантах физиологически активная высушенная распылением плазма имеет

максимальный размер частиц примерно 100 микрон или меньше.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная восстановленная плазма включает по меньшей мере 30% белка плазмы по весу.

В некоторых вариантах осуществления при восстановлении 1 мл жидкости на 0,09 грамма порошка физиологически активная восстановленная плазма имеет концентрацию белка в диапазоне от 35 мг/мл до 60 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления физиологически активная восстановленная плазма является стерильной.

После восстановления физиологически активной высушенной распылением плазмы полученный раствор подвергают фракционированию. Типовым способом фракционирования является фракционирование по Кону и его разновидности.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ фракционирования физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека с применением процедуры фракционирования по Кону, например процедуры, изложенной в патенте США № 2390074, в которой описанное усовершенствование предусматривает использование физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека в качестве исходного материала для процедуры фракционирования. **На Фиг. 1** представлена типовая технологическая схема метода фракционирования по Кону.

Так, например, физиологически активная восстановленная плазма, высушенная распылением, подвергается методу фракционирования белков путем осаждения из раствора, содержащего множество белковых фракций, при этом раствор имеет pH выше изоэлектрической точки фракции, которую необходимо осадить, что включает снижение pH раствора, чтобы довести его примерно до изоэлектрической точки желаемой фракции, подлежащей осаждению, доведение ионной силы раствора до значения от 0,1 до 0,2, снижение температуры раствора до около 0° С и до точки замерзания раствора, добавление органического осадка белка к белковому раствору, при этом количество добавляемого осадителя должно быть таким, чтобы вызывать осаждение желаемой фракции только из белкового раствора при указанной температуре, и отделение осадка от раствора.

В различных вариантах осуществления предлагается способ фракционирования белков путем осаждения из раствора физиологически активной восстановленной плазмы человека, содержащей множество белковых фракций, включающий доведение pH раствора приблизительно до изоэлектрической точки желаемой белковой фракции, подлежащей осаждению, доведение pH раствора примерно до изоэлектрической точки желаемой белковой фракции, подлежащей осаждению, доведение ионной силы раствора до значения от 0,01 до 0,2, снижение температуры раствора до около 0° С и до точки замерзания раствора, добавление органического осадителя белка к белковому раствору, при этом количество добавляемого осадителя, pH, ионная сила и температура должны вызывать осаждение только желаемой фракции из белкового раствора и отделение осадка

от раствора.

В различных вариантах осуществления, в способе фракционирования белков из раствора восстановленной физиологически активной плазмы человека, этапы включают смешивание с раствором белков органического осадителя для белков, регулирование температуры в диапазоне от 0 до  $-15^{\circ}\text{C}$ , количества осадка от 10% до 40%, pH от 4,4 до 7 и ионной силы от 0,05 до 0,2, и отделение от полученной жидкой системы выпавшего в осадок нерастворимого в ней белка.

В некоторых вариантах осуществления, в способе фракционирования белков из раствора восстановленной физиологически активной плазмы человека, этапы включают смешивание с раствором белков органического осадителя для белков, регулирование и поддержание температуры выше точки замерзания, но не выше  $0^{\circ}\text{C}$ , количества осадка от 10% до 40%, pH от 4,4 до 7 и ионной силы от 0,05 до 0,2, и отделение от полученной жидкой системы выпавшего в осадок нерастворимого в ней белка.

В некоторых вариантах осуществления, в способе фракционирования белков из раствора восстановленной плазмы человека, этапы, которые включают добавление к содержащей белки смеси как электролита, так и органического осадителя белка, при этом электролит добавляют в количестве, достаточном для доведения ионной силы до значения от 0,01 до 0,2, и добавляют осадитель в количестве, достаточном для осаждения только желаемой белковой фракции, регулирование и поддержание pH раствора в диапазоне от 4,4 до 7 и его температуры в диапазоне от 0 до  $-15^{\circ}\text{C}$ , и, таким образом, осаждение белка из полученной системы.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается способ очистки и кристаллизации альбумина из раствора восстановленной плазмы человека, который включает растворение неочищенного альбумина в спиртовом растворе, содержащем от 15 до 40% спирта, с pH приблизительно от 5,5 до 6,0, ионной силой от 0,05 до 0,5 и при температуре от  $0^{\circ}\text{C}$  до  $-5^{\circ}\text{C}$ , и поддержание указанного раствора в указанном диапазоне температур до тех пор, пока не выкристаллизуется очищенный альбумин.

В типовом варианте осуществления, в способе фракционирования веществ, которые имеют различную растворимость, из раствора восстановленной плазмы человека при контролируемой температуре и концентрации ионов водорода удаляют образовавшийся таким образом осадок и осаждают множество последовательных фракций указанных веществ путем изменения одного или большего количества факторов.

Способ предотвращения денатурации белков путем модификации реагентов, обычно приводящих к денатурации, который включает добавление реагентов к белковому раствору восстановленной плазмы человека путем диффузии через полупроницаемую мембрану.

В одном варианте осуществления предлагается способ фракционирования белков из раствора физиологически активной восстановленной плазмы человека, включающий приведение в контакт физиологически активной восстановленной плазмы человека с органическим осадителем. Типовой вариант осуществления включает контроль одного

или большего количества из следующих факторов: количество осадителя в растворе, температура, концентрация ионов водорода и ионная сила, отделение полученного осадка от белкового раствора и разделение последовательных белковых фракций путем варьирования множества указанных факторов, влияющих на их растворимость.

В типовом варианте осуществления органический осадитель добавляют при температуре  $0^{\circ}\text{C}$  или ниже  $0^{\circ}\text{C}$ .

В типовом варианте осуществления органический осадитель представляет собой спирт. В различных вариантах осуществления органический осадитель добавляют при температуре  $0^{\circ}$  или ниже  $0^{\circ}\text{C}$ .

В типовом варианте осуществления предлагается способ фракционирования белков из раствора физиологически активной восстановленной плазмы человека, который включает в качестве этапов: осаждение множества различных белковых фракций из плазмы с применением плазмы с органическим осадителем и путем изменения температуры указанной плазмы, при этом температуру постепенно снижают, а концентрацию спирта в плазме увеличивают, с осаждением последовательных белковых фракций, при этом температура и процентное содержание спирта коррелируют таким образом, что температура, используемая для осаждения любой заданной белковой фракции, близка, но выше точки замерзания плазмы при процентном содержании в ней спирта.

Примеры органических осадителей включают этанол, ацетон, диоксан и их комбинации.

В типовом варианте осуществления белок в криопасте, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выбранный из Фактора VIII, Фактора IX и их комбинации, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы. В различных вариантах осуществления активность белка составляет не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% активности белка, выделенного из свежемороженой плазмы.

В типовом варианте осуществления настоящего изобретения IgG, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выделяют с выходом не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы. В различных вариантах осуществления активность IgG составляет не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% активности IgG, выделенного из свежемороженой плазмы.

В типовом варианте осуществления белок, выделенный из Фракции IV-1 фракционированной физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выбранный из A1PI, AT-III и их комбинации, выделяют с выходом не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы. В различных вариантах осуществления белок, выделенный из физиологически активной восстановленной

высушенной распылением плазмы человека во Фракции IV-1, имеет активность не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от активности белка, выделенного из свежзамороженной плазмы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается способ, в котором альбумин, выделенный из Фракции V физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежзамороженной плазмы. В различных вариантах осуществления альбумин, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, имеет активность не менее 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% от активности альбумина, выделенного из свежзамороженной плазмы.

Предложенные в настоящем изобретении способы позволяют получать композиции A1PI, имеющие очень высокий уровень чистоты. Например, в одном варианте осуществления по меньшей мере около 95% общего белка в композиции A1PI, описанной в данном документе, представляет собой A1PI. В других вариантах осуществления по меньшей мере около 96% белка в этой композиции представляет собой A1PI или по меньшей мере около 97%, 98%, 99%, 99,5% или более от общего белка композиции представляет собой A1PI.

Точно так же способы, предложенные в настоящем изобретении, позволяют получать композиции A1PI, содержащие чрезвычайно низкие уровни загрязняющих агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления предлагаются композиции A1PI, которые содержат менее чем около 10 мг/л загрязняющего агента. В других вариантах осуществления композиция A1PI будет содержать менее чем около 5 мг/л загрязняющего агента, предпочтительно менее чем около 3 мг/л загрязняющего агента, наиболее предпочтительно менее чем около 2 мг/л загрязняющего агента.

В различных вариантах осуществления A1PI в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме сохраняет по меньшей мере около 80%, 85%, 90% или по меньшей мере около 95% активности на единицу A1PI в плазме.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предлагаются водные композиции IgG, содержащие белок в концентрации от около 150 г/л до около 250 г/л. В некоторых вариантах осуществления концентрация белка в композиции IgG составляет от около 175 г/л до около 225 г/л, или от около 200 г/л до около 225 г/л, или любое подходящее значение концентрации в этих пределах, например, или около 150 г/л, 155 г/л, 160 г/л, 165 г/л, 170 г/л, 175 г/л, 180 г/л, 185 г/л, 190 г/л, 195 г /л, 200 г/л, 205 г/л, 210 г/л, 215 г/л, 220 г/л, 225 г/л, 230 г/л, 235 г/л, 240 г/л, 245 г /л, 250 г/л или выше. В предпочтительном варианте осуществления водная композиция IgG содержит белок в концентрации около 200 г/л. В особенно предпочтительном варианте осуществления водная композиция IgG содержит белок в концентрации около 204 г/л.

Предложенные в настоящем изобретении способы позволяют получать композиции IgG, имеющие очень высокий уровень чистоты. Например, в одном варианте

осуществления по меньшей мере около 95% общего белка в композиции IgG, описанной 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 от общего белка композиции будет представлять собой IgG.

Точно так же способы, предложенные в настоящем изобретении, позволяют получать композиции IgG, содержащие чрезвычайно низкие уровни загрязняющих агентов. Например, в некоторых вариантах осуществления предлагаются композиции IgG, которые содержат менее чем около 100 мг/л IgA. В других вариантах осуществления композиция IgG будет содержать менее чем около 50 мг/л IgA, предпочтительно менее чем около 35 мг/л IgA, наиболее предпочтительно менее чем около 20 мг/л IgA.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается препарат поливалентных и/или гипериммунных иммуноглобулинов (IgG), полученный с помощью способа по настоящему изобретению. В различных вариантах осуществления IgG выбирают из гипериммунного иммуноглобулина против RhO, гипериммунного иммуноглобулина против гепатита В, гипериммунного иммуноглобулина против бешенства, гипериммунного иммуноглобулина IgG против столбняка и комбинации любых двух или большего количества из них.

В различных вариантах осуществления IgG в физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазме сохраняет по меньшей мере около 80%, 85%, 90% или по меньшей мере около 95% активности на единицу IgG в плазме.

#### ***Распылительная сушилка и процесс распылительной сушки***

Физиологически активная высушенная плазма, которую восстанавливают и затем фракционируют, высушивается распылительной сушкой в системе распылительной сушилки. Как правило, система распылительной сушилки (устройство распылительной сушилки) предназначена для распылительной сушки жидкого образца, такого как плазма крови. В одном варианте осуществления система распылительной сушилки, применяемая для распыления сухой плазмы для последующего восстановления раствором по настоящему изобретению, включает устройство распылительной сушилки и узел распылительной сушилки. Устройство распылительной сушилки приспособлено, в одном аспекте, для приема потоков аэрозолирующего газа, сушильного газа и плазменной жидкости из соответствующих источников и соединено с узлом распылительной сушилки. Устройство распылительной сушилки может передавать полученный аэрозолирующий газ, осушающий газ и плазму в узел распылительной сушилки. Распылительная сушка плазмы осуществляется в узле распылительной сушилки под управлением устройства распылительной сушилки. Для сушки плазмы по настоящему изобретению может быть использована любая пригодная система распылительной сушки. В качестве примера ниже описана пригодная распылительная сушилка.

Типовое устройство для распылительной сушки, применяемое в настоящем изобретении, представлено на **Фиг. 2**. Типовые параметры процесса распылительной сушки представлены на **Фиг. 4**.

В определенных вариантах осуществления узел распылительной сушилки включает в себя стерильный, герметично закрытый огражденный корпус и раму, к которой прикреплен указанный огражденный корпус. Рама определяет первую, вторую и третью части узла, разделенные соответствующими переходными зонами. Впускное отверстие для сушильного газа предусмотрено в первой части узла рядом с первым концом огражденного корпуса.

Головка распылительной сушилки дополнительно прикреплена к раме в переходной зоне между первой и второй частями узла. Это положение также находится в пределах начального пути потока сушильного газа внутри узла. Во время распылительной сушки головка распылительной сушилки принимает потоки аэрозолирующего газа и плазмы и распыляет плазму аэрозолирующим газом с образованием аэрозолированной плазмы. Сушильный газ дополнительно проходит через головку распылительной сушилки для смешивания с аэрозолированной плазмой во второй части узла для сушки. Во второй части узла, которая функционирует как сушильная камера, контакт между аэрозолированной плазмой и сушильным газом приводит к перемещению влаги из аэрозолированной плазмы в сушильный газ, образуя сухую плазму и влажный сушильный газ.

В альтернативных вариантах осуществления аэрозолирующий газ может быть исключен, а головка узла распылительной сушилки может включать аэрозольный распылитель, который принимает и распыляет поток плазмы. Примеры аэрозольных распылителей могут включать, помимо прочего, ультразвуковые распылительные преобразователи, ультразвуковые увлажняющие преобразователи и пьезоультразвуковые распылители. Преимуществом является то, что такая конфигурация устраняет необходимость в аэрозолирующем газе, упрощая конструкцию устройства и узла распылительной сушилки и снижая стоимость системы распылительной сушилки.

Головка распылительной сушилки в одном из вариантов осуществления изобретения приспособлена для направления потока сушильного газа внутри сушильной камеры. Например, головка распылительной сушилки имеет отверстия, разделенные ребрами, которые принимают поток сушильного газа из впускного отверстия для сушильного газа. Ориентация ребер позволяет направлять осушающий газ по выбранным путям потока (например, спиральным). Преимуществом является то, что за счет регулирования пути потока сушильного газа увеличивается длина пути, на котором сушильный газ и аэрозолированная плазма крови находятся в контакте в сушильной камере, что сокращает время сушки плазмы.

Физиологически активная высушенная плазма и влажный сушильный газ впоследствии поступают в третью часть узла, в которой находится камера сбора. В камере сбора высушенная плазма изолируется от влажного сушильного газа и собирается с помощью фильтра. Например, фильтр в варианте осуществления открыт с одной стороны для приема потока влажного воздуха и высушенной плазмы и закрыт с остальных сторон. Влажный сушильный газ проходит через фильтр и выбрасывается из узла распылительной

сушилки.

В альтернативных вариантах осуществления фильтр выполнен с возможностью разделения камеры сбора на две части. Первая часть камеры сбора примыкает к сушильной камере и принимает поток влажного сушильного газа и высушенной плазмы. Высушенная плазма собирается в этой первой части камеры сбора, в то время как влажный воздух проходит через фильтр и выпускается из узла распылительной сушилки через выпускное отверстие, сообщающееся по текучей среде со второй частью узла распылительной сушилки.

После сбора физиологически активной высушенной плазмы камера сбора отделяется от узла распылительной сушилки и герметично закрывается. Таким образом, герметичная камера сбора используется для хранения высушенной плазмы до использования. Камера сбора включает множество портов, позволяющих добавлять раствор для восстановления по настоящему изобретению в камеру сбора для восстановления плазмы крови и удалять восстановленную плазму крови для использования. Камера сбора может быть дополнительно присоединена к герметичному сосуду, содержащему восстанавливающий раствор для дальнейшего восстановления.

При работе с продуктами переливания, такими как плазма крови, продукты переливания не должны подвергаться воздействию загрязняющих агентов во время сбора, хранения и переливания. Соответственно, узел распылительной сушилки, в одном из вариантов осуществления, приспособлен для реверсивного соединения с устройством распылительной сушилки. Например, узел распылительной сушилки соединен с устройством распылительной сушилки примерно на входе для сушильного газа. Преимущество такой конфигурации заключается в том, что узел распылительной сушилки допускает многократное или однократное использование. Например, в одном варианте осуществления узел распылительной сушилки и головка распылительной сушилки изготовлены из автоклавируемых материалов (например, антибактериальных сталей, антибактериальных сплавов и т. д.), которые стерилизуются перед каждой операцией распылительной сушилки. В альтернативном варианте головка распылительной сушилки и камера распылительной сушилки изготовлены из одноразовых материалов (например, полимеров), которые обрабатываются в автоклаве перед каждой операцией распылительной сушилки и утилизируются после каждой операции распылительной сушилки.

Устройства и способы распылительной сушилки известны в данной области техники. Способы и устройство распылительной сушилки дополнительно описаны в патентах США №№ 8 469 202, 8 533 971, 8 407 912, 8 595 950, 8 601 712, 8 533 972, 8 434 242, в патентных публикациях США №№ 2016/0082044, 20160084572, 2010/0108183, 2011/0142885, 2013/0000774, 2013/0126101, 2014/0083627, 2014/0083628 и 2014/0088768, все идеи которых включены в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Следующие Примеры предлагаются для иллюстрации типовых вариантов осуществления настоящего изобретения и не определяют и не ограничивают его объем.

## **ПРИМЕРЫ**

### ПРИМЕР 1

Полный процесс распылительной сушки включает в себя последовательность из четырех процессов. Диспергирование достигается с помощью напорной форсунки, двухжидкостной форсунки, роторного дискового распылителя или ультразвуковой форсунки. Выбор типа распылителя зависит от характера и количества сырья, а также от желаемых характеристик высушенного продукта. Чем выше энергия диспергирования, тем мельче генерируемые капли. Способ контакта аэрозоля с сушильным воздухом является важным фактором при распылительной сушке, так как он оказывает большое влияние на свойства высушенного продукта, влияя на поведение капель во время сушки. В одном примере материал распыляется в том же направлении, что и поток горячего воздуха через аппарат. Капли вступают в контакт с горячим сушильным газом, когда они наиболее влажные. В другом примере материал распыляют в направлении, противоположном потоку горячего газа. Горячий газ поднимается вверх, и продукт падает через все более горячий воздух в сборный лоток. Остаточная влага удаляется, и продукт становится очень горячим. Этот способ подходит только для термостабильных продуктов. В еще одном варианте осуществления сочетаются преимущества обоих способов распыления. Продукт распыляется вверх и остается в горячей зоне только на короткое время для удаления остаточной влаги. Затем под действием силы тяжести продукт втягивается в более холодную зону. Этот вариант осуществления является особенно предпочтительным, поскольку продукт находится в горячей зоне только в течение короткого времени и с меньшей вероятностью подвергается воздействию тепла.

В способе распылительной сушки в качестве сушильной среды в основном используется воздух, но также могут использоваться и другие газы, такие как азот. Поток газа нагревается электрически или в горелке и после процесса выбрасывается в атмосферу. Если теплоноситель рециркулируется и используется повторно, обычно вместо воздуха используется инертный газ, такой как азот. Использование азота выгодно при использовании легковоспламеняющихся растворителей, токсичных продуктов или продуктов, чувствительных к кислороду.

В процессе распылительной сушки, как только капли аэрозоля вступают в контакт с сушильным газом, происходит испарение из пленки насыщенного пара, которая быстро образуется на поверхности капель. Благодаря высокой удельной площади поверхности и существующим градиентам температуры и влажности, тепло- и массообмен приводит к эффективной сушке. Испарение приводит к охлаждению капли и, следовательно, к небольшой тепловой нагрузке. Конструкция сушильной камеры и скорость потока воздуха обеспечивают время пребывания капель в камере, так что требуемое удаление влаги из капель завершается и продукт удаляется из сушилки до того, как температура продукта поднимется до температуры воздуха на выходе. Следовательно, вероятность теплового повреждения изделия минимальна.

Для отделения продукта от сушильной среды используются две системы. Во-первых, первичное отделение продукта сушки происходит в основании сушильной

камеры, а во-вторых, осуществляется полное регенерирование высушенного продукта в сепарационном оборудовании. В одном варианте осуществления для сбора материала используется циклон. Под действием сил инерции частицы отделяются от стенки циклона в виде нисходящей деформации и удаляются. Для сбора высушенного продукта также могут использоваться другие системы, такие как электростатические осадители, текстильные (мешочные) фильтры или влажные коллекторы, такие как скрубберы.

Применяемая в настоящем изобретении сушка распылением имеет преимущества по сравнению с другими способами сушки, такими как лиофилизация (сушка вымораживанием). Применение распылительной сушки позволяет получить продукт, который является более однородным, менее комковатым и лучше диспергированным, по сравнению со способами сушки вымораживанием. Высокодисперсные частицы, полученные в результате распылительной сушки, также обеспечивают высокую скорость регидратации, что, вероятно, является результатом большей доступной площади поверхности. Напротив, комковатая природа лиофилизированного продукта приводит к существенно более длительному времени регидратации для продуктов крови, высушенных с помощью способа по настоящему изобретению. Поскольку многие переливания и другие виды применения продуктов крови могут быть очень чувствительными ко времени, эта более высокая скорость регидратации может быть значительным преимуществом на поле боя или в ситуациях неотложной помощи. Как более подробно поясняется ниже, высушенные распылением фиксированные тромбоциты по настоящему изобретению можно регидратировать с образованием композиции регидратированных фиксированных тромбоцитов, и при этом указанная композиция имеет значение мутности (A.sub.500) меньше, чем у сравнимой регидратированной лиофилизированной композиции фиксированных тромбоцитов.

## **ПРИМЕР 2**

### **1. Оборудование для распылительной сушки, которое будет использоваться**

Распылительная сушилка 4M8-Trix (ProSepT, Zelzate, Бельгия)

Размеры сушильной камеры:

Прямая сушильная камера: высота 60 см, дм 18,4 см.

- 1 или 2 уровня прямой сушильной камеры

Коническая сушильная камера: высота 75 см, дм 18,4 см.

Общая длина сушильной камеры:  $\pm$  135 см - 195 см

Двухжидкостная форсунка

Жидкость поступает в верхнюю часть распылительной сушилки с помощью перистальтического насоса с 12 роликами и трубкой Tygon® MHLL (внутренний диаметр: 1,14 мм или 2,79 мм) с наружным покрытием изампреном.

Совместный поток воздуха

Сбор порошка в резервуар, прикрепленный к циклону

Испаряемость воды: макс. 3 л/ч

Параметры процесса

Поток воздуха: 0,2 м<sup>3</sup>/мин - 1 м<sup>3</sup>/мин

Температура внутр. (°C): макс. 200 °C

Наконечник двухжидкостной форсунки (мм): 0,2-0,4-0,6-0,8-1,0-1,2 мм

Соотношение воздух/жидкость:

Расход воздуха форсунки (л/мин): макс. 25 л/мин

Скорость распыления (г/мин): 0,1-15 г/мин

## **2. Экспериментальная часть**

60 л замороженной плазмы хранят при температуре -20°C.

### ***Предварительная обработка плазмы перед распылительной сушкой***

После извлечения пакетов с плазмой, содержащих плазму, для распылительной сушки из морозильной камеры (-20°C), пакеты с плазмой быстро оттаивают до 28-30 °C с помощью водяной бани. Затем размороженную плазму объединяют. Объединенную плазму хранят при 8°C при постоянном перемешивании. Необходимое количество объединенной плазмы может храниться при температуре 5-8°C в течение 3 дней. Количество плазмы из объединенного пула, необходимое для подачи в цикл сушки распылением, доводят до 28°C с помощью водяной бани и осторожно перемешивают во время сушки распылением, обеспечивая отсутствие пенообразования. Плазма имеет вязкость, сравнимую со свежей плазмой.

Вязкость объединенного пула плазмы определяют с помощью реометра Haake Mars III (Thermo Scientific, штат Массачусетс, США). Также измеряют мутность объединенного пула плазмы. Вязкость и мутность пула плазмы измеряют при 28 °C.

### ***Сушка распылением***

Фаза 1 распылительной сушки разделена на несколько последовательных протоколов, как указано в Таблице 1. Для протоколов 1 и 1.5 используют в общей сложности 30 л (из 60 л).

**Таблица 1: Факторы процесса и их диапазоны**

Фактор	Диапазон
Поток воздуха внутр. (м <sup>3</sup> /мин)	0,3-0,5
Темп. внутр. (°C)	100-110
Скорость потока воздуха в форсунках (л/мин)	10-15
Скорость распыления (г/мин)	4-8

В этом Примере необходимое количество плазмы для распылительной сушки собирали путем объединения (как указано выше), обеспечивая использование однородной плазмы для всего протокола. Параметры процесса распылительной сушки и их диапазоны, в которых они варьируются с использованием двухуровневого фракционно-факторного подхода (т. е.  $2^{4-1}+3$  эксперимента в центральной точке=11 экспериментов), перечислены в следующей Таблице 2:

**Таблица 2: Обзор двухуровневых экспериментов с фракционно-факторным дизайном**

№ эксп.	Название эксп.	Порядок выполнения	Вкл/Искл	поток воздуха вн.	температура вн.	скорость потока воздуха в форсунках	скорость распыления
1	N1	6	Вкл	0,3	100	10	4
2	N2	3	Вкл	0,5	100	10	8
3	N3	4	Вкл	0,3	110	10	8
4	N4	8	Вкл	0,5	110	10	4
5	N5	7	Вкл	0,3	100	15	8
6	N6	9	Вкл	0,5	100	15	4
7	N7	10	Вкл	0,3	110	15	4
8	N8	2	Вкл	0,5	110	15	8
9	N9	1	Вкл	0,4	105	12,5	6
10	N10	5	Вкл	0,4	105	12,5	6
11	N11	11	Вкл	0,4	105	12,5	6

Этот протокол содержит 3 повторных эксперимента. Один повтор был проведен в начале, один в середине и один в конце эксперимента, что позволило оценить временной эффект объединенной плазмы.

Эти диапазоны параметров процесса были выбраны на основании литературных данных<sup>1,2</sup>. В этой литературе плазма подвергалась распылительной сушке с применением системы распылительной сушки Büchi при определенных параметрах процесса. Эти настройки были преобразованы в диапазоны параметров процесса, применимые к распылительной сушилке 4M8-Trix (ProSepT, Zelzate, Бельгия), используемой в этом исследовании.

Оценивали следующие характеристики: технологичность, выход, остаточное содержание влаги, растворимость/повторное суспендирование и тестовая панель. Для измерения этих характеристик использовали 5,25 г высушенного распылением порошка на эксперимент (т.е. 3,75 г для тестовой панели; 1,50 г для 2 измерений остаточной влажности).

Принимая во внимание потенциальную максимальную потерю выхода при распылительной сушке, составляющую 25%, и принимая во внимание, что 1 л плазмы содержит 50 г белков, это означает, что 140 мл плазмы подвергается распылительной сушке за один эксперимент, в результате чего получается по меньшей мере 5,25 г порошка, высушенного распылением (75% (140 мл (50 г/1000 мл))=5,25 г). В 11 экспериментальных циклах, для эксперимента по распылительной сушке использовали

объединенный пул плазмы, составляющий около 1600 мл. Кроме того, 140 мл объединенной плазмы отделяли в день перед сушкой распылением для эталонного анализа (т.е. всего около 280 мл объединенной плазмы для эталонного анализа). Готовили объединенный пул плазмы, составляющий около 1900 мл (т.е. 3 пакета с плазмой). Распылительная сушка из 11 циклов (140 мл объединенной плазмы на цикл) занимает 2 дня (т.е. около 1 часа на цикл).

**Фиг. 3** содержит подробное описание типового процесса распылительной сушки и данные о восстановлении и свойствах высушенной распылением плазмы и восстановленной плазмы.

#### *с. Ссылки*

<sup>1</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3891503/>

<sup>2</sup>

<http://patft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fmetahtml%2FPTO%2Fsearch-adv.htm&r=4&f=G&l=50&d=PTXT&S1=%22dried+human+plasma%22&OS=%22dried+human+plasma%22&RS=%22dried+human+plasma%22>

#### *d. Оценка порошка, высушенного распылением*

В каждом эксперименте с распылительной сушкой анализировали технологичность, выход и остаточное содержание влаги в высушенном распылением порошке. Остаток порошка, высушенного распылением, подвергали восстановлению и характеристике с помощью способов, общепризнанных в данной области техники. **Фиг. 3.** Характеризация плазмы, высушенной распылением, в соответствии с различными стандартами, общепризнанными в данной области техники, дала результаты, приведенные на **Фиг. 4А** и **Фиг. 4В**.

Примечательно, что паста из плазмы, высушенной распылением (PptG), по цвету и текстуре сравнима с пастой PptG из контроля. Процесс продемонстрировал сравнимое регенерирование IgG в экстракте II+III по сравнению с контролем. Высушенная распылением плазма продемонстрировала приемлемое соотношение преципитатов при суспендировании при 28°C или 1 °C. Контрольные образцы и суспензии, высушенные распылением, продемонстрировали сходные результаты по уровню фибриногена до и после центрифугирования. Высушенные распылением суспензии продемонстрировали значительно более низкие значения мутности по сравнению с контролем. Все условия продемонстрировали аналогичные результаты IgG до и после центрифугирования.

#### **ПРИМЕР 3**

Этот пример описывает условия для типового процесса по настоящему изобретению, такого как процесс, представленный на **Фиг. 6**.

#### **3.1 Материалы и способы**

Этап	Параметры	Цикл	Контроль	Тест 1	Тест 2
CRP	к Источник плазмы		Замороженный	F	

**Номер партии**

<b>Необходимый объем плазмы</b>	л		7,5	6
<b>Необходимое количество порошка плазмы</b>	г		615	492
<b>Необходимый вес воды</b>	кг		6,885	5,508
<b>Фактическая потребность в воде</b>	л			4
<b>Фактическое использование воды</b>	л			4,15
<b>pH суспензии</b>			9,46	9,51
<b>проводимость суспензии</b>	мСм/см		11,972	14,1
<b>мутность суспензии</b>	NTU		308	331
<b>Вес супернатанта</b>	кг		7,398	
<b>Вес осадителя</b>	кг		0,029	
<b>pH супернатанта</b>			9,45	
<b>проводимость супернатанта</b>	мСм/см		12	
<b>мутность супернатанта</b>	NTU		280	
<b>соотношение осадителя к супернатанту</b>	г/кг CPP		3,92	
<b>Объединенный вес плазмы (CRP)</b>	кг	5,836	7,500	4,642
<b>Объем плазмы (CRP)</b>	л	5,6881	7,3099	4,5244
<b>Вес CPP после центрифугирования</b>	кг	5,411	7,398	0
<b>Объем CPP после центрифугирования</b>	л	5,2790	7,2176	0,0000
<b>Вес криопреципитата</b>	кг	0,0773		

<b>Выход криопреципитата</b>	г/л CPP	14,6429		
<b>Количество CPP (объем) при запуске</b>	л	5,00	5,00	4,5
<b>Количество CPP (вес)</b>	кг	5,125	5,125	4,613
<b>Темп. всего материала</b>	°С	1,6	3,3	1,2
<b>Начальный рН</b>		8,21	9,61	9,51
<b>Конечный рН (целевой показатель 7,20)</b>		7,20	7,21	7,14
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл	2,09	4,4	2,75
<b>Объем буфера рН 4,0</b>	л	0,010	0,022	0,025
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,011	0,023	0,026
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10	10	10
<b>проверка рН</b>		7,30	7,40	7,22
<b>Общий объем всего материала</b>	л	5,010	5,022	4,525
<b>Необходимое кол-во 95% спирта</b>	кг	0,371	0,372	0,335
<b>Объем 95% спирта</b>	л	0,446	0,447	0,402
<b>Общий расчетный вес всего материала</b>	кг	5,507	5,520	4,974
<b>Общий расчетный объем всего материала</b>	л	5,456	5,469	4,927
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10	10	10
<b>рН после добавления спирта, начальный</b>		7,48	7,56	7,4

<b>рН после добавления спирта, отрегулированный</b>		7,09	7,05	7,08
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл	0,08	0,096	0,05
<b>Объем буфера рН 4,0</b>	л	0,004	0,005	0,002
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,005	0,006	0,003
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10	10	10
<b>Проверка рН перед выдержкой в течение ночи</b>		7,18	7,09	7,21
<b>Общее время выдержки</b>	часов	15,88	16,92	18,65
<b>Проверка рН после выдержки в течение ночи</b>		7,58	7,36	7,52
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>		10	10	10
<b>Отрегулированный рН</b>		7,16		7,16
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл	0,1		0,07
<b>Объем буфера рН 4,0</b>	л	0,0055	0,0000	0,0035
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,0058	0,0000	0,0037
<b>конечный рН (целевой показатель 7,20)</b>		7,18		7,23
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10		10
<b>Вес суспензии</b>	кг	5,52	5,53	4,98
<b>Объем суспензии</b>	л	5,57	5,58	5,03
<b>Вес Фр. I центрифугата</b>	кг	5,3331	5,2400	4,6533

<b>Объем Фр. I центрифугата</b>	л	5,3870	5,2929	4,7003
<b>объем образца</b>	л	0,0500	0,0500	0,0500
<b>Вес Фр. I преципитата</b>	кг	0,0813	0,1400	0,1113
<b>Начальный рН</b>		7,21	7,38	7,24
<b>Конечный рН (целевой показатель 6,70)</b>		6,70	6,70	6,72
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл	1,7	1,5	1,48
<b>Объем буфера рН 4,0</b>	л	0,009	0,008	0,007
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,010	0,008	0,007
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	100	100	100
<b>проверка рН</b>		6,68	6,75	6,72
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10,00	10,00	10,00
<b>Общий объем всего материала</b>	л	5,396	5,301	4,707
<b>Необходимое кол-во 95% спирта</b>	кг	0,718	0,705	0,626
<b>Объем 95% спирта</b>	л	0,863	0,847	0,752
<b>Общий расчетный вес всего материала</b>	кг	6,060	5,953	5,287
<b>Общий расчетный объем всего материала</b>	л	6,184	6,075	5,395
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10	10	10
<b>рН после добавления спирта</b>		7,17	7,12	6,93
<b>рН, отрегулированный, перед</b>		6,9	6,89	6,93

**выдержкой**

<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл	0,06	0,035	0
<b>Объем буфера рН 4,0</b>	л	0,004	0,002	0,000
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,004	0,002	0,000
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>	мл	10	10	
<b>Проверка рН перед выдержкой в течение ночи</b>		6,90	6,94	6,93
<b>Общее время выдержки</b>	часов	15,97	16,93	16,93
<b>Проверка рН после выдержки в течение ночи</b>		7,00	7,05	7,04
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>		10	10	10
<b>Отрегулированный рН</b>				
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл			
<b>Объем буфера рН 4,0</b>	л	0,0000	0,0000	0,0000
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,0000	0,0000	0,0000
<b>конечный рН (целевой показатель 7,00)</b>				
<b>Фр. II+III @ 20% вес сусп.</b>	кг	6,064	5,956	5,287
<b>Фр. II+III @ 20% объем сусп.</b>	л	6,126	6,016	5,340
<b>Концентрация спирта в объединенном фильтрате</b>	% об./об.	<b>16,4</b>	<b>16,6</b>	20,3
<b>Вес объединенного фильтрата</b>	кг	5,25	5,0435	4,6301
<b>Объем объединенного</b>	л	5,36	5,15	4,72

<b>фильтрата</b>				
<b>Мутность объединенного фильтрата</b>	NTU	9,05	10,4	16,3
<b>Вес материала, высушенного воздухом</b>	кг	0,463	0,6276	0,354
<b>Вес Фр. II+III пасты</b>	кг	0,5032	0,477	0,543
<b>Выход пасты</b>	г/л CPP	100,6	95,4	90,5
<b>Фр. II+III паста, вес первичн.</b>	кг	0,5032	0,477	0,543
<b>Эквивалентный объем плазмы</b>	л CPP	5	5	6
<b>Соотношение веса влажн. Фр. II+III преципитата</b>	кг/л CPP	0,0437	0,0437	0,0437
<b>Вес влажн. Фр. II+III преципитата</b>	кг	0,219	0,219	0,262
<b>Необходимое кол-во экстракционного буфера</b>	кг	4,26	4,26	5,11
<b>Вес суспензии перед регулировкой pH</b>	кг	4,76	4,74	5,66
<b>pH суспензии</b>		5,16	5,16	5,16
<b>Объем разбавленного буфера</b>	мл	0,23	0,25	0,24
<b>Объем неразбавленного буфера</b>	л	0,0011	0,0012	0,0014
<b>Вес неразбавленного буфера</b>	кг	0,0012	0,0013	0,0014
<b>Конечный pH после регулировки (целевой показатель 5,00-5,05)</b>		5,06	5,07	5,06
<b>Вес суспензии перед регулировкой pH</b>	кг	4,77	4,74	5,66
<b>Время экстракции</b>	часы	3,37	4,33	4,05

		40		
	<b>объем образца</b>	л	0,05	0,05 0,05
	<b>Вес CUNO объединенного фильтра</b>	кг	5,3	5 5,9671
	<b>Мутность Фр. II+III экстрагированного объединенного фильтра</b>	NTU	15,3	21,4 16,8
	<b>Вес материала, высушенного воздухом</b>	кг	0,2216	0,599 0,5168
	<b>Вес Фр. II+III экстрагированного преципитата</b>	кг	0,3993	0,4077 0,4777
	<b>Выход пасты</b>	г/л CPP	79,9	81,5 79,6
	<b>Кол-во заморж. II+III экстрагиров. CUNO фильтра, первичн.</b>	кг	5,3	5 5,9671
	<b>Эквивалентный объем плазмы</b>	л CPP	5	5 6
	<b>Вес фильтра всего материала до регулировки pH</b>	кг	5,353	5,050 6,027
	<b>Начальный pH</b>		6,34	6,34 6,36
	<b>Отрегулированный pH</b>		6,9	6,9 6,85
	<b>Объем разбавленного 1N NaOH</b>	мл	5,3	5,4 5,1
	<b>Объем 1N NaOH для регулировки pH</b>	л	0,028	0,027 0,031
	<b>Вес NaOH</b>	кг	0,030	0,028 0,032
	<b>Конечный pH</b>		6,91	6,93 6,85
<b>Фр. II+III экстрагиров</b>	<b>Вес фильтра всего материала после регулировки pH</b>	кг	5,38	5,08 6,06

<b>Необходимое кол-во 95% спирта</b>	кг	1,61	1,52	1,82
<b>Общий вес G @ 25%</b>	кг	6,9973	6,6019	7,8764
<b>Общий объем G @ 25%</b>	л	7,15	6,75	8,05
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>		100,00	100,00	100,00
<b>рН после добавления спирта</b>		7,20	7,25	7,16
<b>Отрегулированный рН</b>			7	7,02
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл		0,4	0,2
<b>Общий объем буфера рН 4,0</b>	л		0,0027	0,0016
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг		0,0029	0,0017
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>			10	10
<b>Общий объем G @ 25% после регулировки рН</b>	л	7,15	7,05	7,06
<b>Время выдержки</b>	часов	16,48	16,53	17,47
<b>Извлеченный образец для определения рН</b>		10,00	10,00	10,00
<b>рН после выдержки</b>		7,24	7,16	7,04
<b>Объем разбавленного буфера рН 4,0</b>	мл	0,05		
<b>Общий объем буфера рН 4,0</b>	л	0,004	0,000	0,000
<b>Вес буфера рН 4,0</b>	кг	0,004	0,000	0,000
<b>Конечный рН перед фильтрацией</b>		6,97	7,16	7,04
<b>Извлеченный образец для</b>	мл	10	10	10

**определения рН**

<b>Время фильтрации</b>	минуты	<b>43</b>	<b>47</b>	<b>58</b>
<b>Вес фильтрата G</b>	кг	5,707	5,189	6,479
<b>Мутность G @ 25%</b>	NTU	10,4	15,0	6,8
<b>Вес материала, высушенного воздухом</b>	кг	0,8675	0,9166	0,7886
<b>Вес Ppt G</b>	кг	0,1451	0,1371	0,1541
<b>% этапа регенерирования</b>	%	96%	95%	94%
<b>Выход пасты</b>	г/л CPP	29,02	27,42	25,68

**3.2 Результаты**

Результаты этого исследования представлены на **Фиг. 7A-7D**.

В типовом экспериментальном цикле, регенерирование пасты Фракции I для плазмы, высушенной распылением, было выше, чем для контроля. Это было связано с более низким регенерированием криопреципитата (криопреципитат был перенесен в преципитат Фракции I). Высушенную распылением плазму концентрировали (около 25%) посредством крио- и Фр. I преципитации с последующим разделением за один этап (CRP непосредственно на этапе Фр.1) - количество Ppt G, полученное в результате этого теста, было сравнимо с контрольной замороженной исходной плазмой. Это демонстрирует, что процесс может сочетать криогенное извлечение и извлечение фракции I вместе.

Настоящее изобретение было проиллюстрировано ссылкой на различные типовые варианты его осуществления и примеры. Как будет очевидно специалистам в данной области техники, другие варианты осуществления и вариации этого изобретения могут быть разработаны другими специалистами в данной области техники без отклонения от истинной сущности и объема изобретения. Приложенная формула изобретения должна рассматриваться как включающая все такие варианты осуществления и эквивалентные варианты.

Описание каждого патента, патентной заявки и публикации, цитируемых в данном документе, настоящим полностью включено в этот документ посредством ссылки.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ фракционирования плазмы человека с применением процедуры фракционирования по Кону, при этом усовершенствование включает использование для процедуры фракционирования физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека в качестве исходного материала.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что криопасту выделяют из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, а белок, выбранный из Фактора VIII, Фактора IX и их комбинации, выделяют из криопасты с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы.

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что активность белка составляет не менее 80% от активности белка, выделенного из свежемороженой плазмы.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что IgG, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы.

5. Способ по п. 2, отличающийся тем, что активность IgG составляет не менее 80% от активности IgG, выделенного из свежемороженой плазмы.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что белок, выделенный из Фракции IV-1 фракционированной физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выбранный из A1PI, AT-III и их комбинации, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что IgG, выделенный из физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что альбумин, выделенный из Фракции V физиологически активной восстановленной высушенной распылением плазмы человека, выделяют с выходом не менее 80% от выхода, с которым этот белок выделяют из свежемороженой плазмы.

9. Композиция, содержащая элемент, выбранный из криопасты и криообедненной плазмы, полученной способом по п. 1.

10. Композиция, содержащая элемент, выбранный из пасты Фракции I и супернатанта Фракции I, полученных способом по п. 1.

11. Композиция, содержащая элемент, выбранный из пасты Фракции II+III и супернатанта Фракции II+III, полученных способом по п. 1.

12. Композиция, содержащая элемент, выбранный из пасты Фракции IV-1 и супернатанта Фракции IV-1, полученных способом по п. 1.

13. Композиция, содержащая элемент, выбранный из пасты Фракции IV-4 и

супернатанта Фракции IV-4, полученных способом по п. 1.

14. Композиция, содержащая элемент, выбранный из пасты Фракции V и супернатанта Фракции V, полученных способом по п. 1.

15. Препарат фактора свертывания крови, полученный способом по п. 1.

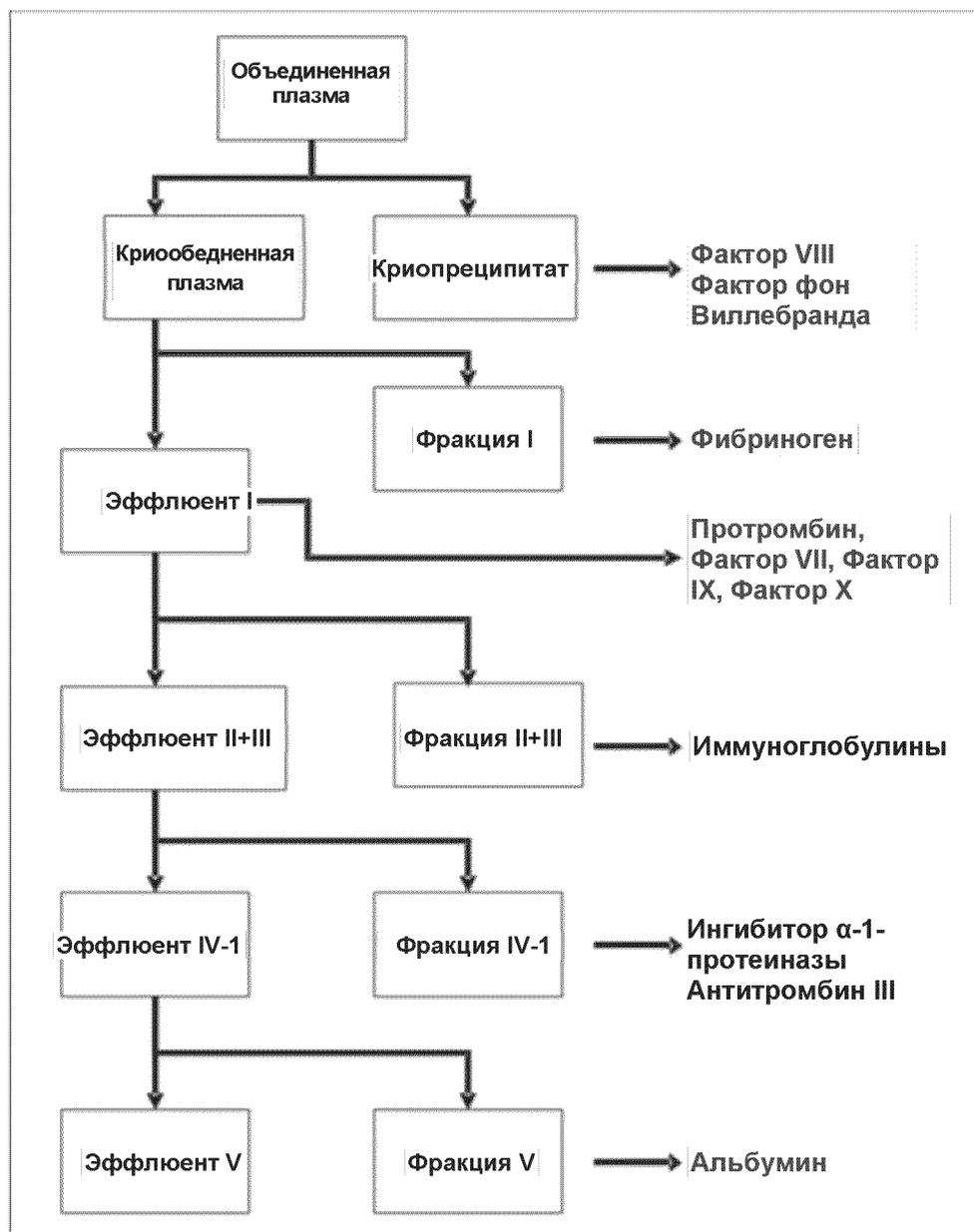
16. Препарат IgG, полученный способом по п. 1.

17. Препарат элемента, выбранного из A1PI, AT-III и их комбинации, полученный способом по п. 1.

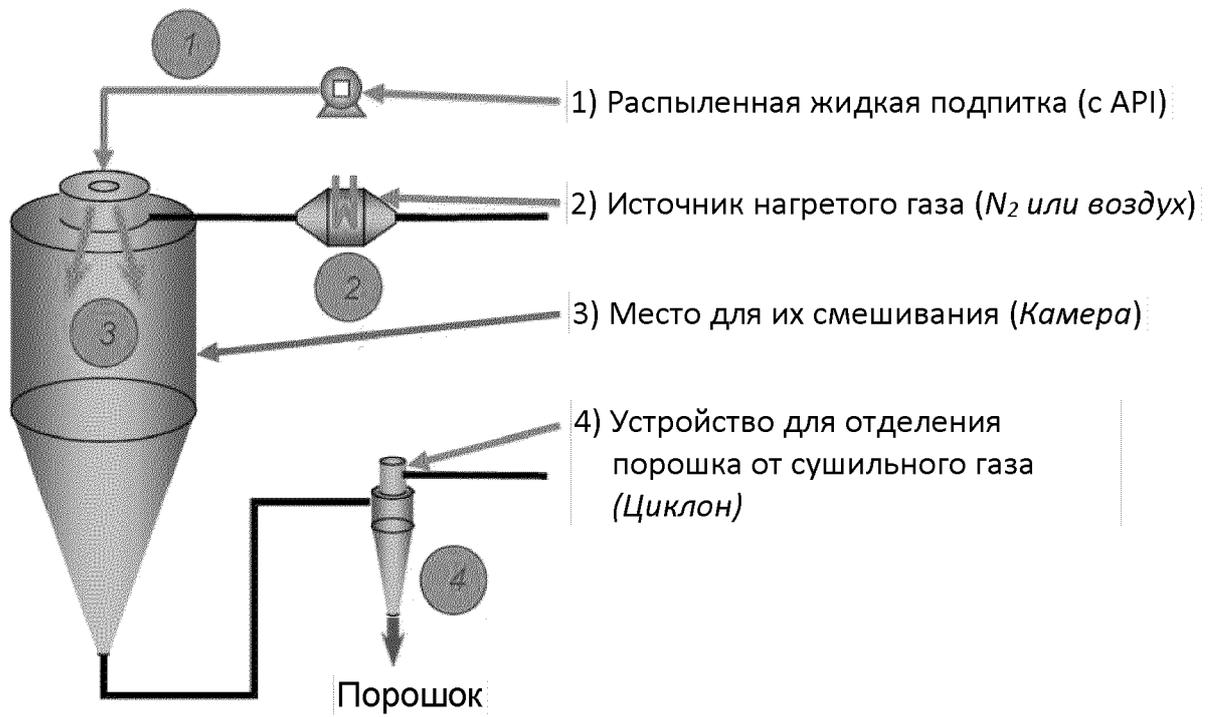
18. Препарат альбумина, полученный способом по п. 1.

По доверенности

ФИГУРА 1



ФИГУРА 2



ФИГУРА 3

Активность факторов свертывания размороженной плазмы, полученной из FFP\*

Фактор свертывания крови	Уровень *					Среднее изменение со Дня 1 по День 5 (%)	р-значение
	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5		
Фактор VIII (%)							
Группа крови А	107 ± 26	76 ± 19	66 ± 18	65 ± 17	63 ± 16	41	<0,004‡
Группа крови В	103 ± 44	74 ± 37	71 ± 35	67 ± 36	67 ± 33	35	<0,02‡
Группа крови О	70 ± 16	51 ± 10	43 ± 10	43 ± 7	41 ± 8	41	<0,001‡
Фактор II (%)	81 ± 9	81 ± 9	81 ± 9	80 ± 10	80 ± 10	1	NS
Фактор V (%)	79 ± 7	75 ± 8	71 ± 9	68 ± 9	66 ± 9	16	NS
Фактор VII (%)	90 ± 18	81 ± 15	76 ± 15	72 ± 14	72 ± 15	20	NS
Фактор X	85 ± 13	84 ± 13	84 ± 15	82 ± 11	80 ± 11	6	NS
Фибриноген (мг/дл)	225 ± 12	224 ± 13	224 ± 13	224 ± 17	225 ± 12	0	NS

ФИГУРА 4

А/ПРОЦЕСС	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11	
Содержание твердых веществ (об/об)	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	6,22%	Параметры DOE
Общий объем дозированного образца (мл)	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	140	Параметры другого технологического оборудования
Общий объем дозированного образца (г)	139,3	139,82	139,12	142,55	142,58	144,95	140,3	140,04	141,36	139,51	140,85	региструемые данные во время обработки
Поток воздуха внутр. (м³/мин)	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,4	0,4	0,4	Ответы DOE
Темп. внутр. (°C)	100	100	110	110	100	100	110	110	105	105	105	
Скорость потока воздуха в форсунках (л/мин)	10	10	10	10	15	15	15	15	12,5	12,5	12,5	
Скорость распыления (л/мин)	4	8	8	4	8	4	4	8	6	6	6	
Клонка	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	расширенная	
Циклон	большой	большой	большой	большой	большой	большой	большой	большой	большой	большой	большой	
Воздушный циклон (л/мин)	400	200	400	200	400	200	400	200	300	300	300	
Наконечник двухжидкостной форсунки (мм)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Скорость откачивания (об/мин)	60	120	120	60	120	60	60	120	90	90	90	
Температура камеры внешн. (°C)	34,9	44,6	32,1	56,5	30,4	53,7	41,3	52,2	44,6	44,9	44,2	
Температура перед циклоном (°C)	30,3	38,9	28,7	48,6	27,4	47,3	34	45,3	35,2	36	37,3	
Падение давления в циклоне (мбар)	29,3	30,9	28,8	29,6	27	23,5	28	29,3	27,4	28,4	28,3	
Общее кол-во дозированного твердого вещества (г)	8,66	8,69	8,65	8,86	8,86	9,01	8,72	8,71	8,79	8,67	8,76	
Регенерированное твердое вещество (г)	8,57	9,42	6,99	10,28	5,18	9,84	9,31	9,99	9,67	9,56	9,74	
LOD (%)	10,34	9,4	15,56	5,42	14,48	7,47	7,74	7,94	9,23	9,9	9,52	
Время восстановления (ч:мм:сс)	04:51.0	05:40.0	05:47.0	04:38.0	05:13.0	05:49.0	06:26.0	06:25.0	05:17.0	05:53.0	05:36.0	
Регенерирование (на основе взвешивания) и скорректированное значение LOD(%) ожидаемый результат анализа общего белка (г/л)	88,72	98,17	68,24	109,7	49,97	101,03	98,47	105,63	99,67	99,3	100,63	
фактический результат анализа общего белка (г/л)	54,91	61	42,18	69,47	31,69	65,07	61,37	65,71	62,71	61,54	62,95	
регенерирование на основе анализа белка	44,7	47,6	32,2	54,1	27,2	51,4	47,8	51	48,6	49	48,8	
Takeda (%) фактическая навеска порошка для восстановления (г)	71,86	76,53	51,77	86,98	43,73	82,64	76,85	81,99	78,14	78,78	78,46	
Объем для восстановл. 3,75 г (мл)*	3,7519	3,7524	3,752	3,751	3,756	3,7518	3,7512	3,7509	3,751	3,751	3,7504	
	61,26	55,732	75,107	51,07	101,351	53,354	56,391	52,553	54,292	54,916	53,901	
	Не сухой (конденсационная стенка сушильной камеры)			Не сухой (конденсационная стенка сушильной камеры)								
* Объем для восстановления 3,75 г = V начального/регенерированного твердого вещества * 3,75 = 140 мл * 3,75 г												

4/11

**ФИГУРА 5А**

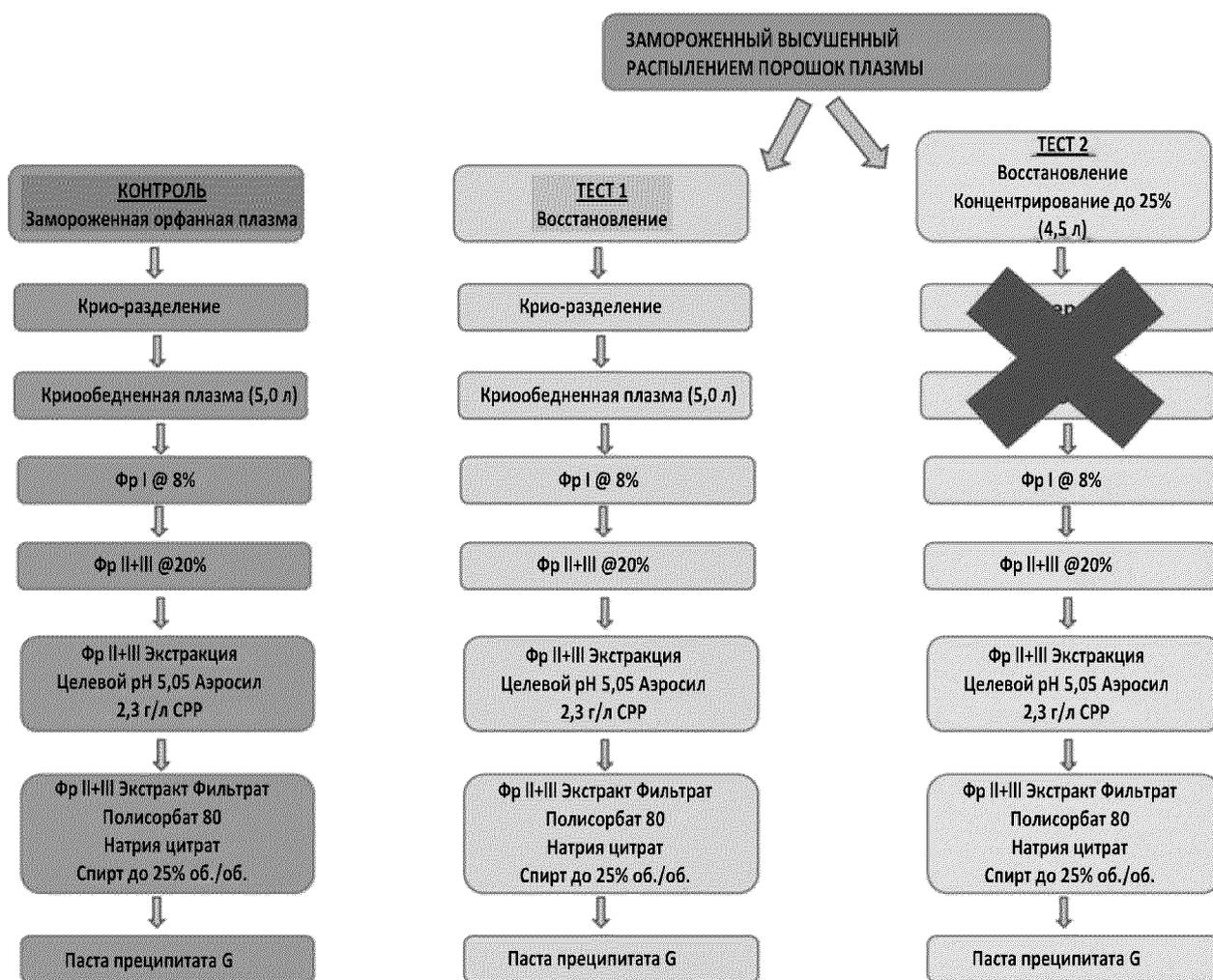
анализ	ID образца							
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8
ТР Белок (биуретовый)	44,7	47,6	32,3	54,1	27,2	51,4	47,8	51,0
Электрофорез (PAE/GE)								
Преальбумин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Альфа-1 глобулин	1,9	1,9	2,0	2,0	2,0	2,3	2,2	2,1
Альфа-2 глобулин	8,2	8,2	8,3	8,1	8,4	8,1	8,3	8,1
Бета-глобулин	12,7	12,8	12,9	12,3	13,0	12,7	12,8	12,5
Гамма-глобулин	9,0	9,0	9,7	9,4	9,5	9,2	9,4	9,7
Альбумин	68,2	68,1	67,1	68,2	67,1	67,7	67,3	67,6
MSD								
IgG(neph)	6,70	6,55	5,13	8,41	3,85	7,44	6,70	7,56
Альбумин	26,8	28,7	19,9	34,5	17,8	30,6	29,7	31,5
Субклассы IgG (neph)	4,58	5,24	3,53	5,89	2,95	5,40	5,12	5,26
	1,94	2,04	1,45	2,37	1,25	2,10	1,97	2,22
	0,189	0,208	0,144	0,243	0,122	0,222	0,197	0,226
	0,338	0,343	0,246	0,417	0,196	0,384	0,359	0,379
Тромбин-антитромбиновый комплекс (TAT)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5
Фибриноген (FPA)	38,9	42,1	46,4	58,9	19,5	33,0	56,8	61,7
Ab против кори								
FVIII (активность)								
Альфа-1-антитрипсин (активность)								
Ингибитор C1 эстеразы (активность)								

5/11

ФИГУРА 5В

анализ	ID образца	ID образца	ID образца	ID образца	ID образца	ID образца	ID образца	ID образца	ID образца
	N9	N10	N11	RPM1	RPE1	RPM2	RPE2	результат	N9
	costar 50 мл	costar 50 мл	costar 50 мл	флакон плазмы	флакон плазмы	флакон плазмы	флакон плазмы		
				25.06.2020 утро	25.06.2020 вечер	26.06.2020 утро	26.06.2020 вечер		
ТР Белок (биуретовый)	48,6	49,0	48,8	62,0	62,2	62,1	62,4	г/л	
Электрофорез (PAE/GE)									повтор в конце эксп.
Преальбумин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0
Альфа-1 глобулин	2,0	2,1	2,1	1,9	1,9	1,9	2,0		1,8
Альфа-2-глобулин	8,3	8,3	8,3	8,1	8,2	8,3	8,2		8,1
Бета-глобулин	13,1	12,7	13,1	12,5	12,3	12,7	12,5		12,9
Гамма-глобулин	9,3	9,4	9,4	9,3	9,4	9,3	9,5		9,2
Альбумин	67,3	67,5	67,1	68,2	68,2	67,8	67,8		68
MSD									
IgG (nepH)	7,02	7,54	7,49	8,80	9,29	9,46	9,36	г/л	
Альбумин	28,8	29,6	29,7	38,3	38,7	38,8	39,3	г/л	
Субклассы IgG (nepH)	4,99	5,28	5,09	6,60	6,54	6,25	6,45	г/л	
	2,08	2,07	2,17	2,67	2,67	2,56	2,63	г/л	
	0,209	0,217	0,213	0,276	0,271	0,288	0,284	г/л	
	0,362	0,391	0,397	0,504	0,492	<b>0,511</b>	0,504	г/л	
Тромбин-антитромбиновый комплекс (ТАТ)	<2,5	<2,5	<2,5	<2,5	3,07	<2,5	<2,5	нг/мл	
Фибриноген (FPA)	<19	19	<19	36,7	37,1	27,6	31,3	нг/мл	
Ab против кори	0,16	0,198	0,144	0,523	0,471	0,415	0,396	IE/мл	
FVIII (активность)	0,821	0,867	0,849	1,127	1,1	1,14	1,093	мг/мл	
Ингибитор C1 эстеразы (активность)	0,585	0,596	0,582	0,788	0,784	0,757	0,768	IE/мл	

6/11



ФИГУРА 6

ФИГУРА 7А

Параметр	Единица	КОНТРОЛЬ (Замороженная плазма)	ТЕСТ 1 (плазма, высушенная распылением)	ТЕСТ 2 (Концентрированна я плазма, высушенная распылением. Крио и Фр I осаждение и разделение в один этап)	ТЕСТ 3 (Крио и Фр I осаждение и разделение в один этап)	Эталонное значение на основе исследования замороженной плазмы	Предыдущий диапазон
IgG в CPP (или CRP для ТЕСТ 2)	г/л	9,3	8,84	10,95	7,72	7,3	
Альбумин в CPP (или CRP для ТЕСТ 2)	г/л	39	39,3	49,45	37,00	34,9	
Альбумин Регенерирование в Фр II+III Фильтрат с отрегулированны м отбором образцов	% от CPP (CRP для ТЕСТ 2 и ТЕСТ 3)	91,1	88,1	89,8	78,8		
Регенерирование IgG в Фр II+III Фильтрат экстракта с отрегулированны м отбором образцов	% от CPP (CRP для ТЕСТ 2 и ТЕСТ 3)	77,6	74,9	76,1		н.о.	н.о.

**ФИГУРА 7В**

<b>Примесь С3 в пасте Ppt G</b>	мг/дл@5%TP	50,7	57,5	49,1		24,1	≤233
<b>Примесь фибриногена в пасте Ppt G</b>	мкг/мл@5%TP (данные LA)	23	22,9	23,8		5,9	≤201
<b>Примесь фибриногена в пасте Ppt G</b>	мкг/мл@5%TP (данные Vienna)	13	25	9		5,9	≤201
<b>Примесь FXI в пасте Ppt G</b>	Е/мл @5% TP	0,016	0,049	0,111		0,038	≤1,33
<b>Примесь PL-1 в пасте Ppt G</b>	нмоль/мл мин @5% TP	<10	<10	<10		<10	≤55,3
<b>Примесь FXII в пасте Ppt G</b>	МЕд/мл @5% TP	5,57	4,77	3,72		<29	н.о.
<b>Примесь РКА в пасте Ppt G</b>	Е/мл @5% TP	<4	<4	<4		<4	≤74,7
<b>Агрегаты в пасте Ppt G</b>	Полимер %	9,2	10,5	9,4		8	≤10,5
<b>Белковая композиция в пасте Ppt G (PСА)</b>	Гамма-глобулины (%)	88,8	89,2	92,7		91,9	≥86

**ФИГУРА 7С**

**ТЕСТ 3**

<b>Примесь РКА в пасте Fr V</b>	IE/мл		21,2	46,8 (<20, 97)
<b>Примесь РКА в пасте Fr V</b>	IE/г TP		0,42	7,82 (3,04, 17,3)
<b>Агрегаты в пасте Fr V</b>	Полимер %		-	0,277 (0, 0,522)
<b>Белковая композиция в пасте Fr V (РСА)</b>	Гамма-глобулины (%)		-	99,07 (98,45, 99,6)
<b>Альбумин в пасте Fr V</b>	мг/г TP		974	1020 (944, 1079)
<b>НРТ в пасте Fr V</b>	мг/г TP		4,62	7,02 (3,73, 10,8)
<b>TRF в пасте Fr V</b>	мг/г TP		0,33	0,39 (0,056, 3,17)
<b>ААТ в пасте Fr V</b>	мг/г TP		0,17	0,1 (0,079, 0,138)

Эталонное значение на основе среднего значения замороженной плазмы (самое низкое, самое высокое)

**ФИГУРА 7D**

<b>ААГ в пасте Fr V</b>	мг/г ТР		1,50	3,66 (1,17, 15,4)
<b>СЕР в пасте Fr V</b>	мг/г ТР		0,09	0,15 (0,053, 0,421)