

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391549 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30(22) Дата подачи заявки
2017.07.26(51) Int. Cl. C07K 16/06 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/22 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)

(54) ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

(31) 16181493.4

(32) 2016.07.27

(33) EP

(62) 201990392; 2017.07.26

(71) Заявитель:
БИОТЕСТ АГ (DE)(72) Изобретатель:
Манег Оливер, Ханнаппель Ахим,
Мёленкамп-Рёттгер Александер,
Мёллер Вольфганг, Рудник Дитер
(DE)(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтически приемлемых композиций иммуноглобулинов из полученных из плазмы фракций иммуноглобулинов, позволяющему параллельное получение композиций иммуноглобулинов, обогащенных IgG, IgM и IgA. По этому способу иммуноглобулин, содержащийся в фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера/Нитшманна A+I, ресольбилизируют при проводимости по меньшей мере 1 мСм/см и после удаления загрязняющего белка ресольбализированный иммуноглобулин подвергают анионообменной хроматографии для получения обогащенных IgG и IgM/IgA композиций иммуноглобулинов. Обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов дополнительно подвергают обработке с использованием катионообменного материала для получения композиции иммуноглобулинов, имеющей уменьшенное содержание пропердина.

A1

202391549

202391549

A1

ПРОЦЕСС ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Настоящее изобретение относится к способу получения обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов и, необязательно, обогащенных IgM и/или IgA композиций иммуноглобулинов из плазмы человека, к способу уменьшения содержания пропердина в содержащих пропердин композициях IgG и к обогащенным IgG фармацевтическим композициям иммуноглобулинов.

Композиции иммуноглобулинов, полученные из плазмы человека и пригодные для медицинского применения, известны в данной области и в течение нескольких десятилетий играли важную роль в лечении широкого диапазона заболеваний. Иммуноглобулины используют, например, для лечения инфекций у человека, и их можно приписывать к различным классам с различными биохимическими и физиологическими свойствами. Например, IgG участвует в защите против вирусных антигенов, в то время как IgM является преимущественно активным в иммунных ответах против бактерий и токсинов, и таким образом, его используют в профилактике или лечении бактериальных инфекций. Коммерческие композиции иммуноглобулинов, таким образом, содержат IgG, IgA и IgM в различных процентах, где различные препараты имеют различные терапевтические применения. В настоящее время, пентаглобин® (Biotest AG, Dreieich, Germany) является единственной содержащей IgM композицией иммуноглобулинов, коммерчески доступной на рынке.

Композиции иммуноглобулинов для медицинского применения обычно получают из фракций плазмы или сыворотки крови, которые получают посредством классических способов фракционирования плазмы Кона или их хорошо известных модификаций, например, Кона/Онкли и Кистлера/Нитшманна. Затем эти фракции подвергают ряду стадий очистки для удаления загрязнений, включая вирусы, денатурированные белки, протеазы и липиды. Плазма человека для фракционирования собрана от тысяч доноров и может содержать патогенные вирусы, несмотря на тщательное тестирования источника плазмы. Таким образом, стадии способа для инактивации или удаления вирусов являются важными для получения безопасных продуктов для

медицинского применения. В данной области известно несколько способов инактивации/удаления вирусов, например, химические или термические обработки, облучение УФ-С светом или нанофильтрация, которые проводят для обеспечения общей вирусной безопасности.

В дополнение к вирусам, которые потенциально присутствуют, является также важным удаление других загрязняющих примесей, таких как протеолитические ферменты, вазоактивные вещества, такие как активатор прекалликреина, агрегаты белка и денатурированные иммуноглобулины, для получения продукта с хорошей переносимостью. Денатурированные иммуноглобулины и агрегаты иммуноглобулинов имеют потенциальный риск для пациентов, поскольку они имеют большую способность к неспецифической активации комплемента, приводящей к тяжелым побочным эффектам у пациентов, которым вводят эти денатурированные иммуноглобулины. Способность композиции иммуноглобулинов к неспецифической активации системы комплемента связана с их антикомплементарной активностью (АСА), которая представляет собой способность композиции белка расходовать комплемент в анализе комплемента, и которую можно измерять посредством стандартизованных способов тестирования, например, способом, как описано в Европейской фармакопее 8.0 (2.6.17 – Тестирование антикомплементарной активности иммуноглобулинов), в соответствии с которой допустимый предел для АСА составляет $< 1 \text{ CH50/мг белка}$.

Удаление всех этих загрязняющих примесей является важным (1) чтобы продукт являлся переносимым пациентом после внутривенного введения, (2) для обеспечения соответствия продукта руководствам по биологической безопасности применительно к вирусному загрязнению, (3) для обеспечения стабильности продукта в ходе длительного хранения и (4) для получения желательной смеси соединений/фармацевтической композиции.

Способы получения обогащенных IgG, IgM и/или IgA композиций иммуноглобулинов описаны в предшествующей области техники.

В ЕР 0 447 585 А1 описано получение переносимых при внутривенном введении растворов поликлонального IgG, которые должны быть свободными от агрегатов, вазоактивных веществ и протеолитической активности. Начиная с фракций Кона II или II/III,

и после обработки октановой кислотой для преципитации загрязняющего белка, полученный раствор подвергают катионообменной хроматографии для удаления агрегатов IgG, которые могут присутствовать в фракциях Кона II или II/III в количествах вплоть до 5%. Катионообменную хроматографию можно проводить в условиях, в которых IgG является связанным с катионообменным материалом, или в проточном режиме.

В EP 0 825 998 описано получение фармацевтически приемлемых препаратов IgG, начиная от фракции Кона II или супернатанта фракции III. Для прекращения антикомплементарной активности и для инактивации вируса, фракции обрабатывают пепсином и подвергают обработке растворителем/детергентом. Химические вещества и пепсин, использованные для инактивации вируса, удаляют посредством обработки с использованием катионообменника.

В US 2013/0058961 A1 описаны способы уменьшения антикомплементарной активности в полученной из плазмы композиции иммуноглобулинов, содержащей IgG, где суспендированные преципитаты фракций плазмы, выбранные из преципитатов фракции Кона и преципитатов Кистлера-Нитшманна, приводят в контакт с катионообменной смолой в условиях первого раствора, имеющего pH не более 6,0 и проводимость не более 11 мСм/см, для связывания иммуноглобулинов IgG и первого уровня АСА на катионообменной смоле, и при этом иммуноглобулины IgG элюируют с катионообменной смолы посредством приведения катионообменной смолы в контакт с буфером для элюции, имеющим pH по меньшей мере 7,5 и проводимость по меньшей мере 15 мСм/см для получения элюата, содержащего лидирующую часть, содержащую не более 80% элюата, имеющую уменьшенную АСА и содержащую IgG. Описанные способы не включают выделение композиций иммуноглобулинов, содержащих IgM и IgA.

В WO 98/05686 A описан способ очистки или выделения IgG из материала плазмы, где материал плазмы подвергают хроматографическому фракционированию на макропористой анионообменной смоле для удаления загрязняющего белка, в частности, трансферрина, и IgM. Желательный IgG получают в проскоке с анионообменной смолы. Супернатант Кона I, подвергнутый делипидизации посредством адсорбции на тонко измельченном диоксиде

кремния, или солюбилизированные фракции Кона II+III используют в качестве исходного материала для получения очищенного IgG.

В US 4136094 описано получение содержащих IgG композиций иммуноглобулинов для внутривенного введения, где плазму крови человека смешивают с высокодисперсным диоксидом кремния для адсорбции загрязняющего белка для стабилизации продукта плазмы, с последующим подверганием стабилизированного продукта плазмы анионообменной хроматографии и отделением очищенного IgG. Как описано в WO 98/05686, обработка диоксидом кремния приводит к уменьшению количества IgG₃. Однако, природное распределение подклассов IgG, является обязательным для коммерческих препаратов IgG современного уровня техники.

В родственной US 4296027 А описано, что предшественники компонентов систем фибринолиза, свертывания крови и кининогена, такие как фибриноген, плазминоген, фактор XII, компоненты системы прекалликреина и компоненты комплемента удаляют из плазмы крови посредством обработки диоксидом кремния. В то время как обнаружено, что пропердин являлся частью удаленного белка и не был детектирован в обработанной неочищенной плазме, конечные композиции IgG не тестировали по содержанию пропердина, и роль этой молекулы для препаратов иммуноглобулинов, которые можно использовать для внутривенного введения, не обсуждали.

В WO 2011/080698 А описан способ получения композиций IgG для внутривенного введения посредством подвергания плазмы человека или продукта плазмы человека, обогащенного по IgG, катионообменной хроматографии в условиях, разработанных для обеспечения связывания IgG. После элюции раствор IgG подвергают анионообменной хроматографии для дальнейшей конечной очистки.

В EP 0 413 187 A1 описан способ получения растворов иммуноглобулинов для внутривенного введения, содержащих IgM, IgA и IgG в концентрированной форме и имеющих распределение подклассов IgG, близкое к распределению в нормальной пулированной плазме крови. Начиная с фракции Кона III, эти растворы иммуноглобулинов получают посредством подвергания супернатанта после обработки октановой кислотой адсорбции на DEAE-Sephadex A-50.

В ЕР 0 013 901 А1 описан способ получения обогащенных IgM композиций иммуноглобулинов, начиная с фракции Кона III и включая стадии с использованием октановой кислоты, β -пропиолактона и стадию адсорбции с использованием анионообменной смолы. Этот способ используют для получения пентаглобина® – до настоящего времени единственного коммерчески доступного продукта IgM для внутривенного введения. β -пропиолактон является хорошо известным химическим веществом, используемым на стадиях стерилизации для инактивации потенциально присутствующих вирусов. β -пропиолактон является очень реакционноспособным веществом, вызывающим химическую модификацию белков.

ЕР 0 352 500 А2 описано получение концентрата IgM для внутривенного введения с уменьшенной антикомплементарной активностью с использованием анионообменной хроматографии, β -пропиолактона, облучения УФ-С светом и стадии инкубации при повышенной температуре (40°C – 60°C). Препарат, полученный этим способом, являлся стабильным в жидком растворе в течение ограниченного времени из-за химической модификации.

ЕР 0 345 543 А2 описан высококонцентрированный препарат IgM с по меньшей мере 33% IgM для терапевтического применения, являющийся в основном свободным от титров изоагглютина. В этой патентной заявке преципитацию октановой кислотой проводят посредством добавления октановой кислоты, и изоагглютинины удаляют посредством аффинной хроматографии на Synsorb. Конечный препарат необходимо лиофилизировать.

ЕР 0 413 188 А1 описано получение растворов белка, обогащенных IgM и IgG. Начиная с фракции Кона III или II/III, эти способы включают подвергание раствора белка обработке октановой кислотой и анионообменной хроматографии, где IgM и IgA связываются с анионообменной смолой, и обогащенную фракцию IgG можно получать как фракцию проскока.

ЕР 0 450 412 А описано использование мягкой термической обработки препаратов IgM при 40–62°C, предпочтительно, 45–55°C, при pH 4,0–5,0, для уменьшения неспецифической активации комплемента. В этой патентной заявке октановую кислоту добавляют к суспензии

фракции Кона III для удаления активатора прекалликреина и липопротеинов посредством центрифугирования. Термическая обработка приводит к частичной потере антигенных детерминант IgM. Это может увеличивать риск образования неоантигенов, приводя к увеличенной иммуногенности для человека или потере активности.

В WO 2011/131786 и WO 2011/131787 описаны способы получения композиций иммуноглобулинов IgM, начиная с фракции Кона I/III или фракции Кистлера/Нитшманна В или В+I. Фракции получают в форме раствора, содержащего иммуноглобулины, и смешивают с октановой кислотой и обрабатывают с использованием встряхивающей мешалки для преципитации загрязняющего белка. Преципитированный белок удаляют из раствора для получения содержащей IgM композиции иммуноглобулинов. Использование встряхивающей мешалки на стадии, когда раствор иммуноглобулина смешивают с октановой кислотой, приводит к более сильным инактивации и удалению вирусных частиц, особенно, безоболочечных вирусов, в ходе этого процесса. Кроме того, достигают улучшенного удаления протеолитической активности по сравнению с общепринятым перемешиванием. IgG, содержащийся в фракции Кона II, удаляют до преципитации исходного материала.

Как описано в предшествующей области техники, способы получения обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов обычно начинают с фракции Кона II или фракций Кона II/III, содержащих основную часть IgG. Фракцию Кона I, содержащую только небольшие количества иммуноглобулинов, но большие количества фибриногена и других нежелательных загрязняющих белков, обычно удаляют. С другой стороны, обогащенные IgM и IgA композиции иммуноглобулинов обычно получают, начиная с фракции Кона III, которая содержит основную часть IgM и IgA, после отделения от фракции Кона II, которая содержит основную часть IgG. Таким образом, удаление в фракции Кона I нежелательных белков, таких как фибриноген, на ранней стадии получения, облегчает получение содержащих IgG композиций с одной стороны, и содержащих IgM и IgA композиций с другой стороны. Однако, преципитация фракции Кона I, имеет несколько недостатков. Конкретно, преципитация фракции Кона I приводит к потере иммуноглобулинов из-за уноса супернатанта с преципитатом фракции I и из-за технических потерь в ходе фильтрации или

центрифугирования, особенно, когда IgA и IgM подвергают дополнительному напряжению сдвига посредством этих стадий фильтрации или центрифугирования. Кроме того, отдельная фильтрация или центрифугирование приводит к более высокой стоимости производства из-за более высокой стоимости трудозатрат и стоимости оборудования и расходных материалов.

Использование объединенных фракций Кона I/II/III в качестве исходного материала для одновременного получения обогащенных IgG, IgA и IgM композиций иммуноглобулинов, чтобы избежать потерь иммуноглобулина и для увеличения выхода желательных иммуноглобулинов, может, однако, приводить к проблемам с удалением нежелательных иммуноглобулинов и загрязнений и, таким образом, к неприемлемой АСА. В частности, авторы изобретения наблюдали, что обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов, полученные из фракций Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I после анионообменной хроматографии, все еще имели неприемлемо высокую АСА.

Целью изобретения является предоставление экономичного способа получения фармацевтически приемлемых композиций иммуноглобулинов из плазмы крови, в частности, композиций иммуноглобулинов, соответствующих допустимому пределу антикомплемментарной активности в соответствии с Европейской фармакопеей, где способ позволяет параллельное получение обогащенных IgG, IgM и IgA композиций иммуноглобулинов для поддержания потерь иммуноглобулинов из плазмы крови настолько низкими, насколько это возможно.

Следующей целью изобретения является предоставление способа уменьшения содержания пропердина в содержащих пропердин композициях IgG.

Следующей целью изобретения является предоставление фармацевтически приемлемой композиции IgG, соответствующей допустимому пределу антикомплемментарной активности в соответствии с Европейской фармакопеей.

Настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтически приемлемых композиций иммуноглобулинов из полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, содержащей или

состоящей из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I, где указанный способ включает стадии:

(а) ресольбулизации иммуноглобулина, содержащегося в полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, содержащей или состоящей из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I, посредством ресуспендирования указанной полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов в условиях для доведения проводимости суспензии по меньшей мере до 1 мСм/см, для получения суспензии, содержащей ресольбулизированные IgG, IgM и IgA;

(b) преципитации, и необязательно, адсорбции, загрязняющего белка в суспензии, полученной на стадии (а), и удаления указанного загрязняющего белка для получения истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов;

(с) подвергания истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (b), ионообменной хроматографии с использованием анионообменной смолы в условиях pH и проводимости, доведенных до значительного связывания IgM и IgA и, необязательно, IgG, со смолой, и получения обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов в фракции проскока и/или посредством элюции IgG с анионообменной смолы в условиях, в которых IgM и IgA остаются связанными с анионообменной смолой, необязательно, с последующей элюцией IgM и/или IgA с анионообменной смолы для получения композиций иммуноглобулинов, обогащенных IgM и/или IgA; и

(d) подвергания обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (с), обработке с использованием катионообменного материала в условиях pH и проводимости, в которых пропердин связывается с указанным катионообменным материалом, и выделения IgG для получения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, имеющей уменьшенное содержание пропердина.

Термин «обогащенный», как используют в сочетании со специфическими иммуноглобулинами, такими как IgG, IgM и IgA, означает, что доля соответствующего иммуноглобулина является такой, что композиция иммуноглобулинов является обогащенной по отношению по меньшей мере к одному другому иммуноглобулину при сравнении с относительными количествами этих иммуноглобулинов в

нормальной плазме крови и, таким образом, с относительными количествами ресольбилизованных иммуноглобулинов в суспензии, полученной из полученных из плазмы фракций иммуноглобулинов, содержащих или состоящих из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I.

В соответствии со способом по изобретению, АСА в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов, полученной из полученных из плазмы композиций иммуноглобулинов, содержащих или состоящих из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I, уменьшается, если обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов, полученные после анионообменной хроматографии, подвергают дополнительной обработке с использованием катионообменного материала. Авторы изобретения обнаружили, что нежелательная АСА в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов обусловлена высоким содержанием пропердина в фракции Кона I и соответствующих фракциях в других способах фракционирования, которые переводят в раствор в условиях проводимости, необходимой для ресольбилизации IgM и IgA в количествах, необходимых для процессов промышленного производства. Пропердин является ключевым регуляторным белком в альтернативном пути комплемента. Он представляет собой растворимый гликопротеин, обнаруженный в плазме в концентрации приблизительно 25 мкг/мл, и состоит из нескольких идентичных субъединиц по 53 кДа, связывающихся друг с другом способом голова к хвосту с формированием циклических полимеров (обзор см. в L. Kouser et al, *Frontiers in Immunology*, Vol. 4, Article 93, April 2013). Этот пропердин не удаляется посредством общепринятых стадий очистки, таких как обработка октановой кислотой и анионообменная хроматография, как их используют в известных способах получения обогащенных IgM и IgA композиций иммуноглобулинов.

Полученные из плазмы фракции иммуноглобулинов для использования в качестве исходного материала на стадии (а) способа по изобретению содержат или состоят из фракций Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I, т.е., тех фракций из общепринятых способов фракционирования плазмы крови, которые содержат в основном все из иммуноглобулинов IgG, IgA и IgM в плазме крови и, в качестве примеси, часть фибриногена, не отделенную посредством

криопреципитации. Термин «фракция Кона I/II/III», в рамках изобретения, предназначен для включения фракций Кона I/II/III, как получено посредством классического способа фракционирования Кона, так же как фракций, эквивалентных им по составу иммуноглобулинов, полученных посредством модификаций способа фракционирования Кона.

В зависимости от намеченного использования, полученные из плазмы фракции иммуноглобулинов могут быть получены из плазмы крови человека или животного, но, как правило, фракции иммуноглобулинов получены из плазмы человека. Фракции иммуноглобулинов присутствуют в твердой или полутвердой форме и могут содержать значительные количества загрязняющего белка.

На стадии (а), иммуноглобулин, содержащийся в полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, содержащей или состоящей из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I, ресольбилизируют посредством ресуспендирования указанной полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов в условиях для доведения проводимости суспензии до по меньшей мере 1 мСм/см. Это приводит к получению суспензии, содержащей ресольбализированный иммуноглобулин, который в основном состоит из IgG, IgM и IgA. В то время как более низкая проводимость должна являться достаточной для ресольбализации основной части IgG, присутствующего в полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, проводимость по меньшей мере 1 мСм/см необходима для ресольбализации достаточного количества иммуноглобулинов IgM и IgA. Как правило, количество ресольбализированного иммуноглобулина, конкретно, IgA и IgM, увеличивается с увеличением проводимости суспензии, и проводимость суспензии доводят до ресольбализации настолько большого количества иммуноглобулина, содержащегося в полученном из плазмы исходном материале, насколько возможно. Предпочтительно, полученные из плазмы фракции иммуноглобулинов ресуспендируют в условиях для доведения проводимости суспензии по меньшей мере до 1,5 мСм/см, более предпочтительно, по меньшей мере до 2,0 мСм/см, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере до 2,5 мСм/см. Верхний предел проводимости в суспензии не является критическим. Однако, поскольку протеолитическая активность проявляет тенденцию к

увеличению при очень высокой проводимости, проводимость суспензии, как правило, доводят до диапазона от 1,0 мСм/см до 16,0 мСм/см.

Значения проводимости по меньшей мере 1,0 мСм/см, описанные выше, являются достаточными для ресольбулизации по меньшей мере 80% по массе, более предпочтительно, по меньшей мере 85% по массе, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 90% по массе иммуноглобулина, содержащегося в полученных из плазмы фракциях иммуноглобулинов, которые использовали в качестве исходного материала. Доля IgM в суспензии, полученной в этих условиях как правило, лежит в диапазоне от 5% до 11% по массе, предпочтительно, по меньшей мере 6% по массе и более предпочтительно, по меньшей мере 7% по массе, и доля IgA в ресольбулизированном иммуноглобулине, как правило, лежит в диапазоне от 10% до 14% по массе, предпочтительно по меньшей мере 10,5% по массе, и более предпочтительно, по меньшей мере 11% по массе, где каждый диапазон основан на общей массе ресольбулизированного иммуноглобулина в суспензии. Доля IgG в ресольбулизированном иммуноглобулине, как правило, лежит в диапазоне 75%-85% по массе. Ресуспендирование полученных из плазмы фракций иммуноглобулинов при значениях проводимости, как описано выше, как правило, приводит к выходу IgM в суспензии, который составляет по меньшей мере 5 г IgM/кг фракции, предпочтительно, по меньшей мере 7 г IgM/кг фракции, и более предпочтительно, по меньшей мере 9 г IgM/ кг фракции, и к выходу IgA в суспензии, который, как правило, составляет по меньшей мере 11 г IgA/кг фракции, предпочтительно, по меньшей мере 12 г IgA/кг фракции, и более предпочтительно, по меньшей мере 13 г IgA/ кг фракции. Выход IgG в суспензии, как правило, составляет по меньшей мере 90 г IgG/кг фракции и предпочтительно по меньшей мере 95 г IgG/кг фракции. Как правило, соотношение по массе IgM к IgA в ресольбулизированном иммуноглобулине составляет приблизительно 2:3. Значения массы иммуноглобулинов, указанных в настоящем описании, можно легко определять в соответствии со способами, известными в данной области, например, с использованием нефелометрии в соответствии с Европейской фармакопеей 8.0, 2.2.1 (Siemens BN Prospec System).

Как правило, ресуспендирование полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов в условиях для доведения проводимости проводят посредством ресуспендирования полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов с использованием буфера, имеющего подходящий рН и молярность. Как правило, буфер имеет рН в диапазоне от 4,2 до 5,5, предпочтительно, от 4,5 до 5,3, и молярность в диапазоне от 0,025 до 0,2 М, предпочтительно, от 0,05 до 0,15 М, и обычно, приблизительно 0,1 М. В то время как оптимальная молярность буфера, подлежащего использованию, может зависеть от количества солей, уже присутствующих в полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, подлежащей ресуспендированию, значения молярности, значительно ниже 0,025 М, могут приводить к уменьшению ресольюбилизации IgM и IgA, в то время как значения молярности, значительно выше 0,2 М, могут приводить к избыточно высокой проводимости и, таким образом, к более выраженной ресольюбилизации протеолитически активных веществ. Тип буфера не является критичным, при условии, что не присутствует неблагоприятного эффекта на иммуноглобулин. Как правило, однако, ресольюбилизацию проводят с использованием ацетатного буфера, в частности, буфера ацетат натрия. Для ресуспендирования, соотношение по массе буфера к полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, как правило, лежит в диапазоне от 3+1 до 7+1, предпочтительно, от 4+1 до 6+1, и наиболее предпочтительно, от 4,5+1 до 5,5+1.

При значениях проводимости, необходимых в способе по изобретению, часть загрязняющего белка, содержащегося в исходном материале, остается нерастворенной и может быть отделена от содержащей иммуноглобулин суспензии. Однако, пропердин, содержащийся в исходном материале, обнаружен в ресольюбилизированном материале. Кроме того, в то время как доля ресольюбилизированных IgM и IgA в суспензии увеличивается с увеличением проводимости, увеличение проводимости также увеличивает количество пропердина, обнаруженное в ресольюбилизированном материале, что, таким образом, усиливает проблему удаления пропердина на последующих стадиях способа.

Суспензию, содержащую ресольюбилизированный иммуноглобулин, полученную на стадии (а), подвергают стадии преципитации и,

необязательно, адсорбции, (b), где загрязняющий белок в суспензии преципитируют и адсорбируют и могут таким образом удалять из ресольбилизованного иммуноглобулина вместе с другими нересольбилизованными белками для получения истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов, т.е., композиции иммуноглобулинов, содержащей IgG, IgM и IgA, имеющей уменьшенное содержание загрязняющего белка. На этой стадии, а основную часть загрязняющего белка удаляют, за исключением пропердина, которые неожиданно остаются растворенным с иммуноглобулином.

Как правило, преципитация на стадии (b) включает обработку суспензии, полученной на стадии (a), с использованием C7-C9 карбоновой кислоты, предпочтительно, октановой кислоты, для инактивации вируса и для преципитации загрязняющего белка (например, протеаз, вирусов и т.д.). Эта стадия преципитации хорошо известна в данной области и описана, например, в EP 0 447 585 A, WO 2011/131786 и WO 2011/131787. Преципитированный белок удаляют из содержащей иммуноглобулин суспензии для получения истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов.

Обработку C7-C9 карбоновой кислотой, в частности, октановой кислотой, можно осуществлять посредством приведения суспензии, содержащей ресольбилизованный иммуноглобулин, в контакт с кислотой, например, посредством добавления кислоты к суспензии или посредством образования кислоты в суспензии. C7-C9 карбоновая кислота предпочтительно присутствует при концентрации по меньшей мере 0,35 г карбоновой кислоты/г белка и вплоть до концентрации 0,8 г карбоновой кислоты/г белка. Можно использовать также более высокие количества кислоты, но они, как правило, приводят к потере выход иммуноглобулина. Более предпочтительно, кислота присутствует при от 0,45 г карбоновой кислоты/г белка до 0,6 г карбоновой кислоты/г белка, и наиболее предпочтительно, при приблизительно 0,5 г карбоновой кислоты/г белка. Концентрация белка до добавления карбоновой кислоты, как правило, составляет от 20 и до 60 г/л, предпочтительно, от 25 до 40 г/л.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения, обработку суспензии, содержащей ресольбилизованный иммуноглобулин, с использованием, например, октановой кислоты,

проводят посредством смешивания с использованием встряхивающей мешалки. Как описано, например, в WO 2011/131786, использование встряхивающей мешалки может приводить к более высокой инаktivации и удалению вирусных частиц, особенно безоболочечных вирусов, которые обычно не являются очень чувствительными к обработке октановой кислотой, и обеспечивает более эффективное удаление нежелательных белков (включая протеазы). Это приводит к получению промежуточного продукта, лучше подходящего для дальнейших нижестоящих стадий переработки. Можно использовать любой тип коммерчески доступной встряхивающей мешалки, пригодной для использования в химической/фармацевтической промышленности. Примеры пригодных встряхивающих мешалок доступны из Graber+Pfenninger GmbH. В частности, встряхивающую мешалку «Labormodell Typ 1» можно использовать для экспериментов в лабораторном масштабе, и «Industriemixer Typ 4» можно использовать для препаратов в промышленном масштабе. Встряхивающие мешалки можно использовать в соответствии с инструкциями производителя, и в частности, в условиях, описанных производителями как подходящие для перемешивания растворов, содержащих белки. Например, встряхивающие мешалки обычно могут функционировать при менее, чем 100 Гц, с амплитудой менее, чем 10 мм, например, перемешивание с встряхиванием с использованием «Labormodell Typ 1» в лабораторном масштабе авторы настоящего изобретения проводили при 50 Гц, при использовании источника электропитания 230 В. Амплитуду встряхивания в процессе перемешивания можно, предпочтительно, менять между 0 и 3 мм. Мешалки с диаметром платформы между 23 мм и 65 мм можно использовать для экспериментов в лабораторном масштабе, и в промышленном масштабе можно использовать мешалку с диаметром платформы 395 мм (диаметры отверстий 13,5 мм и 16 мм).

Значение pH суспензии на стадии (b) во время перемешивания предпочтительно доводят до диапазона от 4,3 до 5,5, и более предпочтительно, от 4,5 до 5,3. Перемешивание можно проводить с использованием буфера ацетата натрия, например, приблизительно 0,1 М буфера ацетата натрия. Температура, при которой проводят перемешивание на стадии (b), предпочтительно, лежит в диапазоне от

16°C и до 35°C, и более предпочтительно, от 18 и до 30°C. Время перемешивания с использованием встряхивающей мешалки не является конкретно ограниченным, но предпочтительно, составляет по меньшей мере 10 минут и не более, чем 3 часа, и более предпочтительно, в диапазоне от 40 до 120 минут. Периоды времени инкубации менее, чем 30 минут, могут уменьшать уровень инаktivации вируса.

В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения, обработка C7-C9 карбоновой кислотой на стадии (b) может включать обработку суспензии ресольбилизованного иммуноглобулина с использованием адсорбента, такого как трифосфат кальция, для преципитации и адсорбции белка. Предпочтительно, адсорбенты, такие как трифосфат кальция, добавляют при концентрации 0,01-0,02 кг/кг суспензии. Трифосфат кальция можно добавлять одновременно, отдельно или последовательно по отношению к карбоновой кислоте. В предпочтительном варианте осуществления, трифосфат кальция добавляют по меньшей мере 20 минут после начала обработки карбоновой кислотой.

Преципитированный загрязняющий белок удаляют из суспензии для получения истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов, имеющей уменьшенное содержание загрязняющего белка. Эта стадия удаления не является конкретно ограниченной, но ее можно проводить любым пригодным способом, известным в данной области. Предпочтительно, стадию удаления проводят с использованием фильтрации, необязательно, с последующей стадией ультрафильтрации и/или диафильтрации, для удаления карбоновой кислоты, такой как октановая кислота, используемой для преципитации. Истощенная по примесям композиция иммуноглобулинов, полученная на стадии (b), предпочтительно имеет, на основании общего количества 40 г/л белка в композиции, тромбогенную активность (TGA) < 3 мед./мл; активатор прекалликреина < 10%, более предпочтительно, < 5% от нормы для плазмы человека; протеолитическую активность < 20 ед./л; и α_2 -макроглобулин < 0,2 г/л. Более конкретно, тромбогенной активности (TGA) < 1,5 мед./мл; активатора прекалликреина < 2,5% от нормы для плазмы человека; протеолитической активности < 11 ед./л; и α_2 -макроглобулина < 0,1 г/л можно достигать на стадии (b). Содержание

пропердина в этих промежуточных композициях, как правило, составляет более, чем 75 мкг/мг белка.

После удаления загрязняющего белка, стадия (b) может дополнительно включать обработку слабой кислотой для дополнительной инактивации вируса. Для обработки слабой кислотой, композицию иммуноглобулинов, полученную после удаления белка, инкубируют при pH в диапазоне от 3,8 до 4,5, и предпочтительно, от 3,9 до 4,1, для получения раствора после инкубации. Слабокислые условия можно получать посредством добавления пригодной кислоты в композицию иммуноглобулинов. Например, pH можно доводить до желательного значения посредством добавления 0,2 М HCl. Эту стадию инкубации предпочтительно проводят при температуре в диапазоне от 35 до 40°C. Время инкубации предпочтительно составляет по меньшей мере 2 часа, и не дольше, чем 24 часов, и более предпочтительно, по меньшей мере 9 часов, но не дольше, чем 16 часов.

После обработки карбоновой кислотой и, необязательно, адсорбентом, истощенная по примесям композиция иммуноглобулинов как правило, имеет содержание IgG в диапазоне от приблизительно 85 до 94% по массе, содержание IgA в диапазоне от приблизительно 3 до 9% по массе, и содержание IgM в диапазоне от приблизительно 3 до 9% по массе, на основании общего количества иммуноглобулинов в истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов.

На стадии (c), истощенную по примесям композицию иммуноглобулинов со стадии (b), предпочтительно, после обработки слабой кислотой, подвергают ионообменной хроматографии с использованием анионообменной смолы, расположенной в колонке. Анионообменную хроматографию проводят в условиях pH и проводимости, доведенных до связывания, в основном, IgM и IgA и, необязательно, IgG, с анионообменной смолой. Термин «в основном», в рамках изобретения, означает, что по меньшей мере 90% по массе, предпочтительно, по меньшей мере 95% по массе, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 98% по массе каждого индивидуального иммуноглобулина IgM, IgA и/или IgG является связанным со смолой, на основании количества каждого иммуноглобулина, подвергнутого анионообменной хроматографии. В

зависимости от того, доведены ли условия раствора при анионообменной хроматографии до связывания, в основном, IgG или нет, обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов можно получать в фракции проскока и/или после элюции IgG с анионообменной смолы в условиях pH и проводимости, в которых IgM и IgA остаются связанными с анионообменной смолой. После выделения IgG, композиции иммуноглобулинов, обогащенные IgM и/или IgA, можно, необязательно, получать посредством элюции IgM и/или IgA с анионообменной смолы. Вне зависимости от того, получают ли IgG в проскоке или после элюции, пропердин, однако, всегда обнаруживают вместе с IgG в обогащенной иммуноглобулином IgG фракции.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения, истощенную по примесям композицию иммуноглобулинов, полученную на стадии (b), приводят в контакт с анионообменной смолой в условиях pH и проводимости, где IgM и IgA являются в основном связанными с анионообменной смолой, и IgG получают в форме обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в фракции проскока. Как правило, условий проскока достигают посредством подвергания истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов анионообменной хроматографии в условиях раствора, pH которого доведен до диапазона от 6,7 до 7,5, предпочтительно, от 6,9 до 7,3, и наиболее предпочтительно, pH приблизительно 7,1, и проводимость которого доведена до диапазона от 4 до 7,5 мСм/см, и предпочтительно, от 5,5 до 7 мСм/см. Проводимость в растворах, используемых для хроматографии, как правило, доводят посредством доведения концентрации соли, например, с использованием NaCl. Если анионообменную хроматографию проводят при значениях pH менее, чем 6,7, и/или при значениях проводимости более, чем 7,5 мСм/см, содержание IgG в обогащенной IgG фракции проскока увеличивается, но проскок может иметь нежелательно высокое содержание IgA. Таким образом, в этих условиях, незначительные количества IgG могут оставаться связанными с анионообменной смолой, но основную часть IgG обнаруживают в проскоке. Анионообменную смолу, которая содержит связанные IgM, IgA и остаточные иммуноглобулины IgG, можно промывать буфером для промывки, таким как буфер Трис/HCl, и фракцию промывки можно объединять с содержащим IgG проскоком.

В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения, истощенную по примесям композицию иммуноглобулинов можно приводить в контакт с анионообменной смолой в условиях pH и проводимости раствора, в которых все иммуноглобулины, т.е., IgG, IgM и IgA, являются в основном связанными со смолой. Как правило, этих условий достигают при значениях pH, превышающих значения, используемые для связывания IgM и IgA, в частности, при значениях pH 8 или более, и при низких значениях проводимости, в частности, при проводимости 2 мСм/см или менее. Затем связанный IgG элюируют для получения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с использованием буферов для элюции в условиях, описанных выше для проточного режима, в которых незначительные количества IgG остаются связанными с анионообменной смолой.

После выделения IgG для получения обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов, композиции иммуноглобулинов, обогащенные по IgM и/или IgA, можно получать посредством элюции IgM и/или IgA, связанных с анионообменной смолой, со смолы вместе с остаточными IgG. Иммуноглобулины IgM и IgA можно элюировать независимо друг от друга или вместе. Предпочтительно, однако, IgM и IgA элюируют вместе и с остаточными IgG, связанными с анионообменной смолой, для получения композиции иммуноглобулинов, являющейся обогащенной IgM и IgA. После элюции IgM, IgA и остаточных IgG со смолы, содержание IgG в полученной фракции иммуноглобулинов является достаточно высоким, чтобы оказывать стабилизирующий эффект на молекулы IgM в обогащенной IgM и IgA композиции иммуноглобулинов. Как правило, композиции иммуноглобулинов, обогащенные по IgM и IgA, содержат IgM в диапазоне от 10 до 35% по массе, IgA в диапазоне от 10 до 35% по массе, и IgG в диапазоне от 40 до 75% по массе, на основании общего количества иммуноглобулинов в элюированной фракции. Предпочтительно, обогащенные IgM и IgA композиции иммуноглобулинов содержат IgM в диапазоне от 15 до 30% по массе, наиболее предпочтительно, по меньшей мере 18% по массе, IgA в диапазоне от 15 до 30% по массе, и IgG в диапазоне от 45 до 70% по массе, на основании общего количества иммуноглобулинов в элюированной фракции. В этих обогащенных IgM и IgA композициях иммуноглобулинов, IgG, как правило, имеет распределение подклассов

IgG, на молекулярной основе, которое является обогащенным по IgG-4 до более, чем 10%, предпочтительно, более, чем 12%, и наиболее предпочтительно, более, чем 15%, по отношению к общему содержанию IgG. Это приводит к более низкой зависимой от антител опосредованной клетками цитотоксичности (ADCC) при введении пациенту и, таким образом, улучшает качество конечных фармацевтических препаратов.

Как правило, элюцию IgM, IgA и остаточных IgG проводят в условиях, включающих проводимость буфера для элюции, доведенную для элюции всех связанных иммуноглобулиной в одной или нескольких подфракций, как правило, посредством увеличения концентрации соли, например, с использованием NaCl. Предпочтительно, элюцию проводят при проводимости, доведенной до по меньшей мере 20 мСм/см, более предпочтительно, по меньшей мере 25 мСм/см, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 28 мСм/см. Более низкие значения проводимости являются менее желательными, поскольку они могут приводить к неполной элюции IgM с анионообменной смолы и, как следствие, к получению композиции, имеющей уменьшенное содержание IgM. Верхний предел проводимости обычно не является критическим для элюции IgM, при условии, что он не приводит к нежелательной элюции связанных примесей. Таким образом, проводимость должна быть значительно низкой и предпочтительно, ниже 40 мСм/см, чтобы избежать элюции не относящихся к иммуноглобулинам примесей, тесно связанных со смолой, в элюат IgM/IgA/IgG. Как правило, элюцию проводят при pH, доведенном до диапазона от 6,5 до 7,5.

Обогащенные IgM и IgA препараты иммуноглобулинов, полученные выше, могут иметь степень загрязнения, на основании общего количества 50 г/л препарата иммуноглобулинов: тромбогенная активность (TGA) < 3 мед./мл; активатор прекалликреина < 10%, предпочтительно < 5% от нормы для плазмы человека; фактор XIa < 0,2 мед./мл; и церулоплазмин < 0,1 г/л. Загрязнения могут даже составлять так мало, как: тромбогенная активность (TGA) ≤ 1,5 мед./мл; активатор прекалликреина < 2,5% от нормы для плазмы человека; и церулоплазмин < 0,02 г/л.

Тип анионообменной смолы, использованной на стадии (с), не является конкретно ограниченным и включает любую общепринятую анионообменную смолу. Пригодные анионообменные смолы включают, например, макропористые анионообменные смолы и анионообменные смолы, имеющие структуры щупалец. Макропористые анионообменные смолы, в частности, не имеющие структуры щупалец, являются предпочтительными, поскольку они имеют более высокую устойчивость к давлению, и таким образом, позволяют более высокие скорости потока. Однако, анионообменные смолы, имеющие структуры щупалец, такие как доступные под торговым наименованием Fractogel®, также можно использовать.

Размер пор макропористых анионообменных смол должен быть достаточно большим для адсорбции молекул IgM и IgA из композиций иммуноглобулинов в порах. Макропористые анионообменные смолы, используемые в способе по изобретению, как правило, имеют номинальные размеры пор по меньшей мере 50 нм, например, в диапазоне от 50 до 400 нм. В частности, верхний размер пор не является критическим и ограничен только устойчивостью к давлению и/или площадью поверхности смолы. Размер пор макропористых анионообменных смол можно определять общепринятым способом посредством ртутной порометрии в соответствии, например, с Ph. Eur. 7.0, 2011, 2.9.32. Ионная функциональная группа анионообменных смол, которую можно использовать по изобретению не является критичной. Анионообменные смолы, которые можно использовать, как правило, могут содержать группы первичного, вторичного, третичного или четвертичного аммония, такие как триметиламиноэтил (ТМАЕ), или кватернизованный полиэтиленимин. Сильные анионообменные смолы являются предпочтительными. Макропористые анионообменные смолы, которые можно использовать в способе по изобретению, являются коммерчески доступными, например, под торговыми наименованиями POROS® 50 HQ (Applied Biosystems), Macro-Prep® HQ (Bio-Rad Laboratories, Inc.), Fractogel® EMD TMAE (Merck Millipore), Eshmuno® Q (Merck Millipore) и CIM® QA (Bio Separations). Анионообменные смолы, такие как POROS® 50 HQ, являются предпочтительными.

Как правило, количество иммуноглобулина, нанесенного на анионообменную смолу, лежит в диапазоне от 30 до 50 г/л смолы, предпочтительно, от 35 до 45 г/л смолы. Более низкие количества являются менее экономичными, в то время как более высокие количества (например, более чем 50 г/л смолы) могут приводить к увеличенному количеству IgA в проскоке.

Предпочтительно, ионообменную хроматографию с использованием макропористых анионообменных смол проводят при линейной скорости потока по меньшей мере 200 см/час, более предпочтительно, по меньшей мере 450 см/час, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 600 см/час. В этих условиях, значения толщины слоя колонки преимущественным образом составляют 20–30 см. Таким образом, использование макропористых анионообменных смол позволяет значительное сокращение времени переработки для больших промышленных партий, таких как партии из более чем 10 кг белка или даже более, чем 30 кг белка на партию. Сокращение периодов времени переработки посредством уменьшения количества циклов, в ином случае требует намного больших колонок и намного большего количества смолы для хроматографии, что делает способ технически более сложным и дорогим. Обнаружено, что растворы иммуноглобулинов можно стабильно перерабатывать в этих условиях высокой скорости потока и высокого давления, хотя высоко чувствительная молекула IgM имеет тенденцию являться нестабильной во множестве условий.

Обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов, полученные на стадии (с) в фракции проскока и/или после элюции с анионообменной смолой, как правило, имеют содержание IgG по меньшей мере 95% по массе, предпочтительно, по меньшей мере 98% по массе, и более предпочтительно, по меньшей мере 99%, 99,5%, 99,7% или даже 99,9% по массе, на основании общей массы иммуноглобулина в обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов. Эти композиции, однако, все еще имеют АСА, которая является слишком высокой для соответствия допустимому пределу в соответствии с Европейской фармакопеей. Как обсуждают выше, обнаружено, что высокая АСА обусловлена присутствием пропердина, который уже присутствует в высоких количествах в фракции Кона I/II/III и фракции Кистлера-Нитшманна

A+I и не удаляется ни на стадии очистки (b), ни посредством анионообменной хроматографии на стадии (c).

В настоящее время обнаружено, что нежелательно высокую АСА можно уменьшать на стадии (d) посредством подвергания обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов обработке с использованием катионообменного материала в условиях рН и проводимости раствора, где пропердин является связанным с катионообменным материалом, и выделения IgG из катионообменного материала в фракции проскока и/или посредством элюции IgG с катионообменного материала в условиях, в которых пропердин остается связанным с катионообменным материалом, чтобы таким образом получать обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов, имеющую уменьшенное содержание пропердина.

Обработку обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с использованием катионообменного материала можно проводить в периодическом режиме или в непрерывном режиме, где катионообменный материал может быть расположен в сосуде или колонке для хроматографии, или может находиться в форме катионного мембранного адсорбента.

Предпочтительно, обработку обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов на стадии (d) проводят посредством подвергания обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов катионообменной хроматографии в условиях, в которых пропердин является связанным с катионообменным материалом, и в основном предотвращено связывание IgG с указанным катионообменным материалом. Затем IgG выделяют из катионообменного материала в форме несвязанного иммуноглобулина в фракции проскока. По экономическим причинам, условия контакта обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с катионообменным материалом, как правило, регулируют для предотвращения связывания IgG с катионообменным материалом до степени более, чем 1% по массе, на основании общей массы IgG, содержащегося в обогащенной IgG композиции, подвергнутой катионообменной хроматографии. Как правило, катионообменную хроматографию проводят в условиях, доведенных, независимо, до рН в диапазоне от 5,0 до 6,0, предпочтительно, от 5,2 до 5,8, и наиболее предпочтительно, от 5,4 до 5,6, и проводимости в диапазоне

от 16 до 30 мСм/см, предпочтительно, от 20 до 28 мСм/см, и наиболее предпочтительно, от 22 до 26 мСм/см.

В соответствии со следующим вариантом осуществления изобретения, обработку обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов на стадии (d), проводят посредством приведения в контакт обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с катионным мембранным адсорбентом в условиях, в которых пропердин является связанным с катионным мембранным адсорбентом, и в основном предотвращено связывание IgG с указанным катионным мембранным адсорбентом. Затем IgG выделяют в форме несвязанного иммуноглобулина с катионного мембранного адсорбента в фракции протоскока. Условия контакта обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с катионным мембранным адсорбентом соответствуют условиям, использованным для катионообменной хроматографии.

Альтернативно, обработка обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов может включать подвергание обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов катионообменной хроматографии, или приведение в контакт с катионообменной мембраной, в условиях низкой проводимости, когда как пропердин, так и IgG, являются связанными с катионообменным материалом. Затем связанный IgG выделяют из катионообменного материала посредством элюции IgG со смолы в условиях, в которых пропердин остается связанным с катионообменным материалом. Как правило, IgG элюируют с катионообменного материала с использованием буфера для элюции, доведенного, независимо, до pH и проводимости, которые являются такими же, как использовали выше для предотвращения связывания IgG с катионообменной смолой, т.е., значения pH в диапазоне от 5,0 до 6,0, предпочтительно, от 5,2 до 5,8, и наиболее предпочтительно, от 5,4 до 5,6, и проводимости в диапазоне от 16 до 30 мСм/см, предпочтительно, от 20 до 28 мСм/см, и наиболее предпочтительно, от 22 до 26 мСм/см.

Катионообменный материал, используемый для катионообменной хроматографии или с катионными мембранными адсорбентами, не является конкретно ограниченным и включает любые общепринятые катионообменные смолы, пригодные для хроматографии IgG, такие как слабые и сильные катионообменные смолы, содержащие группы

карбоновой кислоты или группы сульфоновой кислоты, например, сульфопропильные группы, и имеющие размеры пор, позволяющие IgG диффундировать в поры. Пригодные катионообменные смолы являются коммерчески доступными, например, под торговым наименованием POROS® HS, такие как POROS® HS 50, Fractogel® EMD SO₃⁻, и Eshmuno® CPX. Катионообменный материал может быть расположен в сосуде или колонке для хроматографии. Катионные мембранные адсорбенты являются коммерчески доступными, например, под торговым наименованием Sartobind S.

Загрузка белка для катионообменного материала, как правило, составляет вплоть до 5 г белка/г катионообменного материала, и предпочтительно, лежит в диапазоне от 0,01 г до 5 г белка/г катионообменного материала, например, от 0,1 г до 5 г белка/г катионообменного материала. Скорость потока для катионообменной хроматографии обычно лежит в диапазоне от 200 до 800 см/час, и для катионных мембранных адсорбентов может составлять вплоть до 5000 см/час.

Обработку содержащих пропердин композиций IgG с использованием катионообменных материалов, как описано выше на стадии (d) способа по изобретению для обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов, полученных после анионообменной хроматографии, также можно использовать для уменьшения содержания пропердина в содержащих пропердин композициях IgG, в общем.

Таким образом, настоящее изобретение, кроме того, относится к способу уменьшения содержания пропердина в содержащей пропердин композиции IgG, где указанный способ включает подвергание указанной содержащей пропердин композиции IgG обработке с использованием катионообменного материала в условиях pH и проводимости, в которых пропердин связывается с указанным катионообменным материалом, для получения композиции IgG, имеющей уменьшенное содержание пропердина.

Содержащая пропердин композиция IgG, подвергнутая обработке с использованием катионообменного материала, может представлять собой обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов, которая, предпочтительно, имеет содержание IgG по меньшей мере 95% по массе,

предпочтительно, по меньшей мере 98% по массе, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере 99% по массе, на основании общей массы иммуноглобулинов в содержащей пропердин композиции IgG.

Препарат IgG, полученный после обработки с использованием катионообменного материала и выделения, является поликлональным и имеет содержание IgG, которое является по существу таким же, как после анионообменной хроматографии, но с уменьшенным содержанием пропердина. Как правило, содержание IgG в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов, полученных после обработки с использованием катионообменного материала, составляет по меньшей мере 95% по массе, предпочтительно, по меньшей мере 98% по массе, и более предпочтительно, по меньшей мере 99%, 99,5%, 99,7% или даже 99,9% по массе, на основании общей массы иммуноглобулинов в обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов. Предпочтительно, препарат IgG, на молекулярной основе, содержит по меньшей мере 1,0%, предпочтительно, по меньшей мере 1,4%, и более предпочтительно, по меньшей мере 2,0% IgG-4, на основании общего содержания IgG, что является значительно сходным с природным распределением. Распределением подклассов IgG можно определять в соответствии со способами, известными в данной области, например, с использованием нефелометрии в соответствии с Ph. Eur. 7.0, 2011; 2.7.1 (Siemens BN Prospec System).

Выделенный IgG, полученный, например, после катионообменной хроматографии или обработки с использованием катионного мембранного адсорбента, можно подвергать дальнейшей общепринятой переработке для инактивации вируса и концентрирования. Конкретно, выделенный IgG можно подвергать нанофильтрации для удаления потенциально присутствующего вируса с использованием нанофильтра, имеющего размер пор приблизительно 20 нм. Полученный раствор можно дополнительно концентрировать посредством ультрафильтрации и/или диафильтрации.

Подобным образом, обогащенные IgM и IgA композиции иммуноглобулинов, полученные после анионообменной хроматографии, необязательно, после дополнительного концентрирования, например, посредством ультрафильтрации, можно подвергать последующей обработке для инактивации вируса, для получения препарата с

инактивированным вирусом. Инаktivация вируса может включать нанофильтрацию и/или облучение УФ-С.

Облучение можно проводить способами, известными в данной области, и описанными, например, в WO 2011/131786 и WO 2011/131787. Конкретно, элюаты можно обрабатывать с использованием УФ-С света для получения облученного УФ-С раствора с использованием устройств, являющихся коммерчески доступными, такими как устройство UVivatec® (Bayer Technology Services). Является предпочтительным, чтобы инкубированный раствор обрабатывали при 254 ± 10 нм между 200 и 500 Дж/м², более конкретно, между 200 и 300 Дж/м², для дополнительной инаktivации вирусов, которые потенциально присутствуют. Возможна также обработка УФ-С в мягких условиях с использованием прозрачного фильтрата, полученного после обработки октановой кислотой. Более опалесцирующие или непрозрачные растворы, однако, могут требовать более длительных периодов времени инкубации с потенциальными повреждающими эффектами иммуноглобулинов. Как правило, облучение УФ-С проводят только после завершения анионообменной хроматографии.

Раствор иммуноглобулина, подвергаемый обработке, можно также фильтровать через нанофильтр для инаktivации вируса. Фильтры с размером пор 75 ± 5 нм – 35 ± 5 нм, или фильтры, имеющие номинальный размер пор 75–35 нм (например, Pall Ultipor DV50), можно использовать на различных стадиях способа (номинальный размер пор, например, 50 нм означает степень удержания $\geq 4 \log 10$ для вируса размером 50 нм или более). В предпочтительном варианте осуществления, раствор иммуноглобулина, полученный до облучения УФ-С, подвергают нанофильтрации, предпочтительно, через фильтр, имеющий размер пор 40–50 нм. Является предпочтительным, чтобы эту стадию проводили в стерильных условиях.

Предпочтительно способ по настоящему изобретению не включает одну или несколько из химической или ферментативной модификации иммуноглобулина в препарате или термической обработки иммуноглобулина (например, обработки иммуноглобулина при температуре 42°C или более в течение 10 минут или более). Более

конкретно, способ по настоящему изобретению не включает стадию контакта антител с β -пропиолактоном и/или пепсином.

Способ по настоящему изобретению позволяет параллельное получение обогащенных IgG и обогащенных IgM и/или IgA композиций иммуноглобулинов с высокой чистотой и с отличным выходом. Способ начинают с фракций плазмы, содержащих в основном все иммуноглобулины, присутствующие в нормальной плазме крови, и без необходимости отдельной преципитации богатых IgG фракций, таких как фракция Кона II.

Кроме того, способ по настоящему изобретению позволяет получение обогащенных IgG фармацевтических композиций иммуноглобулинов, имеющих низкое содержание АСА, даже из плазмы крови, пулированной от 500 доноров или более. Плазма крови, пулированная от сотен доноров, характеризуется высоким разнообразием антител, и обычно можно ожидать, что она имеет высокое содержание АСА. Однако, обогащенная IgG композиция иммуноглобулинов, которую можно получать способом по изобретению, и которая содержит IgG от более, чем 500 доноров, имеет необычайно низкое содержание пропердина и полимеров IgG и, кроме того, низкую остаточную тромбогенную активность (TGA), низкое содержание фактора XIa (FXIa) и фактора XI (FXI). Это приводит к АСА < 1 CH50/мг белка, как необходимо по Европейской фармакопее 8. Экспериментальные данные показывают, что обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов, полученные способом по изобретению, таким образом, имеют уникальную комбинацию свойств, не обнаруженных ни в одной из коммерческих фармацевтических композиций IgG, доступных на рынке в настоящее время.

Обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов, полученную после обработки с использованием катионообменного материала и инактивации вируса, можно напрямую составлять в фармацевтические композиции иммуноглобулинов и/или заполнять ими контейнер в стерильных условиях, например, флакон или ампулу. Настоящее изобретение, таким образом, кроме того, относится к обогащенной IgG фармацевтической композиции иммуноглобулинов, полученной из

плазмы крови от 500 доноров или более, где указанная композиция имеет:

- (i) содержание IgG по меньшей мере 45 г/л композиции;
- (ii) содержание IgG по меньшей мере 95% по массе, на основании общей массы иммуноглобулинов в композиции;
- (iii) содержание пропердина не более, чем 0,01 мкг/мг общих иммуноглобулинов в композиции, и
- (iv) содержание полимеров IgG не более, чем 0,05%, на основании общего количества IgG в композиции.

Обогащенные IgG фармацевтические композиции иммуноглобулинов являются поликлональными, и их считают композициями иммуноглобулинов, фармацевтически приемлемыми для субъекта-человека и пригодными для внутривенного или внутримышечного введения посредством инъекции.

Предпочтительно, обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по изобретению имеет содержание IgG в диапазоне от 45 до 225 г/л (от приблизительно 5% до приблизительно 20%), например, в диапазоне от 45 до 55 г/л для приблизительно 5% композиции IgG, в диапазоне от 95 до 105 г/л для приблизительно 10% композиции IgG, или в диапазоне от 160 до 210 г/л для композиции IgG для подкожного введения.

Предпочтительно, обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по изобретению имеет содержание IgG по меньшей мере 98% по массе, более предпочтительно, по меньшей мере 99% по массе, и более предпочтительно, по меньшей мере 99%, 99,5%, 99,7% или даже 99,9% по массе, на основании общей массы иммуноглобулинов в обогащенной IgG фармацевтической композиции иммуноглобулинов.

Предпочтительно, препарат IgG, на молекулярной основе, содержит по меньшей мере 1,0%, предпочтительно, по меньшей мере 1,4%, и более предпочтительно, по меньшей мере 2,0% IgG-4, на основании общего содержания IgG.

Предпочтительно, обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по изобретению имеет содержание пропердина не более, чем 0,005 мкг/мг иммуноглобулина в композиции.

Предпочтительно, обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по изобретению имеет содержание полимеров IgG не

более, чем 0,01%, на основании общего количества IgG в композиции. Полимеры IgG определяют как агрегаты молекул IgG более высокого порядка, не представляющие собой момеры IgG, димеры IgG или фрагменты IgG. Общее количество IgG в композиции представляет собой сумму мономеров, димеров, полимеров IgG и любых их фрагментов. Долю мономеров, димеров, полимеров IgG и их фрагментов определяют посредством HPSEC как площадь пика в процентах от общей площади хроматограммы, в соответствии с Европейской фармакопеей 8,0 (2.2.30 – Распределение размеров молекул из «Нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения»).

Как правило, содержание полимеров IgG в обогащенной IgG фармацевтической композиции иммуноглобулинов не изменяется после длительного хранения при температуре 5°C, и предпочтительно, составляет не более, чем 0,05%, более предпочтительно, не более, чем 0,01%, после хранения в течение периода 15 месяцев, предпочтительно, 21 месяца.

Как правило, содержание полимеров IgG в обогащенной IgG фармацевтической композиции иммуноглобулинов после длительного хранения при температуре 25°C в течение периода 15 месяцев, предпочтительно в течение периода 21 месяца, составляет не более, чем 1,0%, предпочтительно не более, чем 0,75%, как определено посредством HPSEC, как описано выше.

Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по изобретению может содержать стабилизаторы, такие как глицин и пролин, но предпочтительно, является свободной от углеводов, таких как сахара и сахарные спирты, например, сорбит, маннит, глюкоза и трегалоза. Предпочтительно, композицию составляют с использованием стабилизатора, такого как глицин или пролин, и в частности, композицию можно составлять в содержащем глицин или пролин буфере при pH в диапазоне от 4 до 5,5, предпочтительно, от 4,2 до 4,8, и наиболее предпочтительно, при pH приблизительно 4,6.

Предпочтительно, обогащенная IgG фармацевтическая композиция содержит менее, чем 2,0 мед./мл фактора XIa.

Предпочтительно, обогащенная IgG фармацевтическая композиция содержит менее, чем 1% от нормы (стандартная плазма человека; Siemens Healthcare) фактора XI.

Предпочтительно, тромбогенная активность в обогащенной IgG фармацевтической композиции составляет менее, чем 1,5 мед./мл.

Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по изобретению, предпочтительно, не является пастеризованной.

Обогащенные IgG и IgM/IgA композиции иммуноглобулинов, которые можно получать способом по изобретению, имеют низкое содержание АСА и могут быть использованы в качестве композиций иммуноглобулинов для внутривенного введения, соответствующих требованиям Европейской фармакопеи. В частности, композиции иммуноглобулинов имеют то преимущество, что: (i) являются химически немодифицированными; (ii) имеют низкую протеолитическую активность; (iii) имеют низкую антикомплементарную активность; и (iv) содержит высокие уровни нативного и биологически активного IgG, IgM и/или IgA.

Примеры

Определение содержания иммуноглобулина

Содержание иммуноглобулина определяли посредством капиллярного зонного электрофореза (CZE), в соответствии с Европейской фармакопеей 8.0 (2.2.47 – Капиллярный электрофорез). Фракции иммуноглобулинов разделяли при pH 10 в капиллярах, в соответствии с их соотношением заряд:масса, на основании времени их прохода, характеризовали и количественно оценивали фотометрически при 200 нм. Систему для капиллярного электрофореза с УФ детектором (система для капиллярного электрофореза P/ACE MDQ, Beckman Coulter), использовали для этого способа. Образцы разводили буфером для электрофореза до концентрации белка 2,5 г/л (боратный буфер, pH 10; 14,3 г декагидрата тетрабората динатрия, растворенные в 1000 мл высокоочищенной воды и доводили с использованием 1 М NaOH). Смесь использовали для электрофореза без какой-либо дополнительной очистки. Способ электрофореза осуществляли в соответствии с инструкциями производителя устройства.

Определение распределения размеров молекул

Распределение размеров молекул иммуноглобулинов IgG определяли посредством эксклюзионной хроматографии высокого давления (HPSEC) как площадь пика в процентах от общей площади хроматограммы, в соответствии с Европейской фармакопеей 8,0 (2.2.30 – Распределение размеров молекул из «Нормальный иммуноглобулин человека для внутривенного введения»). При прохождении смесей белка через гидрофильные пористые гели, молекулы появляются в различных зонах распределения, в зависимости от распределения размеров молекул и размеров пор. Наиболее крупные белки/частицы мигрируют через гель наиболее быстро, в то время как малые молекулы белка и низкомолекулярные вещества мигрируют наиболее медленно.

Tosoh TSK-G 3000 SW использовали для разделения, и инъецировали белок массой 100 мкг. Разделенные фракции детектировали и оценивали количественно на выходе из колонки посредством фотометрии при 280 нм. Хроматографию проводили в соответствии с инструкциями по эксплуатации от производителя оборудования. Стандарт для гель-фильтрации Bio-Rad использовали в качестве контроля. Препарат иммуноглобулина использовали в качестве SST-образца. Пики приписывают фракциям полимера, димера, мономера и их фрагментов, с использованием автоматизированного способа интеграции пиков.

Определение концентрации пропердина

Готовый к использованию набор для твердофазного ELISA пропердина человека (Hycult Biotech) использовали для количественного определения *in vitro* пропердина человека в препаратах IgG в соответствии с инструкциями производителя. Кратко, образцы и стандарты инкубируют в лунках планшета для микротитрования, покрытых антителами, узнающими пропердин человека. Биотинилированное индикаторное антитело связывается со связанным пропердином человека. Конъюгат стрептавидин-пероксидаза связывается с биотинилированным индикаторным антителом. Конъюгат стрептавидин-пероксидаза вступает в реакцию с субстратом, тетраметилбензидином (ТМВ). Ферментную реакцию останавливают посредством добавления щавелевой кислоты. Поглощение при 450 нм измеряют с использованием спектрофотометра. Стандартную кривую

получают посредством нанесения на график поглощения (линейного) против соответствующих концентраций стандартов пропердина человека (log). Концентрацию пропердина человека в образцах, анализируемых параллельно с стандартами, определяют по стандартной кривой.

Определение антикомплементарной активности (АСА)

Тесты АСА иммуноглобулина проводили, как описано в Европейской фармакопее 8.0 (2.6.17 – Тест антикомплементарной активности иммуноглобулина).

Кратко, определенное количество тестируемого материала (10 мг иммуноглобулина) инкубируют с определенным количеством комплемента морской свинки (20 CH_{50}). Оставшийся комплемент титруют и инкубируют с эритроцитами овцы, сенсibilизированными гемолизином. Оптимально сенсibilизированные эритроциты овцы состоят из эритроцитов овцы, нагруженных антителами против эритроцитов овцы (гемолизином). Степень лизиса клеток определяют посредством фотометрии при 541 нм. АСА выражают как процент расхода комплемента относительно контрольного комплемента, рассматриваемого как 100 процентов. Гемолитическую единицу активности комплемента (CH_{50}) определяют как количество комплемента, которое, в данных условиях реакции, вызывает лизис половины сенсibilизированных эритроцитов овцы в тесте. Допустимый предел АСА в Европейской фармакопее определяют как такой, при котором расход комплемента не превышает 50 процентов, и 1 CH_{50} на миллиграмм иммуноглобулина.

Тромбогенная активность (TGA)

Флуорогенный анализ на микропланшетах (Technoclone) использовали для определения тромбогенной активности (TGA). Использовали технотромбин® TGA RC High в качестве реагента, технотромбин® TGA SUB – в качестве флуорогенного субстрата, и плазму с недостаточностью фактора XI. Калибровку выполняли с использованием международного стандарта для FXIa, 13/100 (NIBSC).

Фактор XI (FXI)

Коммерчески доступный стандартный анализ свертывания крови (Siemens Healthcare Diagnostics) использовали для определения количества фактора XI (FXI). Истощенную по FXI плазму, актин FSL в качестве активатора и раствор CaCl_2 использовали в этом анализе.

Калибровку выполняли с использованием стандартной плазмы человека (Siemens Healthcare). Дополнительные точки калибровки в более низком диапазоне калибровки включали для улучшения чувствительности анализа.

Фактор XIa (FXIa)

Коммерчески доступный хромогенный анализ (Hyphen Biomed) использовали для определения количества фактора XIa с использованием стандартных условий тестового набора.

Пример 1

Пример 1a

Получение обогащенной IgM композиции иммуноглобулинов

Плазму крови человека для фракционирования (2000 л) от более чем 500 доноров, использовали в качестве исходного материала. Плазму переносили в участок пулирования и пулировали.

Стадию криопреципитации проводили для отделения факторов свертывания крови, таких как фактор VIII, фактор фон Виллебранда и фибриноген. Для получения криопреципитата, температуру плазмы доводили, при осторожном перемешивании, таким образом, чтобы поддерживать температурный диапазон при $2\pm 2^{\circ}\text{C}$. В этих условиях криопреципитат остается нерастворенным в размороженной плазме. Криопреципитат отделяли от плазмы посредством центрифуги непрерывного действия, такой как сепаратор Westfalia.

Из супернатанта со стадии криопреципитации фракцию Кона I/II/III преципитировали посредством преципитации этанолом следующим образом:

Температуру супернатанта от центрифугирования, оставшегося после отделения криопреципитата, доводили до $2\pm 2^{\circ}\text{C}$. Значение pH раствора белка доводили до pH 5,9. Затем температуру понижали до -5°C , и добавляли этанол до конечной концентрации 20% объема. При постоянном медленном перемешивании в сосуде из нержавеющей стали, фракцию Кона I/II/III преципитировали. Преципитат фракции Кона I/II/III отделяли от супернатанта посредством фильтрации с использованием листов глубинного фильтра при добавлении вспомогательного фильтрующего материала, такого как перлит или диатомитовая земля, с использованием фильтр-пресса. Фракцию Кона

I/II/III выделяли с листов фильтра. Этот преципитат фракции Кона I/II/III содержал все иммуноглобулины (IgG, IgA, IgM) в приблизительно следующих процентах: 75% IgG, 13% IgM и 12% IgA.

90 кг полученного преципитата фракции Кона I/II/III ресуспендировали в 450 кг буфера 0,1 М ацетата натрия, pH 4,8, и перемешивали в течение 60 минут при 22°C. pH суспензии доводили до 4,8 уксусной кислотой.

Затем проводили обработку октановой кислотой. Раствор обрабатывали посредством добавления 7,7 кг октановой кислоты при комнатной температуре. Октановую кислоту добавляли медленно, и раствор белка дополнительно перемешивали в течение 60 минут, с использованием встряхивающей мешалки (Vibromixer®, размер 4, Graber+Pfenniger GmbH, Vibromixer, доведенной до уровня 2-3).

Обработку фосфатом кальция проводили для завершения реакции октановой кислоты следующим образом:

Добавляли приблизительно 1,1 кг $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, и раствор белка дополнительно перемешивали в течение более, чем 15 минут, и фильтровали через листы глубинных фильтров. Фильтрат подвергали дальнейшей переработке. Полученный раствор белка подвергали ультрафильтрации до концентрации белка приблизительно 50 г/л. Раствор белка подвергали диафильтрации против буфера 0,02 М ацетата натрия, pH 4,5, и затем доводили концентрацию белка до приблизительно 40 г/л.

Раствор белка обрабатывали при pH 4,0 для инактивации вирусов, следующим образом: pH доводили до pH 4,0 с использованием 0,2 М HCl, и полученный раствор инкубировали в течение 8 часов при 37°C. Полученный раствор белка содержит иммуноглобулины со следующим распределением: 90% IgG, 5% IgA и 5% IgM.

Полученный раствор белка подвергали дальнейшей переработке посредством анионообменной хроматографии с использованием макропористой анионообменной смолы для удаления сопутствующих белков и для получения обогащенных IgG и IgM композиций иммуноглобулинов.

На килограмм промежуточного раствора белка, добавляли 0,00121 кг трис (гидроксиметил) аминометана (Трис) и растворяли при

перемешивании, и проводимость доводили до 6 мСм/см с использованием твердого NaCl. Раствор белка доводили до pH 7,1 посредством добавления 1 М NaOH. Макропористую анионообменную смолу (анионообменная смола POROS® 50 HQ, Life Technologies, толщина слоя колонки: 25 см) уравнивали с использованием раствора буфера 10 мМ Трис (pH 7,1, 50 мМ NaCl, при линейной скорости потока 800 см/час). Раствор белка наносили на анионообменную смолу при 40 г белка на литр смолы. Колонку промывали буфером для уравнивания (10 мМ Трис, 50 мМ NaCl, pH 7,1, при 800 см/час).

Обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов получали в фракции проскока и подвергали дальнейшей переработке, как описано в примере 3 ниже.

Обогащенную IgM фракцию элюировали посредством увеличения проводимости следующим образом: раствор буфера 10 мМ Трис с 300 мМ NaCl при pH 7,1 использовали при 800 см/час для элюции обогащенной IgM фракции. Элюированная фракция содержала 58% IgG, 22% IgA и 20% IgM.

Раствор белка фильтровали через фильтр Pall, Ultipor VF DV50, в качестве стадии удаления вирусов. Фильтрат подвергали дальнейшей переработке посредством обработки УФ-С светом при 254 нм, с использованием устройства для проточной обработки UVivatech (Bayer Technology Services/Sartorius) при дозе УФ-С 225 Дж/м² для дополнительной инактивации вирусов. Скорость потока при прохождении через УФ-С реактор рассчитывали с использованием инструкций производителя. Облученный раствор белка концентрировали до концентрации белка 50 г/л посредством ультрафильтрации (и подвергали диафильтрации (с использованием буфера 0,3 М глицина pH 4,5). Конечный продукт фильтровали через фильтр 0,2 мкм и хранили при 2-8°C.

Полученная композиция иммуноглобулинов имела содержание IgM 22% по массе, содержание IgA 22% по массе, и содержание IgG 56% по массе, на основании общего содержания иммуноглобулинов, при концентрации иммуноглобулинов 50 мг/мл. АСА составляла 0,34 CH50/мг.

Пример 1b**Переработка более крупных количеств**

Для переработки более крупных количеств белка, проводили множество циклов очистки на макропористой анионообменной смоле. Для этой цели, стадии очистки включали в цикл хроматографии. Конкретно, после элюции обогащенной IgM фракции из полученного содержащего IgG, IgA и IgM промежуточного раствора белка, как описано в примере 1a, колонку отмывали с использованием раствора 1 М NaCl для элюции остаточных связанных белков. Затем колонку регенерировали с использованием 3 объемов колонки 1 М NaOH, и начинали следующий цикл с фазы уравнивания с использованием буфера для уравнивания. Всего проводили 12 циклов очистки при линейной скорости потока 800 см/час без какой-либо потери производительности очистки.

Пример 2**Получение обогащенной IgM композиции иммуноглобулинов с использованием смолы со структурами щупалец**

Первоначальную переработку, включая стадию обработки при pH 4, проводили, как описано в примере 1a.

Полученный раствор белка подвергали дальнейшей переработке посредством анионообменной хроматографии с использованием анионообменной смолы со структурами щупалец для удаления сопутствующих белков и для получения раствора, содержащего увеличенный процент IgM по сравнению с другими иммуноглобулинами, следующим образом:

Промежуточный продукт (концентрация белка: 41 г/л) доводили с использованием буфера Трис (конечная концентрация: 10 мМ) до pH 7,1. Проводимость раствора белка доводили до 6 мСм/см (при 20°C) с использованием NaCl.

Колонку для хроматографии (Fractogel® TMAE, толщина слоя: 39,5 см, объем колонки: 80 мл) уравнивали с использованием буфера 10 мМ Трис pH 7,1/50 мМ NaCl при линейной скорости потока 150 см/час, и раствор белка закачивали насосом в колонку для хроматографии, пока не достигали загрузки 40 мг на мл смолы. Нагруженную колонку промывали с использованием 10 мМ буфера Трис

pH 7,1/50 mM NaCl, и собирали фракцию проскока. Линейную скорость потока 150 см/час поддерживали в ходе эксперимента. Хроматографию мониторируют с использованием УФ-сенсора. Связанную фракцию элюировали посредством 10 mM Трис pH 7,0/300 mM NaCl. Элюированную фракцию собирали и могли подвергать дальнейшей переработке, как описано в примере 1a.

Выход обогащенной IgG фракции проскока составлял 84%. В обогащенной фракции IgG, содержание IgA было ниже предела детекции ($< 0,0116$ г/л, Siemens BN Prospec) при концентрации белка 9,81 г/л (определено посредством биуретового анализа). Содержание IgM было ниже предела детекции ($< 0,00846$ г/л). Содержание подкласса IgG-4 составляло 2,31%.

Полученная обогащенная IgM композиция иммуноглобулинов имела содержание IgM 28% по массе, содержание IgA 19% по массе и содержание IgG 53% по массе на основании общего содержания иммуноглобулинов, при концентрации иммуноглобулинов 50 мг/мл.

Пример 3

Получение обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в проточном режиме

(Катионообменная хроматография)

Обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов, собранную как фракцию проскока при хроматографии на макропористой анионообменной смоле (POROS® 50 HQ) в примере 1a, доводят до pH 5,5 и до проводимости 22–26 мСм/см с использованием буфера ацетата натрия и NaCl, и затем подвергают дополнительной очистке посредством катионообменной хроматографии в проточном режиме на катионообменной смоле (POROS® 50 HS). связывающая емкость этой смолы определяют как 100–3000 г/л, и хроматографию проводят при загрузке 3000 г/л и скорости потока 800 см/час.

Катионообменную колонку уравнивают с использованием раствора ацетатного буфера (pH 5,5, доведенного до 22, 24 и 26 мСм/см с использованием NaCl). Раствор белка наносят на колонку и промывают ацетатным буфером (pH 5,5, доведенным до 22–26 мСм/см с использованием NaCl). Фракцию проскока и промывки собирают и

подвергают дальнейшей переработке. Оставшийся белок элюируют с использованием 1,5 М NaCl.

Полученный раствор белка подвергали дальнейшей переработке посредством стадии нанофильтрации, для удаления потенциально присутствующего вируса. Фильтр Planova BioEx 20 нм (Asahi Kasei) использовали в качестве фильтра против вирусов. Более, чем 50 кг раствора белка фильтровали через площадь фильтра 0,1 м² при концентрации белка 10 г/л. Максимальное давление устанавливали в соответствии с инструкциями производителя. Скорость потока в ходе нанофильтрации являлась следующей:

Материал после хроматографии на POROS 50 HS	Средняя скорость потока в ходе нанофильтрации [кг/(м ² *час)]
22 мСм/см и pH 5,5	48,4
24 мСм/см и pH 5,5	53,0
26 мСм/см и pH 5,5	53,9

Полученный раствор белка подвергали стадии концентрирования до > 100 г/л посредством ультрафильтрации и подвергали диафильтрации с использованием буфера для получения состава (0,3 М глицин pH 5,0). Полученный раствор белка фильтровали через 0,2 мкм фильтр для контроля стерильности.

Полученные композиции иммуноглобулинов анализировали по содержанию иммуноглобулинов, распределению подклассов и АСА, и результаты показаны в таблице 1.

Таблица 1

Аналитические параметры для лекарственных субстанций, полученных в лабораторном масштабе

Параметры	POROS® 50 HS при 22 мСм/см	POROS® 50 HS при 24 мСм/см	POROS® 50 HS при 26 мСм/см
IgG [%]	99,6	99,7	99,6
IgA [%]	0,26	0,21	0,24
IgM [%]	0,15	0,11	0,13
IgG ₁ [%]	62,68	63,52	63,47
IgG ₂ [%]	32,96	31,84	32,19
IgG ₃ [%]	2,58	2,40	2,53
IgG ₄ [%]	1,79	2,25	1,80
АСА [CH50/мг]	0,56	0,60	0,58

Для лекарственных субстанций, полученных после хроматографии на POROS® 50 HS, показаны уровни АСА в желательном диапазоне. Соотношение IgG, IgA и IgM, и распределение подклассов не

изменялось при дополнительной хроматографии на POROS® 50 HS. Последующая нанофильтрация оказывала незначительное влияние.

Пример 4

Исследование содержания пропердина в препаратах IgG с использованием и без использования катионообменной хроматографии

Для исследования эффекта стадии катионообменной хроматографии на уровне пропердина в препаратах IgG, четыре партии фракции Кона I/II/III, полученные из пулированной сыворотки крови, ресуспендировали в буфере 0,1 М ацетате натрия (pH 4,8) в промышленном масштабе (использовали 100 кг фракции I/II/III) и подвергали обработке октановой кислотой, трифосфатом кальция, ультра-диафильтрации, обработке слабой кислотой и анионообменной хроматографии, как описано в примере 1а. Проскок (фракции IgG) из партий 1 и 2 собирали и немедленно подвергали ультра-/диафильтрации против буфера 0,3 М глицина, pH 4,6. Проскок из партий 3 и 4 дополнительно подвергали катионообменной хроматографии (СЕХ), как описано в примере 3, и проскок подвергали ультра-/диафильтрации, как выше. Все полученные таким образом растворы IgG анализировали по содержанию иммуноглобулинов и пропердина с использованием набора для твердофазного ELISA пропердина человека (Nycult Biotech), как описано ранее. Результаты показаны в таблице 2.

Таблица 2

Образец	Конц. иммуноглобулина [г/л]	Конц. пропердина [мкг/мл]	Содержание пропердина на мг иммуноглобулина [мкг/мг]
Партия 1 (без СЕХ)	126	229	1,82
Партия 2 (без СЕХ)	116	198	1,71
Партия 3 (с СЕХ)	113	0,23	0,0020
Партия 4 (с СЕХ)	126	0,14	0,0011

Как показано в таблице 2, катионообменная хроматография приводила к необычайному уменьшению содержания пропердина.

Пример 5

Определение содержания пропердина и содержания полимера IgG в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов

Препараты IgG по изобретению, как описано в примере 4 (партии 3 и 4), дополнительно тестировали по содержанию полимера IgG

посредством HPSEC, как описано ранее. Содержание пропердина и полимеров IgG в коммерчески доступных фармацевтических композициях IgG (CP-IgG 1-5) определяли такими же способами для сравнения. Результаты показаны в таблице 3.

Таблица 3

Образец	Иммуноглобулин концентрация [г/л]	Пропердин [мкг/мл]	Пропердин [мкг/мг иммуноглобулина]	Содержание полимера IgG [%]
Партия 3	113	0,23	0,0020	0,0
Партия 4	126	0,14	0,0011	0,0
CP-IgG 1	100	1,16	0,0116	0,0
CP-IgG 2	100	5,11	0,0511	0,1
CP-IgG 3	100	13,50	0,1350	0,6
CP-IgG 4	100	4,00	0,0400	0,1
CP-IgG 5 (пастеризованный)	100	0,04	0,0004	0,2

Как можно видеть из таблицы 3, обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов, полученные способом по изобретению, имеют содержание пропердина, которое ниже, чем в коммерчески доступных фармацевтических продуктах, за исключением CP-IgG 5, который является пастеризованным продуктом. Подобным образом, содержание полимеров IgG в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов по изобретению, было ниже, чем во всех фармацевтических композициях IgG, за исключением CP IgG 1.

Пример 6

Определение тромбогенной активности (TGA), фактора XIa и фактора XI (FXI) в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов

Обогащенные IgG композиции иммуноглобулинов (3 партии), полученные, как описано в примере 4, после катионообменной хроматографии, тестировали по TGA, FXIa и FX, как описано ранее с использованием коммерчески доступных анализов (партии 5-7). Результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4

Образец	Концентрация белка [г/л]	TGA [мед./мл]	FXIa [мед./мл]	FXI [% от нормы]	Чистота фракции Ig по CZE [%]
---------	--------------------------	---------------	----------------	------------------	-------------------------------

Партия 5	100	< 1,5	< 2,0	< 1	100
Партия 6	99	< 1,5	< 2,0	< 1	100
Партия 7	99	< 1,5	< 2,0	< 1	100

Результаты показывают отсутствие остаточных TGA, FXIa и FXI (ниже предела детекции используемого способа).

Пример 7

Длительная стабильность обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов

Обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов, полученную, как описано в примере 4, после катионообменной хроматографии (118 г иммуноглобулина/л), тестировали по длительной стабильности при 5°C и 25°C, соответственно, в течение периода 90 недель, с использованием HPSEC, как описано выше. Результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5

Длительная стабильность обогащенных IgG композиций иммуноглобулинов

Недели	Полимер (%) после хранения при 5°C	Полимер (%) после хранения при 25°C
0	0,0	0,0
1	0,0	0,0
4	0,0	0,0
8	0,0	0,0
24	0,0	0,0
65	0,0	0,5
90	0,0	0,6

Как можно видеть из результатов, никакие полимеры IgG не поддавались детекции после хранения при 5°C в течение периода 90 недель. После хранения при 25°C содержание полимера IgG остается ниже 1,0% по истечении периода 90 недель.

Пример 8

Получение обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в режиме связывания

(Катионообменная хроматография)

Фракцию IgG, полученную, как описано в примере 1a, в качестве проскока после анионообменной хроматографии на POROS® 50 HQ, подвергали ультра-/диафильтрации до 20 мМ ацетата натрия, pH 5,5, так чтобы получить материал для катионообменной хроматографии с использованием POROS® 50 HS в режиме связывания.

Полученный материал успешно связывался с POROS® 50 HS, и фракцию IgG элюировали буфером (20 мМ ацетат натрия, 225 мМ хлорид натрия, pH 5,5±0,1, проводимость 24±2 мСм/см). Полученная обогащенная IgG композиция иммуноглобулинов имела значение АСА 0,58 CH50/мг белка.

Пример 9

Кривые проскока АСА при различной проводимости (Катионообменная хроматография)

Фракции IgG, полученные, как описано в примере 1a, в качестве проскока после анионообменной хроматографии с использованием POROS® 50 HQ, подвергали ультра-/диафильтрации до 10 мМ Трис, 6,5 мМ ацетата натрия и доводили до pH 5,5 и проводимости 22, 24 и 26 мСм/см с использованием NaCl. Кривые проскока АСА получали с использованием колонки POROS® 50 HS с объемом колонки 0,8 мл. Раствор белка прокачивали насосом через колонку POROS® 50 HS при скорости потока 800 см/час для удаления АСА.

В таблице 6 показаны результаты, полученные для проскока АСА при намеченных значениях проводимости. Во всех случаях АСА эффективно удаляют вплоть до загрузки по меньшей мере 3 г белка/мл геля. Уровни АСА снова увеличиваются при более высоких загрузках. Чем выше проводимость, тем быстрее увеличиваются уровни АСА.

Таблица 6

Проскок АСА при 22, 24 и 26 мСм/см

Загрузка [г белка/л геля]	Концентрация белка [г/л]	АСА [CH50/мг]
22 мСм/см		
Загрузка материала	69,25	1,18
3000	55,35	0,66
4000	62,64	0,74
5000	63,10	0,78
6000	59,69	0,78

7000	61,70	0,88
8000	62,03	0,90
24 мСм/см		
Загрузка материала	70,65	1,06
3000	54,95	0,66
4000	61,16	0,90
5000	60,11	0,88
6000	58,90	0,90
7000	59,56	1,02
8000	60,56	0,98
26 мСм/см		
Загрузка материала	65,50	1,20
3000	56,42	0,78
4000	62,57	0,92
5000	59,42	0,98
6000	59,03	1,02
7000	60,36	1,04
8000	57,82	1,06

Пример 10**Варианты проводимости (катионообменная хроматография)**

Фракции IgG, полученные, как в примере 1а, в качестве проскока после анионообменной хроматографии на POROS® 50 HQ, доводили до pH 5,5 и проводимости в диапазоне от 16 до 30 мСм/см с использованием буфера 20 мМ ацетата Na и NaCl. Подготовленный таким образом материал наносили на колонку POROS® 50 HS (загрузка колонки 500 г/л), и собирали фракции, и определяли уровень АСА. Результаты показаны в таблице 7.

Таблица 7**Значения АСА для вариантов условий проводимости**

Условия проводимости [мСм/см]	АСА [CH50/мг белка]
До POROS® 50 HS	1,30
16	0,53
18	0,52
20	0,48
22	0,45
24	0,49
26	0,43
28	0,44
30	0,50

Уменьшение уровней АСА являлось возможным реализовать в широком диапазоне условий проводимости. Более низкая проводимость приводит к риску потери выхода IgG, и более высокая проводимость приводит к риску проскока АСА.

Пример 11**Варианты скорости потока (катионообменная хроматография)**

Фракции IgG, полученные, как описано в примере 1a, в качестве проскока после анионообменной хроматографии на POROS® 50 HQ, подвергали ультра-/диафильтрации до 10 mM Трис, 6,5 mM ацетата натрия, 225 mM хлорида натрия (pH 5,5; проводимость 22 мСм/см). Полученный таким образом материал наносили на колонку POROS® 50 HS при 200, 500 и 800 см/час (загрузка 1,2 г/мл POROS® 50 HS). Собирали фракции проскока, и определяли уровень АСА. Результаты показаны в таблице 8.

Таблица 8

Значения АСА для вариантов скорости потока в ходе хроматографии на POROS® 50 HS

Скорость потока [см/час]	АСА [CH50/мг]
До хроматографии на POROS® 50 HS	1,12
200	0,62
500	0,66
800	0,62

Как можно видеть из таблицы 8, скорости потока не оказывали значительного эффекта на АСА.

Пример 12**Мембранный адсорбент в качестве катионообменного материала**

Истощение АСА в обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, полученной, как описано в примере 1a, в качестве проскока после анионообменной хроматографии на POROS® 50 HQ, тестировали с использованием катионного мембранного адсорбента (Sartorius-Sartobind S) в режиме отсутствия связывания для IgG. Обогащенный раствор IgG доводили до pH 5,5 с использованием буфера ацетата натрия и до концентрации хлорида натрия 225 mM (соответствующей проводимости 24 мСм/см). В этих условиях IgG не связывается с катионообменным материалом. В модуль с мембранным адсорбентом загружали 0,5 г/мл смолы. Собирали фракцию проскока и фракцию после элюции с высокой концентрацией соли (1,5 M NaCl), и анализировали по АСА. Значение АСА для фракции проскока является низким (CH50/мг=0,44), в то время как связанная фракция является обогащенной по содержанию АСА (CH50/мг > 1,5).

Пример 13**Использование катионообменной смолы в периодическом режиме**

Обогащенную IgG композицию иммуноглобулинов, полученную, как описано в примере 1a, в качестве проскока после анионообменной хроматографии на POROS® 50 HQ, подвергали ультра-/диафильтрации до 10 mM Трис, 6,5 mM ацетата натрия, 225 mM хлорида натрия (pH 5,5; проводимость 21 мСм/см) и доводили до содержания белка 50 г/л. Материал для хроматографии POROS 50 HS добавляли в форме порошка, и суспензию осторожно встряхивали в течение 1 час при комнатной температуре. Следующие количества POROS 50 HS тестировали таким образом в периодическом режиме, и результаты показаны в таблице 9.

Таблица 9**Использование POROS® 50 HS в периодическом режиме**

Загрузка белка [мг POROS® 50 HS/г белка]	АСА [CH50/мг белка]
Исходный материал	1,12
100	0,98
250	0,70
500	0,52

АСА являлось возможным успешно удалять ниже 1 CH50/мг в условиях загрузки более, чем 250 мг POROS® 50 HS/г белка.

Пример 14**Эксперименты с добавлением пропердина**

Чтобы показать корреляцию между содержанием пропердина и АСА, 1 мг/мл раствора пропердина (полученного из Quidel), добавляли в два различных 10% иммуноглобулина IgG (препараты А и В IVIg), которые перерабатывали с использованием катионообменной хроматографии для конечной очистки, и измеряли АСА. Как показано в таблице 10, увеличение концентраций пропердина приводило к увеличению концентрации АСА в линейной зависимости, вплоть до концентрации добавленного пропердина 200 мкг/мл.

Таблица 10**АСА в растворе иммуноглобулина с добавленным пропердином**

	Препарат IgG А	Препарат IgG В
Добавление пропердина	АСА	

[мкг/мл]	[СН50/мг]	[СН50/мг]
0	0,42	0,42
25	0,52	0,60
50	0,58	0,70
100	0,82	0,92
150	0,94	1,10
200	1,08	1,16

Пример 15

Эффект буфера для ресольubilизации на содержание пропердина после обработки октановой кислотой.

Чтобы показать корреляцию между условиями ресольubilизации и содержанием пропердина после обработки октановой кислотой, фракцию Кона I/II/III ресуспендировали в деионизированной воде и трех различных буферах для ресольubilизации. Суспензии фракции I/II/III подвергали обработке октановой кислотой (рН 4,8, 17,5 г/кг октановой кислоты на кг суспензии) и трифосфатом кальция, как описано в примере 1а. Преципитат удаляли посредством глубинной фильтрации, и полученный раствор белка подвергали ультра-/диафильтрации и обработке слабой кислотой при рН 4. Полученную таким образом композицию иммуноглобулинов с истощенными примесями анализировали по содержанию пропердина. Результаты показаны в таблице 11.

Таблица 11

Образец	Условия	Проводимость (при 22°C) мСм/см	Конц. белка [г/л]	Концентрация пропердина [мкг/мл]	Содержание пропердина на мг белка [мкг/мг]
1	Деионизированная вода	0,09	46,8	5	0,107
2	Буфер 10 мМ ацетат натрия, рН 4,8	0,77	46,8	11	0,235
3	Буфер 50 мМ ацетат натрия, рН 4,8	2,6	42,5	36	0,847
4	Буфер 100 мМ ацетат натрия, рН 4,8	6,9	44,6	42	0,941

Как можно видеть из результатов, содержание пропердина в композициях иммуноглобулинов, полученных после обработки октановой кислотой, увеличивается при увеличении молярности буфер для ресольubilизации.

Пример 16

Эффект буфера для ресольюбилизации на содержание пропердина в обогащенных IgG композициях иммуноглобулинов, полученных после анионообменной хроматографии

Для исследования эффекта буфера для ресольюбилизации на содержание пропердина в препаратах IgG, полученных после анионообменной хроматографии, фракцию Кона I/II/III ресуспендировали либо в воде для инъекций (WFI), либо в 100 мМ буфере ацетате натрия (pH 4,8), в лабораторном масштабе, в соотношении фракции I/II/II к буферу 1:4. Обе суспензии обрабатывали октановой кислотой и трифосфатом кальция, с последующей ультра-диафильтрацией и обработкой слабой кислотой при pH 4, как описано в примере 13. Полученные композиции иммуноглобулинов подвергали анионообменной хроматографии на POROS 50 HQ, как описано в примере 1a, и полученную фракцию проскока (обогащенную фракцию IgG) подвергали ультра-/диафильтрации против буфера 0,3 М глицина, pH 4,6.

Полученные растворы IgG анализировали по содержанию белка и пропердина, и результаты показаны в таблице 12.

Таблица 12

Образец	Конц. иммуноглобулина	Конц. пропердина [мкг/мл]	Содержание пропердина на мг иммуноглобулина [мкг/мг]	АСА [CH50/мг]
фракция Кона I/II/III, ресуспендированная в WFI	97	0,27	0,003	0,77
фракция Кона I/II/III, ресуспендированная в буфере 100 мМ ацетате натрия, pH 4,8	128	214	1,67	1,18

Пример 17

Эффект WFI и ацетатного буфера на суспензии фракции Кона I/II/III

Фракцию I/II/III ресуспендировали в лабораторном масштабе, либо в WFI (образец А), либо в 100 мМ буфере ацетате натрия (pH 4,8; образец В) в соотношении по массе фракции I/II/II к буферу 1:4 (300 г фракции I/II/III плюс 1200 г буфера или WFI). Определяли концентрации IgG, IgA и IgM в суспензии, так же как распределение между классами иммуноглобулинов. Результаты показаны в таблице 13.

Таблица 13

Эффект буфера на ресольбулизацию иммуноглобулина из фракции
Кона I/II/III

Образец	IgG [г/л]	IgA [г/л]	IgM [г/л]	Сумма IgG, IgA, IgM [г/л]	IgG [%]	IgA [%]	IgM [%]
А	18,0	1,9	0,69	20,6	87,3	9,3	3,4
В	19,1	2,9	2,05	24,0	79,2	12,2	8,5

Концентрации IgG, IgA и IgM в образце, ресуспендированном в ацетатном буфере (образец В), увеличены по сравнению с образцом, ресуспендированным в WFI (образец А). Концентрация IgM увеличена от 0,69 г/л до 2,05 г/л; концентрация IgA увеличена от 1,9 г/л до 2,9 г/л в образцах суспензии.

Выходы для индивидуальных классов иммуноглобулинов рассчитывали на основании достигнутого объема суспензии (1500 мл) и по отношению к использованному количеству фракции I/II/III. Увеличение выхода 7% для IgG, 51% для IgA и 212% для IgM наблюдали для суспензии в ацетате. Результаты показаны в таблице 14.

Таблица 14

Эффект буфера на выходы иммуноглобулина в суспензии

Образец	IgG [г]	IgA [г]	IgM [г]	IgG на кг фракции I/II/III [г/кг]	IgA на кг фракции I/II/III [г/кг]	IgM на кг фракции I/II/III [г/кг]
А	27,0	2,9	1,0	90	9,7	3,3
В	28,7	4,4	3,1	96	14,7	10,3

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фармацевтически приемлемой композиции иммуноглобулинов из содержащей пропердин композиции IgG, где содержащая пропердин композиция IgG является представляет собой обогащенную IgG композицию иммуноглобулина, которую получают из полученной из плазмы фракции иммуноглобулина, содержащей или состоящей из фракции Кона I/II/III или фракции А+I Кистлера-Нитшмана с последующей анионообменной хроматографией, где указанный способ включает подвержение указанной содержащей пропердин фракции IgG обработке с использованием катионообменного материала в условиях рН и проводимости, в которых пропердин связывается с указанным катионообменным материалом, включающий приведение в контакт содержащей пропердин композиции IgG с указанным катионообменным материалом при рН в диапазоне от 5,0 до 6,0 и при проводимости в диапазоне от 16 до 30 мСм/см и выделение IgG для получения композиции IgG, имеющей уменьшенное содержание пропердина.

2. Способ по п.1, где обработку с использованием катионообменного материала проводят посредством подвергания содержащей пропердин композиции IgG катионообменной хроматографии в условиях, в которых пропердин связывается с указанным катионообменным материалом, и IgG выделяют в проточной фракции; или

где обработку обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов проводят посредством приведения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в контакт с катионным мембранным адсорбентом в условиях, в которых пропердин связывается с катионным мембранным адсорбентом, и IgG выделяют в проточной фракции.

3. Способ по п.1 или п.2 включающий стадии:

(а) ресольбулизации иммуноглобулина, содержащегося в полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, содержащей или состоящей из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшмана А+I, посредством ресуспендирования указанной полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов в условиях для доведения проводимости

суспензии по меньшей мере до 1 мСм/см, для получения суспензии, содержащей ресольбилизованные IgG, IgM и IgA;

(b) преципитации загрязняющего белка в суспензии, полученной на стадии (a), и удаления указанного загрязняющего белка для получения истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов;

(c) подвергания истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (b), ионообменной хроматографии с использованием анионообменной смолы в условиях pH и проводимости, доведенных до значительного связывания IgM и IgA со смолой, и получения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в фракции проскока и/или посредством элюирования IgG из анионообменной смолы в условиях, в которых IgM и IgA остаются связанными с анионообменной смолой; и

(d) подвергания обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (c), обработке с использованием катионообменного материала в условиях pH и проводимости, в которых пропердин связывается с указанным катионообменным материалом, включающей приведение в контакт обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с указанным катионообменным материалом при pH в диапазоне от 5,0 до 6,0 и при проводимости в диапазоне от 16 до 30 мСм/см и выделения IgG для получения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, имеющей уменьшенное содержание пропердина.

4. Способ по п.3, включающий стадии:

(a) ресольбализации иммуноглобулина, содержащегося в полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов, содержащей или состоящей из фракции Кона I/II/III или фракции Кистлера-Нитшманна A+I, посредством ресуспендирования указанной полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов в условиях для доведения проводимости суспензии по меньшей мере до 1 мСм/см, для получения суспензии, содержащей ресольбилизованные IgG, IgM и IgA;

(b) преципитации загрязняющего белка в суспензии, полученной на стадии (a), и удаления указанного загрязняющего белка для получения истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов, где преципитация загрязняющего белка включает обработку суспензии,

полученной на стадии (а), с использованием С7-С9 карбоновой кислоты;

(с) подвергания истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (b), ионообменной хроматографии с использованием анионообменной смолы в условиях рН и проводимости, доведенных до связывания, на основании количества каждого иммуноглобулина, подвергнутого ионообменной хроматографии, по меньшей мере 90% по массе каждого из IgM и IgA со смолой, и получения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в проточной фракции и/или посредством элюирования IgG из анионообменной смолы в условиях, в которых IgM и IgA остаются связанными с анионообменной смолой; и

(d) подвергания обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (с), обработке с использованием катионообменного материала в условиях рН и проводимости, в которых пропердин связывается с указанным катионообменным материалом, включающей приведение в контакт обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с указанным катионообменным материалом при рН в диапазоне от 5,0 до 6,0 и при проводимости в диапазоне от 16 до 30 мСм/см и выделения IgG для получения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, имеющей уменьшенное содержание пропердина.

5. Способ по п. 3 или 4, где стадия (с) дополнительно включает использование анионообменной смолы в условиях рН и проводимости, подобранных так, чтобы также связывать IgG со смолой.

6. Способ по п.3 или 4, где стадия (с) дополнительно включает элюирование из анионообменной смолы IgM и/или IgA для получения композиции иммуноглобулина, обогащенной IgM и/или IgA.

7. Способ по любому из пунктов 3-6, где проводимость суспензии составляет по меньшей мере 1,5 мСм/см.

8. Способ по п.7, где проводимость суспензии составляет по меньшей мере 2,0 мСм/см.

9. Способ по п.7 или 8, где проводимость суспензии составляет по меньшей мере 2,5 мСм/см.

10. Способ по любому из пп.3-9, где ресуспендирование полученной из плазмы фракции иммуноглобулинов проводят с

использованием буфера, доведенного до pH в диапазоне от 4,2 до 5,5.

11. Способ по п.10, где буфер представляет собой ацетатный буфер.

12. Способ по любому из пп.3-11, где преципитация загрязняющего белка на стадии (b) включает обработку суспензии, полученной на стадии (a), с использованием октановой кислоты.

13. Способ по любому из пп.3-12, где удаление загрязняющего белка на стадии (b) включает фильтрацию.

14. Способ по любому из пп.3-13, где стадия (b), после удаления загрязняющего белка, дополнительно включает подвергание истощенной по примесям композиции иммуноглобулинов обработке слабой кислотой, где композицию иммуноглобулинов инкубируют при pH в диапазоне от 3,8 до 4,5 перед подверганием ее ионообменной хроматографии с анионообменной смолой на стадии (c).

15. Способ по п.14, где композицию иммуноглобулинов инкубируют при pH в диапазоне от 3,8 до 4,5 и при температуре в диапазоне от 35 до 40°C перед подверганием ее ионообменной хроматографии с анионообменной смолой на стадии (c).

16. Способ по любому из пп. 3-14, где анионообменная смола, используемая на стадии (c), представляет собой макропористую анионообменную смолу.

17. Способ по любому из пунктов 3-16, где ионообменную хроматографию на стадии (c) проводят при pH в диапазоне от 6,7 до 7,5.

18. Способ по любому из пунктов 3-17, где указанную ионообменную хроматографию проводят при проводимости в диапазоне от 4 до 7,5 мСм/см.

19. Способ по п.18, где указанную ионообменную хроматографию проводят при проводимости в диапазоне от 5,5 до 7 мСм/см.

20. Способ по любому из пп. 3-19, где IgM и/или IgA, связанные с анионообменной смолой, элюируют из смолы при проводимости по меньшей мере 20 мСм/см.

21. Способ по п.20, где элюирование проводят при pH в диапазоне от 6,7 до 7,5.

22. Способ по любому из пп. 3-21, где обработку обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов на стадии (d) проводят посредством подвергания обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов катионообменной хроматографии в условиях рН и проводимости, при которых пропердин связывается с катионообменным материалом, и IgG выделяют во фракции проскока; или где обработку обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов на стадии (d) проводят посредством приведения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в контакт с катионным мембранным адсорбентом в условиях рН и проводимости, в которых пропердин связывается с катионным мембранным адсорбентом, и IgG выделяют во фракции проскока.

23. Способ по любому из пунктов 1-22, где обработку с катионообменным материалом проводят посредством приведения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов с катионообменным материалом при рН в диапазоне от 5,2 до 5,8.

24. Способ по любому из пунктов 1-23, где обработку с катионообменным материалом проводят посредством приведения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в контакт с катионообменным материалом при проводимости в диапазоне от 20 до 28 мСм/см.

25. Способ по любому из пунктов 1-24, где обработку с катионообменным материалом проводят посредством приведения обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов в контакт с катионообменным материалом при проводимости в диапазоне от 22 до 26 мСм/см.

26. Способ по любому из пп.3-25, дополнительно включающий подвергание обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (d), и/или композиции иммуноглобулинов, обогащенной IgM и/или IgA, полученной на стадии (c), дополнительной обработке для инактивации вируса, для получения препарата с инаktivированным вирусом.

27. Способ по любому из пп. 3-26, дополнительно включающий стадию составления обогащенной IgG композиции иммуноглобулинов, полученной на стадии (d), и/или композиции иммуноглобулинов,

обогащенной IgM и/или IgA, полученной на стадии (с), в фармацевтический препарат.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где обогащенная IgG композиция иммуноглобулинов, имеет содержание IgG по меньшей мере 95% по массе, на основании общей массы иммуноглобулинов в содержащей пропердин композиции IgG.

29. Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов, полученная из плазмы крови 500 доноров или более, и полученная способом по любому из пунктов 1-28, где указанная композиция имеет:

- (i) содержание IgG по меньшей мере 45 г/л композиции;
- (ii) содержание IgG по меньшей мере 95% по массе, на основании общей массы иммуноглобулинов в композиции;
- (iii) содержание пропердина не более, чем 0,01 мкг/мг от общих иммуноглобулинов в композиции, и
- (iv) содержание полимеров IgG не более, чем 0,05%, на основании общего количества IgG в композиции.

30. Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по п.29, имеющая содержание IgG в диапазоне от 45 г/л до 225 г/л.

31. Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по п.29 или п.30, где композиция имеет содержание IgG по меньшей мере 98% по массе на основании общей массы иммуноглобулинов в композиции.

32. Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по любому из пп. 29-31, имеющая содержание пропердина 0,005 мкг/мг общих иммуноглобулинов в композиции.

33. Обогащенная IgG фармацевтическая композиция иммуноглобулинов по любому из пп.29-32, имеющая содержание полимера IgG не более, чем 0,01%, на основании общего количества IgG в композиции.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference BI9703P-WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2017/068914	International filing date (<i>day/month/year</i>) 26 July 2017 (26-07-2017)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 27 July 2016 (27-07-2016)
Applicant BIOTEST AG		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☐

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/068914

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/06	G01N33/68	C07K1/16 C07K1/22 C07K1/30
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/006449 A2 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; SONG WENCHAO [US]) 10 January 2013 (2013-01-10) page 1, line 27 - page 2, paragraph 1 claims 1-58	1-32
A	WO 99/10009 A1 (GLIATECH INC [US]; GUPTA BANSAL REKHA [US]; BRUNDEN KURT R [US]; PAREN) 4 March 1999 (1999-03-04) claims 1-66	1-32
X	WO 2015/136217 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT [FR]) 17 September 2015 (2015-09-17) page 13, paragraph 3; claims 1-36 page 11, paragraph 6	1-32
	----- -/-	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 September 2017		Date of mailing of the international search report 06/10/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Klee, Barbara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/068914

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SU 1 137 098 A1 (MO VETERINARNAYA AKAD [SU]) 30 January 1985 (1985-01-30) the whole document -----	1-32
A	JACK PENSKY: "Properties of highly purified human properdin", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 100, no. 1, 1 January 1968 (1968-01-01), pages 142-158, XP002763386, USA page 142, column 2, paragraph 3 - page 143, column 1, paragraph 5 -----	28-32
X	US 2013/058961 A1 (TESCHNER WOLFGANG [AT] ET AL) 7 March 2013 (2013-03-07) [0031], [0033], [0155], [0156], [0160-0171], [0199-0228] -----	1-32
A	Anonymous: "Novel recombinant monoclonal antibodies ABFINITY (tm) TECHNOLOGY ENSURES PERFORMANCE", BioProbes September 2012 (2012-09), XP002763387, Retrieved from the Internet: URL:https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/support/bioprob es/bioprob es-61.par.86619.file.d at/bioprob es-61-abfinity.pdf [retrieved on 2016-10-25] the whole document -----	28-32
X	US 5 854 051 A (CHANDRASHEKAR RAMASWAMY [US] ET AL) 29 December 1998 (1998-12-29) example 1 -----	28-32
X	AU 2013 206 196 A1 (LAB FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT) 27 June 2013 (2013-06-27) page 4, line 19 - line 25; claims 1,3,4 page 2, paragraph 1 table, page 17; page 17 -----	28-32
X	US 4 296 027 A (CONDIE RICHARD M) 20 October 1981 (1981-10-20) column 17 - column 18; table 5 -----	28-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/068914

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013006449	A2	10-01-2013	AU 2012279288 A1 20-02-2014
		CN 103796664 A 14-05-2014	
		EP 2726103 A2 07-05-2014	
		JP 2014522845 A 08-09-2014	
		KR 20140064768 A 28-05-2014	
		US 2014212427 A1 31-07-2014	
		WO 2013006449 A2 10-01-2013	
WO 9910009	A1	04-03-1999	AT 335511 T 15-09-2006
		AU 756490 B2 16-01-2003	
		CA 2302317 A1 04-03-1999	
		DE 69835524 T2 05-04-2007	
		DK 1007092 T3 02-10-2006	
		EP 1007092 A1 14-06-2000	
		ES 2270530 T3 01-04-2007	
		JP 2001513576 A 04-09-2001	
		NO 20000935 A 18-04-2000	
		NZ 503033 A 31-01-2003	
		PT 1007092 E 29-12-2006	
		US 6333034 B1 25-12-2001	
		US 2002015701 A1 07-02-2002	
		US 2003198636 A1 23-10-2003	
		WO 9910009 A1 04-03-1999	
WO 2015136217	A1	17-09-2015	AU 2015228649 A1 15-09-2016
		CA 2942203 A1 17-09-2015	
		CN 106103473 A 09-11-2016	
		EP 3116527 A1 18-01-2017	
		FR 3018450 A1 18-09-2015	
		JP 2017508759 A 30-03-2017	
		KR 20160130495 A 11-11-2016	
		TW 201620925 A 16-06-2016	
		US 2017073396 A1 16-03-2017	
		WO 2015136217 A1 17-09-2015	
SU 1137098	A1	30-01-1985	NONE
US 2013058961	A1	07-03-2013	AR 087953 A1 30-04-2014
		AU 2012300220 A1 02-05-2013	
		BR 112014004445 A2 28-03-2017	
		CA 2846599 A1 07-03-2013	
		CL 2014000480 A1 03-10-2014	
		CN 103874708 A 18-06-2014	
		CO 6920256 A2 10-04-2014	
		EA 201400273 A1 29-08-2014	
		EP 2748193 A1 02-07-2014	
		ES 2624485 T3 14-07-2017	
		HK 1199267 A1 26-06-2015	
		JP 6165143 B2 19-07-2017	
		JP 2014525417 A 29-09-2014	
		KR 20140062088 A 22-05-2014	
		SG 11201400233T A 28-08-2014	
		TW 201326192 A 01-07-2013	
		US 2013058961 A1 07-03-2013	
		WO 2013033042 A1 07-03-2013	
US 5854051	A	29-12-1998	AU 9315898 A 05-04-1999
		US 5854051 A 29-12-1998	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/068914

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 6042825 A	28-03-2000
		US 6165735 A	26-12-2000
		WO 9914339 A1	25-03-1999

AU 2013206196	A1	27-06-2013	NONE

US 4296027	A	20-10-1981	NONE
