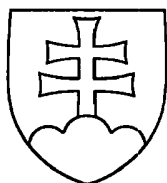


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

**ZVEREJNENÁ  
PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU**

- (22) Dátum podania prihlášky: **9. 6. 1999**  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **98201909.3,  
60/102 055**  
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **9. 6. 1998,  
28. 9. 1998**  
(33) Krajina alebo regionálna  
organizácia priority: **EP, US**  
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **10. 7. 2001**  
Vestník ÚPV SR č.: **07/2001**  
(62) Číslo pôvodnej prihlášky  
v prípade vylúčenej prihlášky:  
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **PCT/DK99/00312**  
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky  
podľa PCT: **WO99/64462**

(21) Číslo dokumentu:

**1866-2000**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>:

**C07K 16/06**

(71) Prihlasovateľ: **STATENS SERUM INSTITUT, Copenhagen S, DK;**

(72) Pôvodca: **Laursen Inga, Hellerup, DK;  
Teisner Børge, Odense C, DK;**

(74) Zástupca: **JUDr. Eva Bušová, Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob výroby imunoglobulínov na intravenózne podanie a ďalších imunoglobulínových produktov**

(57) Anotácia:

Purifikácia imunoglobulínu G z hrubej frakcie plazmatických proteínov obsahujúcich imunoglobulín, pri ktorej je prednostne predvádzaná anexová a katexová chromatografia, ktoré sú zapojené do série. V priebehu purifikačného postupu je používaný acetátový pufer s pH okolo 5,0 - 6,0 a s molaritou 5 - 25 mM. Ďalej je opísaný imunoglobulínový produkt získaný uvedeným postupom, ktorého čistota je nad 98 %, obsahuje menej ako 4 mg IgA/l a menej ako 0,5 % polymérov a agregátov, neobsahuje detergent, PEG alebo albumín ako stabilizátor. Produkt je stabilný, neobsahuje vírusy, je tekutý a je pripravený na rýchle intravenózne podanie.

**SK 1866-2000 A3**

1

**Spôsob výroby imunoglobulínov <sup>na</sup> pre intravenózne podanie a ďalších imunoglobulínových produktov.**

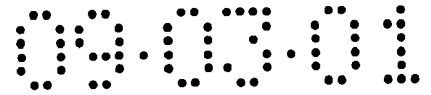
#### Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka spôsobu purifikácie imunoglobulínov, tj. imunoglobulínu G (IgG) z natívnej plazmy alebo z hrubej frakcie plazmatických proteínov. Vynález sa tiež týka imunoglobulínového produktu a použitia takého imunoglobulínového produktu pre lekárske účely.

#### Doterajší stav techniky

Ludský normálny imunoglobulín pre použitie v prevencii a liečbe infekčných ochorení bol zavedený ku konci štyridsiatych rokov dvadsiateho storočia. Bolo preukázané, že ľudský normálny imunoglobulín pripravený spôsobom studenej etanolovej frakcionácie podľa Cohna a Oncleyho (Cohn E., et al., (1946), J Am Chem Soc, 71, 541-550) a následne tiež modifikáciou podľa Kistlera a Nitschmanna (Kistler P a Nitschmann HS (1952), Vox Sang, 7, 414-424) je ako účinný, tiež aj bezpečný proti prenosu vírusovej infekcie, pokiaľ je podaný subkutánne alebo intramuskulárne.

Kongenitálne alebo získané celkové alebo čiastočné chýbanie imunoglobulínov (primárny respektíve sekundárny syndróm imunodeficiencie) sa manifestujú veľa bežnými aj závažnými infekciami, obzvlášť bakteriálneho pôvodu. Prevencie takýchto infekcií bolo predtým dosahované opakovanými intramuskulárnymi alebo subkutánnymi injekciami veľkého množstva ľudského normálneho imunoglobulínu, a to až niekoľkokrát týždne ako celoživotná liečba, ktorá je veľmi bolestivá, pokiaľ je liek podávaný intramuskulárne. Na začiatku šesťdesiatych rokov boli preto učené pokusy o intravenózne podanie ľudského normálneho imunoglobulínu. Klinické štúdiá preukázali, že zhruba 5% zdravých dobrovoľníkov a zhruba u 95% pacientov



s deficienciou imunoglobulínov dôjde k rozvoju okamžitých nežiadúcich účinkov od dyspnoe až k cirkulačnému šoku a tieto nežiaduce účinky mali tak závažný charakter, že intravenózne podávanie imunoglobulínu muselo byť opustené.

Dôvodom vyššie spomínaných nežiadúcich účinkov sa ukázali byť agregáty imunoglobulínov, ktoré medzi inými účinkami silno aktivovali komplementový systém. Toto bolo obzvlášť vidno u pacientov postrádajúcich imunoglobulíny. Obzvlášť závažné nežiaduce účinky anafylaktického charakteru môžu byť vidno u pacientov, u ktorých dôjde k rozvoju protilátok proti IgA. Následne bol vyvinutý spôsob zabránenia tvorby agregátov a/alebo eliminácie týchto agregátov počas postupu prípravy a zhruba pred dvadsiatimi rokmi bola testovaná prvá generácia imunoglobulínov pre intravenózne podanie (IVIG) a tieto imunoglobulíny boli nájdené ako vhodné pre toto použitie.

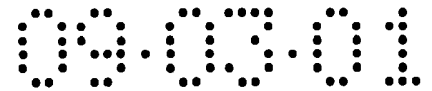
Pôvodný účelom IVIG bolo zmierniť infekčné epizódy u pacientov s kongenitálnym alebo získaným celkovým či čiastočným chýbaním imunoglobulínov a ďalej eliminovať diskomfort súvisajúci s podaním ľudského normálneho imunoglobulínu. Ďalšou výhodou IVIG je, že veľké dávky imunoglobulínu môžu byť podané počas krátkej doby, a týmto spôsobom je možno získať veľmi rýchlo dostatočne vysoké koncentrácie v krvi. Obzvlášť pri liečbe závažných bakteriálnych infekcií je dôležité ustaviť rýchlo vysoké koncentrácie v miestach prebiehajúcej infekcie.

V posledných rokoch bolo ďalej preukázané, že IVIG sú účinné u ďalších závažných ochoreniach, ktorých liečba môže byť ináč obtiažna, napríklad se jedná o krvácania spôsobená vymiznutím krvných doštičiek na podklade imunologických mechanizmov, tzv. idiopatickú trombocytopenickú purpúru (ITP), ďalej o niektoré vzácne ochorenia, ako sú napríklad Kawasakiho syndróm a celý rad autoimúnnych ochorení, ako je napríklad polyradikulitída

(Guillan Barreho syndróm). Tiež u ďalších ochorení, ktorá bola do súčasnosti predmetom klinických štúdií s IVIG. Mechanizmus účinku u týchto ochorení bol objasnený iba čiastočne. Predpokladá sa, že účinok sa týka takzvaných imunomodulačných vlastností IgG, napríklad blokády Fc $\gamma$ -receptorov na fagocytárnych bunkách, zvýšeného metabolizmu IgG, zníženie tvorby cytokínov a interferencie s predpoladanou sieťou idiotypov/antiidiotypov, obzvlášť dôležitých pre neutralizáciu autoimúnnej reaktivity.

Prvá generácia IVIG bola pripravená pepsínovým štiepením východzeho materiálu (Cohnova frakcia II), účelom štiepenia bolo odstránenie imunoglobulínových agregátov. V tomto postupe neboli zahrnuté žiadne kroky na báze stĺpcovej chromatografie. Produkt musel byť lyofilizovaný, aby ostal stabilný po primerane dlhú dobu a bol rozpustený tesne pred použitím.

Východzím materiálom pre IVIG bol ľudský normálny imunoglobulín, u ktorého bolo preukázané, že je bezpečný s ohľadom na možný prenos vírusov, pokiaľ bol tento imunoglobulín používaný pre intramuskulárne injekčné podanie. IVIG bol teda považovaný za bezpečný. Po niekoľkých rokoch klinického používania však bolo IVIG produktov niektorých výrobcov prekvapivo preukázané, že spôsobujú prenos vírusu hepatitídy C. Štúdia prevádzané za účelom objasnenia osudu vírusov počas výroby ľudského normálneho imunoglobulínu preukázali, že prestup vírusu frakčionálnym postupom z plazmy do frakcie s ľudským normálnym imunoglobulínom je nevelký. Bezpečnosť ľudského normálneho imunoglobulínu pre intramuskulárne použitie je pravdepodobne spôsobené faktom, že obsahuje ochranné imunoglobulíny. V kombinácii s malými injekčne podávanými objemy a intramuskulárnym spôsobom podávania môžu tieto ochranné imunoglobulíny neutralizovať bežné vírusy v plazme arobiť je neinfekčnými. Zvlášť pokiaľ



sú podávané intravenózne veľké dávky imunoglobulínov, môžu sa objaviť vírusové infekcie, ako bolo popísané na začiatku devädesiatych rokov. Z tohto dôvodu bolo určené, že proces výroby by mal zahŕňať jeden alebo viacej dobre definovaných krokov k inaktivácii vírusov a/alebo k ich odstraneniu.

Druhá generácia IVIG založená na nenaštiepených a nemodifikovaných molekulách imunoglobulínu s nízkou antikomplementárnou aktivitou a vyššiou stabilitou bola zavedená uprostred osemdesiatych rokov, ale stále vo forme lyofilizovaného produktu. Tento IVIG bol purifikovaný niekoľko chromatografickými krokmi. Produkty tohoto typu v súčasnosti dominujú na trhu s IVIG. Prvá a druhá generácia IVIG sa tak objavujú ako lyofilizované prášky, ktoré sa rozpúšťajú tesne pred použitím.

Rozpúšťanie lyofilizovaných IVIG je pomalé (do 30 minút pre jednu flaštičku). Často musí byť rozpustené pre jedného pacienta niekoľko flaštičiek. Pretože je pre užívateľa vysoko prioritne mať IVIG v roztoku pripraveného k použitiu, boli zavedené na trh tekuté produkty. Je ešte dôležitejšie je, že stále existuje potreba zlepšenia postupu výroby, aby bolo možné získať vysoko purifikovaný, stabilný a plne natívny preparát IVIG s vyššiou klinickou účinnosťou menším počtom nežiadúcich liekových reakcií. Je teda potrebné získať ďalej rozvinutý a vylepšený postup purifikácie IgG z natívnej plazmy alebo plazmatické proteínové frakcie za účelom získania tekutého IVIG produktu bez prítomnosti vírusu. Konečne, postup by mal byť navrhnutý takým spôsobom, aby mohol byť použitý pri výrobe vo veľkom merítke.

Purifikačný postup popísaný v predkladanej prihláške vedie k tvorbe tekutého imunoglobulínového produktu pre intravenózne podanie, ktorý môže byť charakterizovaný ako vysoko



purifikovaná, plne natívna, biologicky aktívna, podrobená dvojitej inaktivácii vírusov a stabilná nová generácia IVIG, ktorá neobsahuje žiadny detergent, polyetylén glykol (PEG) alebo albumín ako stabilizátor.

### Popis vynálezu

Predkladaný vynález sa týka zlepšeného purifikačného postupu a zlepšeného tekutého imunoglobulínového produktu, ktorý, *inter alia*, môže byť podaný intravenózne.

Imunoglobulínový produkt získaný spôsobom, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, môže nazývaný IVIG tretej generácie. Postup je charakterizovaný nasledujúcimi podmienkami frakcionácie: neprebíha pepsínové štiepenie, agregáty a častice sú odstránené precipitáciou (krok, ktorý bol overený, že vedie k odstráneniu vírusov), ďalší purifikácie je dosiahnuté stĺpcovou ionexovou chromatografiou, ako vírus inaktivačný krok slúži S/D postup a preparát je formulovaný ako tekutý produkt.

V dôsledku zlepšenej čistoty produktu, ktorý možno získať postupom podľa vynálezu v srovnaní s predošlými produktami, nie je nezbytné pridávať stabilizátory, ako sú neiónové detergenty, PEG alebo albumín, pre vylúčenie agregácie IgG počas skladovaní IVIG ako tekutého produktu. Produkt, ktorý možno získať postupom podľa vynálezu, má vyššiu kvalitu ako produkty získané predošlými postupmi a poskytuje lepšie klinické účinky a nechtiace nežiadúce účinky sa skutočne nevyskytujú.

Detailný popis vynálezu

Predkladaný vynález sa týka spôsobu purifikácie imunoglobulínov, tj. IgG z natívnej plazmy alebo z frakcie plazmatických proteínov obsahujúcich imunoglobulín, ktorý spôsob sa skladá z krokov:

- a) prípravy vodnej suspenzie hrubej frakcie plazmatických proteínov obsahujúcich imunoglobulíny;
- b) pridanie vo vode rozpustnej, významne nenedenaturačnej precipitačnej látky k spomínanej suspenzii z kroku (a) v množstve dostatočnom k spôsobeniu precipitácie veľkej časti proteínov nepatriacich k imunoglobulínu G, agregátov imunoglobulínov a častíc zahŕňajúcich potenciálne infekčné častice, ako sú napríklad vírusové častice bez spôsobenia významnej precipitácie monomérického imunoglobulínu G, čím dochádza k tvorbe zmesi pevného precipitátu a tekutého supernatantu;
- c) získanie supernatantu s prečisteným imunoglobulínom G zo zmesi z kroku (b);
- d) aplikácia supernatantu obsahujúceho prečistený imunoglobulín G z kroku (c) na anexovú živicu a následne na katexovú živicu;
- e) vymytie bielkovinných kontaminujúcich látok a precipitátov proteínu z katexovej živice pomocou pufru majúceho pH a iónovú silu, ktoré sú dostatočné k odstráneniu kontaminujúcich látok zo živice bez spôsobenia významnejšie elúcie imunoglobulínu G;
- f) elúcie imunoglobulínu G z katexovej živice pomocou nenedenaturačného pufru majúceho pH a iónovú silu, ktoré sú dostatočné k účinnej elúcii imunoglobulínu G, čím dochádza k získaniu eluátu obsahujúceho imunoglobulín G;
- g) prevedenie dia/ultrafiltrácie eluátu obsahujúceho imunoglobulín G z kroku (f) za účelom zakoncentrovania a/alebo dialýzy eluátu a voliteľne pridanie stabilizačnej látky;

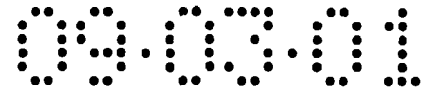
- h) prídanie viricídneho množstva inaktivujúcej látky inaktivujúcej vírusy k dia/ultrafiltrovanej a voliteľne stabilizovanej frakcii obsahujúcej imunoglobulín G z kroku (g), čo vedie k získaniu roztoku obsahujúceho imunoglobulín G významne bez prítomnosti vírusov;
- i) aplikácia roztoku obsahujúceho imunoglobulín G z kroku (h) na anexovú živicu a následne na katexovú živicu;
- j) premytie katexovej živice pomocou pufru majúceho pH a iónovú silu, ktoré sú dostatočné k vymytiu bielkovinných kontaminujúcich látok a látok inaktivujúcich vírusy zo živice bez spôsobenia významnejšej elúcie imunoglobulínu G;
- k) elúcia imunoglobulínu G z katexovej živice z kroku (j) pomocou významnejšie nenedenaturujúceho pufru majúceho pH a iónovú silu, ktoré sú dostatočné k účinnej elúcii imunoglobulínu G, čím dochádza k získaniu eluátu obsahujúceho imunoglobulín G; a
- l) podrobenie eluátu obsahujúceho imunoglobulín G z kroku (k) dia/ultrafiltráciu za účelom získania roztoku o nižšej iónovej sile a zakoncentrovaniu imunoglobulínu G, a úprava osmolality prídáním sacharídu.

Východzí materiál predkladaného purifikačného postupu môže byť natívnou plazmou, ale je s výhodou hrubou frakciou plazmatických proteínov obsahujúcich imunoglobulín. Východším materiálom pre purifikačný postup môže byť normálna ľudská plazma, alebo môže tento materiál pochádzať od darcov s vysokými titrami špecifických protilátok, jedná sa napríklad o hyperimúnne plazmy. Predkladaná špecifikácia, termín "plazmatická frakcia obsahujúca imunoglobulín" zahŕňa všetky možné východzie materiály pre predkladaný postup, napríklad kryoprecipitátu zbavenú plazmu, alebo kryoprecipitátu zbavenú plazmu, z ktorej boli odstránené rôzne plazmatické proteíny, ako sú napríklad Faktor IX a antitrombín, rôzne Cohnovy

frakcie a frakcie získané precipitačnými postupmi za použitia PEG (Polson et al., (1964), Biochem Biophys Acta, 82, 463-475; Polson a Ruiz-Bravo, (1972) Vox Sang, 23, 107-118) alebo za použitia síranu amonného. V prednostnej forme vynálezu sú plazmatickou proteínovou frakciou Cohnovy frakcie I, II a III, ale tiež môžu byť použité Cohnovy frakcie I, II a III. Rôzne Cohnovy frakcie sú prednostne pripravené z plazmy za použitia štandardnej Cohnovy frakcionácie modifikovanej Kistler-Nitschmannem. Cohnovy frakcie obsahujú navyše k imunoglobulínom napríklad fibrinogén,  $\alpha$ -globulíny a  $\beta$ -globulíny, vrátane rôznych lipoproteínov, ktoré by mali byť prednostne odstránené následným purifikačným postupom. Filtrácia môže aj nemusí byť použitá v závislosti na izolačnom postupe použitom k získaniu Cohnových frakcií (tj. centrifugácia alebo filtrácia).

Prvý krok postupu, ktorý je predmetom vynálezu zahŕňa prípravu vodnej suspenzie frakcie plazmatických proteínov obsahujúcich imunoglobulín, kde koncentrácia IgG v suspenzii je dostatočne vysoká, a tak behom nasledného precipitačného kroku precipituje hlavná časť non-IgG proteínov, zvlášť tie s vysokou molekulovou váhou, ďalej agregované imunoglobulíny a ďalšie agregované proteíny, rovnako tak ako potenciálne infekčné častice, a to bez významnej precipitácie monomérnych IgG. Tohoto efektu je obecné dosiahnuté, pokiaľ koncentrácia IgG v pufrovanej a zfiltrovanej suspenzii je aspoň 4 g/l pred pridaním precipitačnej látky. Malo by byť brané do úvahy, že vplyv koncentrácie bielkovín, rovnako tak ako pH a teplota suspenzie na precipitáciu závisí na typu zvolenej precipitačnej látky.

Je preferované, aby frakcia plazmatických proteínov bola suspendovaná vo vode a/alebo v pufru pri významne nedenaturujúcej teplote a pH. Termín "významne nedenaturujúci"

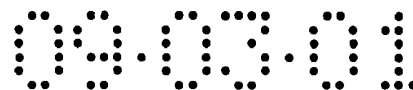


značí, že nedochádza k významnej ireverzibilnej strate funkčnej aktivity IgG molekúl, napríklad ku strate antigén väzebnej aktivity a/alebo strate biologickej Fc-funkcie (viď. Príklad 2).

Frakcia plazmatických proteínov je suspendovaná vo vode s aspoň jedným nenedaturačným pufrovým systémom v objemoch od 6 do 9, prednostne od 7 do 8, násobku frakcie plazmatických proteínov. Hodnota pH suspenzie obsahujúci imunoglobulíny je prednostne udržiavaná pod 6, ako napríklad v rozmedzí od 4,0 až do 6,0, prednostne 5,1 až 5,7, najprednostnejšie okolo 5,4, aby došlo k zaisteniu optimálnej rozpustnosti imunoglobulínu a k zaisteniu optimálneho efektu následného PEG precipitačného kroku. Môže byť použitý vhodný kyselé pufo, ale pufrový systém prednostne obsahuje aspoň jeden z nasledujúcich pufov a kyselín: fosforečnan sodný, octan sodný, kyselina octová, HCl. Osoby poznajúci obor ocenia, že môžu byť použité aj iné četné pufre.

Imunoglobulínová suspenzia je prednostne udržiavaná pri studenej teplote, *inter alia* aby došlo k zabráneniu významnej denaturácii proteínov a minimalizácii aktivity proteáz. Imunoglobulínová suspenzia a voda, rovnako tak ako pridaný pufrový systém majú prednostne rovnakú teplotu v rozmedzí 0-12°C, prednostne 0-8°C, najprednostnejšie 1-4°C.

Suspenzia etanolom precipitovanej pasty obsahuje relatívne veľké množstvá agregovaného proteínového materiálu. Suspenzia obsahujúca imunoglobulín je voliteľne zfiltrovaná za účelom odstránenia napríklad veľkých agregátov, filtračných prostriedkov, pokiaľ sú prítomné a reziduálnu neruzpustenú pastu. Filtrácia je prednostne prevedená pomocou hĺbkových filtrov, napríklad C150AF, AF 2000 alebo AF 1000 (Schenk), 30LA (Cuno), alebo podobné filtre. Odstránenie veľkých

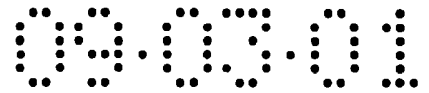


agregátov, filtračných prostriedkov, pokiaľ sú prítomné, a reziduálne nerozpustené pasty môže byť prevedené tiež centrifugáciou.

Aspoň jedna vo vode rozpustná významne nenedenaturujúca precipitačná látka je pridaná k zfiltrovanej suspenzii obsahujúcej imunoglobulín v množstve dostatočnom k vyvolaniu precipitácie veľkej časti vysoko molekulárnych proteínov, lipoproteínov, agregovaných proteínov, medzi nimi aj agregovaných imunoglobulínov. Iný partikulárny materiál, ako sú napríklad potenciálne infekčné častice, napríklad vírusové častice, sú tiež precipitované bez spôsobenia významnej precipitácie monomérneho IgG. Termín "infekčná častica" v predkladanom kontexte zahŕňa napríklad vírusové častice (ako sú napríklad vírusy hepatitídy, HIV 1 a HIV 2) a baktérie.

Významne nenedenaturujúci, vo vode rozpustné proteíny precipitujúcej látky sú dobre známe v oblasti proteínovej purifikácie. Také precipitačné látky sú používané pre frakcionáciu bielkovín, ktorá vedie k čiastočnej purifikácii proteínov zo suspenzií. Vhodné látky precipitujúcej bielkoviny pre použitie v postupe, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, zahŕňajú formy PEG o rôznej molekulovej váhe, kyselinu kaprylovú a síran amónny. Osoby poznajúce obor ocenia, ako alternatívne prostriedky precipitácie môžu byť použité niektoré iné nenedenaturačné vo vode rozpustné precipitačné látky. Termín "pridanie látky precipitujúcej bielkoviny" a varianty tohto termínu zahŕňajú pridanie jedného alebo viacej typov látok precipitujúcich bielkoviny.

Prednostnou precipitačnou látkou je organická látka PEG, zvlášť PEG o molekulovej váhe v rozmedzí 3000-8000 Da, ako sú napríklad PEG 3350, PEG 4000, PEG 5000 a najmä PEG 6000 (čísla týchto špecifických PEG zlúčenín udávajú ich priemernú



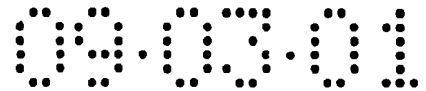
molekulovú váhu). Výhodou použitia látky PEG ako precipitačnej látky je fakt, že PEG nemá iónový charakter a stabilizuje bielkoviny, PEG je napríklad dobre známy ako stabilizátor IVIG produktov. Precipitačný krok tiež funguje ako krok odstraňujúci vírusy. PEG koncentruje a precipituje vírusy bez ohľadu na ich druh, veľkosť a povrch.

Podané množstvo látky precipitujúcej bielkoviny je pridané k zfiltrovanej suspenzii za účelom precipitácie väčšiny vysoko molekulárnych a agregovaných proteínov a častíc, bez významnejšej precipitácie monomérnych IgG, za vzniku čistého roztoku supernatantu. Látka precipitujúca bielkoviny môže byť pridaná v pevnej forme ako prášok alebo v koncentrovanom roztoku.

Pre PEG ako precipitačnú látku platí, že čím vyššia je molekulárna váha zlúčeniny, tým nižšia je koncentrácia PEG potrebná k vyvolaniu precipitácie bielkoviny. Pokiaľ je použitý PEG 3350, PEG 4000, alebo prednostne PEG 6000, je koncentrácia precipitačnej látky vo zfiltrovanej suspenzii s výhodou v rozmedzí 3-15% váhovo, ako napríklad 4-10% (ako napríklad zhruba 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%), kde 6% je najviac preferované.

V precipitačnom kroku pokračuje precipitačný proces až do dosaženia rovnováhy medzi pevnou a tekutou fázou, napríklad pod dobu aspoň 2 hodín, ako napríklad od zhruba 2 hodín do zhruba 12 hodín, prednostne okolo 4 hodín. Počas precipitácie je suspenzia prednostne udržiavaná pri nízkej teplote (napríklad menej ako zhruba 12°C, ako napríklad menej ako zhruba 10°C, prednostne medzi 2°C a 8°C). Najvhodnejšia teplota závisí na typu látky precipitujúcej bielkoviny.

Po ukončení precipitácie bielkoviny je prečistený supernatant obsahujúci IgG, ktorý je takmer výhradne v monomérnej forme,

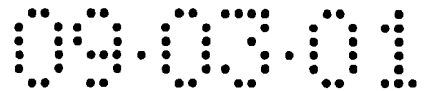


získaný zo zmesi pevného precipitátu a tekutého supernatantu vzniknutých v priebehu precipitácie. Získanie IgG môže byť prevedené konvečnými technikami separácie tekutiny z pevnej fázy, ako je napríklad centrifugácia a/alebo filtrácia. Prednostne je používaná centrifugácia (napríklad Westfalia) s rýchlosťou 1000-5000 g.

Voliteľne je získaný, prečistený supernatant obsahujúci IgG zfiltrovaný za účelom odstránenia väčších častíc a agregátov. Tento postup je voliteľne nasledovaný sterilnou filtráciou prevádzanou za použitia konvenčného sterilizačného filtra (ako je napríklad 0,22 um filter od spoločnosti Millipore alebo Sartorius), ktorý eliminuje z roztoku napríklad baktérie.

Prečistený a voliteľne zfiltrovaný supernatant obsahujúci IgG je podrobený aspoň jednému kroku, lepšie dvom krokom, ale voliteľne viacej krokom anexovej a katexovej chromatografie za účelom odstránenia non-IgG kontaminujúcich látok, napríklad IgA, albumínu, rovnako tak ako agregátov. V prednostnej forme vynálezu je prečistený a voliteľne zfiltrovaný supernatant obsahujúci IgG aplikovaný na anexovu živicu a následne sú pripravené dve kolóny s vhodnými rozmerami, ktoré sú naplnené katexovou živicom.

Pokiaľ sa prevádza za účelom purifikácie IgG ionexová chromatografia, je preferované, aby podmienky, napríklad pH a iónová sila, boli zvolené takým spôsobom, že hlavný podiel kontaminujúcich látok (napríklad non-IgG proteínov, ako sú napríklad IgA, transferín, albumín a agregáty) v aplikovanom roztoku sa viaže na anexovú živicu, zatiaľ čo nedochádza k významnej väzbe IgG. S ohľadom na následnú katexovú chromatografiu vedú zvolené prednostné podmienky k väzbe prevážne väčšiny IgG molekúl prítomných v roztoku, ktorý je aplikovaný na katexovú živicu. Bielkovinné kontaminujúce látky



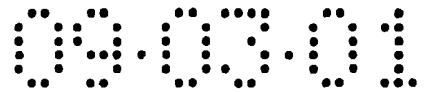
neabsorbované na anexovú živicu a precipitačná látka sú odstránené v následnom premievaní katexovej živice.

V prednostnej forme predkladaného postupu sú anexová a katexová chromatografie zapojené do série. V predkladanom kontexte značí termín "zapojené do série", pokiaľ je použitý v spojení s ionexovými živícami, že proteíny prechádzajúce anexovou živicom sú priamo aplikované na katexovú živicu bez zmeny pufru alebo iných podmienok.

Existuje niekoľko dôvodov, prečo je výhodné previesť anexovú a katexovú chromatografiu v jednom kroku za použitia dvoch sériovo zapojených chromatografických kolón, namiesto použitia dvoch nezávislých chromatografických krokov, napríklad s rôznym zložením pufov. Použitie dvoch sériovo zapojených chromatografických kolón robia celý postup praktičtejší, napríklad nie je treba medzikroku sbierania IgG obsahujúce frakcie medzi dvomi ionexovými chromatografiami za účelom úpravy pH a iónovej sily. Navyiac sú pufre aplikované na kolónu súčasne a obe kolóny sú ekvilibrované rovnakým pufrom. Je ale možné previesť chromatografiu v dvoch krokoch, tj. anexovú a katexovú chromatografiu, ktoré nie sú zapojené do série. Prevedenie chromatografie v dvoch krokoch je ale, ako je spomínané vyššie, pracnejšie v srovnaní s ionexovými chromatografiami, ktoré sú zapojené do série.

Je súčasne predpokladané, že vysoký stupeň čistoty, vysoký obsah IgG monomérov a dimérov a nízky obsah IgA v IVIG produkte, ktorý je predmetom vynálezu, sú čiastočne spôsobené použitím dvoch sériovo zapojených chromatografických kolón.

Ako bude známe osobám, ktoré poznajú obor, môžu byť ionexové živice založené na rôznych materiáloch s ohľadom na maticiu, rovnako tak ako na pripojené nabité skupiny. Následujúce

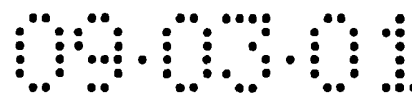


matrice môžu byť viacej alebo menej zosieťované: agaróza (ako napríklad Sepharose CL-6B<sup>®</sup> , Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> , a Sepharose High Performance<sup>®</sup> ), celulóza (ako napríklad DEAE Sephacel<sup>®</sup> ), dextrán (ako napríklad Sephadex<sup>®</sup> ) silika a syntetické polyméry. U anexovej živice môžu byť nabité skupiny, ktoré sú kovalentne pripojené k matrici napríklad dietylamoetyl (DEAE), kvartérny aminoetyl (QAE), a kvartérne amónium (Q). U katexovej živice môžu byť nabité skupiny, ktoré sú kovalentne pripojené k matrici napríklad karboxymetyl (CM), sulfopropyl (SP) a/alebo metyl sulfonát (S). V prednostnej forme predkladaného postupu je používanou anexovou živicom DEAE Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> , ale môžu byť použité aj iné anexové živice. Prednostná katexová živica je CM Sepharose Fast Flow<sup>®</sup> , ale môžu byť použité aj iné katexové živice.

Použitý príslušný objem živice po naplnení kolóny na ionexovú chromatografiu odráža rozmery kolóny, tj. priemer kolóny a výšku stĺpca, a líši sa v závislosti napríklad na množstve IgG v aplikovanom roztoku a na väzobnej kapacite použitej živice.

Pred prevedením ionexovej chromatografie je ionexová živica prednostne ekvilibrovaná pufrom, ktorý umožňuje väzbu protiiónov na živicu. Prednostne sú anexové a katexové živice ekvilibrované rovnakým pufrom, čo usnadňuje celý postup, pretože je treba pripraviť a použiť jeden pufor.

Pokiaľ napríklad je napríklad zvolenou anexovou živicom DEAE Sepharose FF<sup>(R)</sup> a katexovou živicom je CM Sepharose FF<sup>(R)</sup> a kolóny sú zapojené do série, sú potom kolóny s výhodou ekvilibrované nenedenaturujúcim kyslým pufrom majúcim zhruba rovnaké pH a iónovú silu ako IgG roztok, ktorý má byť aplikovaný. Pre ekvilibráciu ionexovej kolóny je vhodný ktorýkoľvek z celého radu pufrov, napríklad octan sodný, fosforečnan sodný, tris(hydroxymetyl)amino-metán. Osoby, ktoré



poznajú obor, ocenia, že pre ekvilibračiu môžu byť použité čtené iné pufre, pokiaľ je pH a vodivosť zhruba rovnaká jako aplikovaný roztok IgG. Prednostným pufrom pre ekvilibračiu anexovej a katexovej kolóny, ak sú zapojené zapojené do série, je sodno acetátový pufor s koncentráciou octanu sodného v rozmedzí 5-25 mM, ako napríklad v rozmedzí 10-20 mM, prednostne okolo 15 mM. Je preferované, aby pH sodno acetátového pufu používaného pre ekvilibračiu bolo v rozmedzí od 5,0 až do 6,0 , ako napríklad od 5,4 do 5,9, prednostne okolo 5,7. Vodivosť je v rozmedzí 1,0 -1,4 mS/cm, prednostne okolo 1,2 mS/cm. Vhodné acetátové pufre môžu byť pripravené z trihydrátu octanu sodného a z ľadovej kyseliny octovej.

Pred aplikáciou prečisteného voliteľne zfiltrovaného supernatantu obsahujúceho IgG na ionexovú kolónu sú koncentrácie pufu a pH uvedeného supernatantu prednostne upravené, pokiaľ je to nutné, na hodnoty významne ekvivalentnej koncentrácii a pH použitého ekvilibračného pufu.

Po aplikácii supernatantu obsahujúceho IgG na kolóny zapojené do série, sú tieto kolóny prednostne premyté (iniciálne premytie) jedným objemom kolóny premývacieho pufu za účelom zaistenia, že roztok obsahujúci IgG je kvantitatívne prenesený z anexovej kolóny na kolónu katexovú. Následne je odpojená anexová a katexová kolóna a katexová kolóna je prednostne premytá za účelom odstránení proteínových kontaminujúcich látok z kolóny za pomoci pufra majúceho pH a iónovú silu dostatočnú, aby došlo k významnej elúcii všetkých kontaminujúcich látok z katexovej kolóny bez spôsobenia významnej elúcie IgG.

Iniciálne premytie je s výhodou prevádzané pomocou ekvilibračného pufu, ačkoľvek môžu byť pre premytie použité

aj iné pufre o podobnej koncentrácii a pH. Pre vymytie kontaminujúcich látok je preferované použitie acetátového pufre. Hodnota pH pufre môže byť 5,0 až 6,0, ako napríklad v rozmedzí až 5,8, napríklad 5,4.

Elúcia IgG z katexovej živice je prednostne prevedená pomocou významnejšie nenedenaturujúceho pufre majúceho pH a iónovú silu dostatočnú k spôsobeniu účinnej elúcie IgG, čím dochádza k získaniu IgG obsahujúceho eluátu. V tomto kontexte značí účinná elúcia aspoň 75%, napríklad aspoň 80%, alebo lepšie 85% z IgG proteínov aplikovaných na anexovú a katexovú kolónu, ktoré sú zapojené do série, ktoré sú eluované z katexovej živice. Elúcia je s výhodou prevedená ako gradientový elučný krok. V postupe, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu je preferovaným použitým pufrom octan sodný majúci pH v rozmedzí 5,0-6,0, napríklad 5,2-5,8, prednostne okolo 5,4 a v koncentrácii v rozmedzí 5-40 mM, ako napríklad v rozmedzí 10-25 mM, prednostne okolo 15 mM.

Je preferované, aby koncentrácia solí elučného pufre bola dostatočne vysoká k vymytiu IgG zo živice. K elúcii IgG zo živice je ale predpokladané použitie vyššieho pH a nižšej koncentrácie solí. V prednostnej forme predkladaného postupu je elúcia prevádzaná ako kontinuálna gradientová elúcia s koncentráciami chloridu sodného v rozmedzí 50-500 mM, prednostne od zhruba 125 mM do zhruba 350 mM chloridu sodného.

Elúcia môže byť prevádzaná tiež krokovým gradientom. Je predpokladané, že elúcia môže byť prevádzaná tiež ako elúcia konštantnou koncentráciou solí, v ktorom elučný pufor aplikovaný na katexovú kolónu má iba jednu koncentráciu na rozdiel od gradientovej elúcie. Pokiaľ je prevádzaná elúcia konštantnou koncentráciou solí, môže byť táto koncentrácia

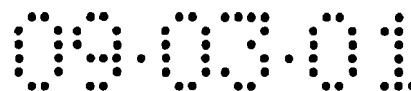


solí s výhodou v rozmedzí od zhruba 350 mM do zhruba 500mM chloridu sodného. Výhodou gradientovej elúcie v srovnaní s elúciou konštantnou koncentráciou solí je fakt, že elúcia je účinnejšia pri použití gradientu solí, a ďalšou výhodou je, že eluát má nižšiu iónovú silu, čo je výhodné, pretože vysoká iónová sila je kritická pre stabilitu IgG. Elučný pufor môže ďalej obsahovať látku stabilizujúcu bielkoviny, ako sú napríklad látky spomínané nižšie. Pre elúciu IgG môžu byť použité rôzne ďalšie pufrové systémy, čo bude ocenené osobami, ktoré poznajú obor.

K IgG frakcii je okamžite po elúcii alebo počas tejto elúcie prednostne aspoň jedna látka stabilizujúca bielkovinu. Látky stabilizujúce bielkoviny sú známe osobám poznajúcim obor a zahŕňajú napríklad rôzne cukorné alkoholy a sacharidy (ako sú napríklad sorbitol, manóza, glukóza, trealóza, maltóza), bielkoviny (ako sú napríklad albumín), aminokyseliny (ako je napríklad lyzín, glycín) a organické látky (ako je napríklad PEG). Zvolený intermediálny stabilizátor môže byť s výhodou taký, ktorý môže byť v následnom kroku odstránený z roztoku obsahujúceho IgG.

Vhodné koncentrácie proteín stabilizujúce látky v roztoku obsahujúcom IgG závisia na použitej špecifickej látke. V prednostnej forme vynálezu je stabilizačnou látkou sorbitol, prednostne vo finálej koncentrácii v rozmedzí 2-15% (w/v) sorbitolu, napríklad zhruba 2-5%.

Následne po elúcii z katexovej kolóny je eluát prednostne odsolený (tj. dialyzovaný) a s výhodou zakoncentrovaný. Zmena pufru a koncentrácie IgG môže byť prevádzaná kombináciou dia/ultrafiltračného postupu. Termín "dia/ultrafiltrácie" značí, že dialýza a zakoncentrovanie diafiltráciou a respektive ultrafiltráciou sú prevedené v jednom kroku. Je

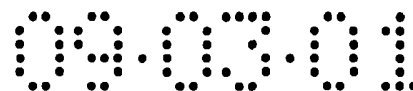


predpokladané, že diafiltrácia a ultrafiltrácia môžu byť prevedené ako dva oddelené kroky. Avšak za účelom zabránenia straty produktu je v súčasnosti preferované previesť dialýzu a zakoncentrovanie spôsobom diafiltrácie a ultrafiltrácie v jednom kroku.

Membrány použité pre dia/ultrafiltráciu majú s výhodou cutoff nominálne váhy v rozmedzí 10 000-100 000 Da. Prednostným typom membrány pre predkladaný postup je polysulfónová membrána s cutoff nominálnej váhy 30 000 Da od spoločnosti Millipore. Použité môžu byť aj iné ultrafiltračné membrány z porovnateľného materiálu a o rovnaké pórovitosti.

Rozsah koncentrácií sa môže významne líšiť. Roztok je zakoncentrovaný z pôvodnej koncentrácie 10 g/l na zhruba 100 g/l, prednostne na zhruba 50 g/l. Po zakoncentrovaní je koncentrát IgG s výhodou dializovaný proti pufru s nízkou iónovou silou. Okrem odstránenia iónov solí sú v tomto kroku z roztoku odstránené tiež kontaminujúce látky o nízkej molekulovej váhe a je umožnená výmena pufru pre ďalší purifikačný krok. Prednostným pufrom pre diafiltráciu je 15 mM octan sodný, pH 5,4, obsahujúci 2,5% (w/v) sorbitolu. Výmena pufru je prevádzaná až do zníženia vodivosti na hodnotu menšiu ako zhruba 1,5 mS/cm, prednostne na menej ako zhruba 1,3 mS/cm. Počas dia/ultrafiltrácie je pH prednostne udržiavané v rozmedzí 4,0-6,0, prednostne 5,1-5,7, najprednostnejšie zhruba 5,4.

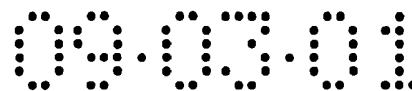
Po dia/ultrafiltrácii je s výhodou v roztoku upravená koncentrácia proteín stabilizujúcej látky, pokiaľ je to nutné, na finálnu optimálnu koncentráciu charakteristickú pre špecifickú použitú proteín stabilizujúcu látku. Pokiaľ je použitý sorbitol, je jeho koncentrácia upravená prednostne na zhruba 10 % váhovo.



Je preferované, aby bol za účelom odstránenia agregátov pred následným krokom stabilizovaný proteín zfiltrovaný pomocou filtra s priemerom pórov v rozmedzí 0,2-1,0 um, prednostne zhruba 0,45 um. V tomto štádiu má roztok obsahujúci IgG vzhľad číreho roztoku o príslušnom objeme o vysokej stabilite ako výsledok vysokej čistoty, nízkej iónovej sily, kyslého pH, relatívne vysokej koncentrácie IgG a pridanej stabilizačnej látky.

V postupe výroby IVIG produktu sú zahrnuté aspoň dva kroky definované a validované pre odstránenie a inaktiváciu vírusu. Týmto krokmi je prednostne precipitácia pomocou PEG ako obecného kroku k odstráneniu vírusu a S/D postup ako krok inaktivujúci vírusy s lipidovým obalom. Okrem prísnych požiadavkov na bezpečnosť východzieho materiálu vzhľadom k vírusom je podľa medzinárodných smerníc a podľa dobre známej kapacity veľanásobného purifikačného postupu nutné znižovať prítomnosť vírusov a zahrnutie dvoch nezávislých krokov znižujúcich prítomnosť vírusov, ktoré sú namierené proti obaleným aj neobaleným vírusom; liek podľa predkladaného vynálezu je z hľadiska prítomnosti vírusov významne bezpečný.

Infekčné vírusy s lipidovým obalom, ktoré môžu byť stále prítomné v roztoku obsahujúcom IgG, sú prednostne inaktivované v tomto štádiu postupom pridania virucídneho množstva látky inaktivujúcej vírusy do roztoku obsahujúceho IgG. Za "virucídne množstvo" látky inaktivujúcej vírusy je považované množstvo, ktoré vedie k vzniku roztoku, v ktorom sú vírusové častice významne neinfekčné a týmto je definovaný "roztok obsahujúci IgG bez prítomnosti vírusu". Toto "virucídne množstvo" závisí na použitej látke inaktivujúcej vírusy rovnako tak ako na podmienkach, ako je napríklad inkubačná doba, pH, teplota, obsah lipidov a koncentrácie bielkovín.



Termín "látka inaktivujúca vírusy" značí takú látku alebo spôsob, ktorý môže byť použitý za účelom inaktivácie vírusov s lipidovým obalom rovnako tak ako vírusov bez lipidového obalu. Termín "látka inaktivujúca vírusy" zahŕňa podľa vhodnosti kombináciu takých látok a/alebo spôsobov, rovnako tak ako iba použitie iba jedného typu takej látky alebo spôsobu.

- Prednostnými látkami inaktivujúce vírusy sú detergenty a/alebo rozpúšťadlá, najprednostnejšie zmesi detergent/rozpúšťadlo. Malo by sa poznať, že látka inaktivujúca vírusy je voliteľne zmesou jedného alebo viacerých detergentov s jedným alebo viacerými rozpúšťadlami. Inaktivácia pomocou rozpúšťadla/detergentu (S/D) je bežne používaný krok pre inaktiváciu vírusov s lipidovým obalom (napr. HIV1 a HIV2, vírus hepatitídy C a hepatitídy non A, non B a non C, HTLV1 a 2, herpetické vírusy, vrátane CMV a vírusu Ebstein Barrovej) v krvných produktoch. Pre inaktiváciu vírusov môže byť použitý celý rad detergentov a rozpúšťadiel. Detergent môže byť vybraný zo skupiny tvorenej neiónovými aj iónovými detergentami a mal by byť významne nenedenaturujúci. Prednostne je neiónový detergent používaný za účelom usnadnenia následnej eliminácie detergentu z IgG preparátu následným krokom. Vhodné detergenty sú popísané z IgG preparátu následným krokom. Vhodné detergenty sú popísané napríklad Shanbromem et al., v patentoch US Patent 4314997 a US Patent 4315919. Prednostnými detergenty sú detergenty predávané pod obchodným názvom Triton X-100 a Tween 80. Prednostnými rozpúšťadlami pre použitie látok inaktivujúcich vírusy sú di alebo trialkylsulfáty, ako je popísané napríklad Neurathom a Horowitzom v patente US Patent 476369. Prednostným rozpúšťadlom je tri(n-butylfosfát) (TNBP). Zvlášť prednostnou látkou inaktivujúcu vírusy pre použitie v predkladanom

vynálezu je zmes TNBP a Tween 80, ale alternatívne môžu byť použité aj iné kombinácie. Prednostná zmes je pridaná v takom objeme, že koncentrácia TNBP v roztoku obsahujúcom IgG je v rozmedzí 0,2-0,6% váhovo, prednostne zhruba 0,3% váhovo. Koncentrácia Tween 80 v roztoku obsahujúcom IgG je v rozmedzí 0,8-1,5 % váhovo, prednostne v koncentrácii zhruba 1% váhovo.

Krok inaktivácie vírusu je prevádzaný za podmienok vedúcich k inaktivácii vírusu, čo má za následok vznik roztoku významne bez prítomnosti vírusu. Tieto podmienky obecné zahŕňajú teplotu 4-30°C, ako napríklad 19-28°C, 23-27°C, prednostne okolo 25°C, a účinnou inkubačnou dobou zistenou z validačných štúdií. Obecné je dostatočná k zaisteniu dostatočnej inaktivácie vírusu v inkubačnej dobe 1-24 hodín, prednostne 4-12 hodín, ako napríklad okolo 6 hodín. Príslušné podmienky (teplota a inkubačné časy) však závisia na použitej látke inaktivujúcej vírusy, pH a koncentráciu bielkovín a obsahu lipidov v roztoku.

Je predpokladané, že za účelom prípravy produktu bez prítomnosti vírusu môžu byť použité aj iné spôsoby pre odstránenie a inaktiváciu vírusu, ako je napríklad prídanie metylénovej modrej s následnou inaktiváciou žiarením ultrafialovým svetlom alebo nanofiltráciou.

Po reakcii s rozpúšťadlom/detergentom, je roztokom s výhodou nariadený pomocou pufu. Roztok obsahujúci IgG významne bez prítomnosti vírusov je voliteľne zfiltrovaný, prednostne cez hĺbkový filter, ako je popísané vyššie v predošlom kroku predkladaného postupu a/alebo cez sterilný filter.

Po inaktivácii vírusu a prednostne aj filtrácii je prevedená ionexová chromatografia za účelom odstránenia látky inaktivujúcej vírusy a proteínových kontaminujúcich látok.

Tento krok je prednostne prevedený, ako je popísané vyššie v predkladanom postupe v predchádzajúcom kroku, pomocou ionexovej chromatografie s výnimkami, že objem anexovej kolóny je zhruba polovičný ako objem katexovej kolóny, a že premytie pred elúciou IgG je dôkladnejšie, a je použité aspoň šesť objemov pufru. Navyac v prednostnej forme vynálezu je ekvilibračným pufrom octan sodný o koncentrácii v rozmedzí zhruba 5-25mM, prednostne 15 mM, a pH v rozmedzí zhruba 5,0-5,8, prednostne 5,4. Ako je spomínané vyššie, obsah octanu sodného a pH roztoku obsahujúceho IgG sú prednostne upravené na rovnakú koncentráciu a pH, ako má ekvilibračný pufor. Navyac v prednostnej forme vynálezu je pridaná k získanému eluátu látka stabilizujúca bielkovinu, prednostne maltóza, vo finálnej koncentrácii v rozmedzí 1-5%, prednostne zhruba 2,5% váhovo.

Prednostným spôsobom eliminácie látky inaktivujúcej vírusy je ionexová chromatografia. Avšak za užitočné sú považované aj iné metódy, ako je napríklad olejová extrakcia a alternatívne chromatografické metódy. Príslušný spôsob závisí na použitej látke inaktivujúcej vírusy. Odstránenie rozpúšťadla/detergentu môže byť teda dosiahnuté vazbou IgG k živici a následne vymytím inaktivujúcej látky pufrom. Vhodnou metódou je katexová chromatografia. V prednostnej forme predkladaného vynálezu je navyac ku katexovej chromatografii prevádzaná tiež chromatografia anexová za účelom zlepšenia kvality a celkovej čistoty finálneho produktu predkladaného postupu.

Po ionexovej chromatografii je eluát obsahujúci IgG prednostne oddialyzovaný a zakoncentrovaný, čím je účinne znížený obsah ostávajúcich bielkovinných komponentov. Toto môže byť s výhodou prevedené dia/ultrafiltráciou, ako je popísané vyššie. Pufrom použitým pre diafiltráciu je octan sodný, prednostne v koncentrácii od zhruba 4 do 10 mM, prednostne 7,5

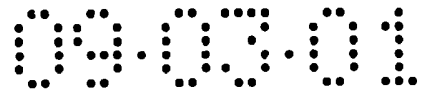
mM, a pH v rozmedzí od zhruba 4,0 do 6,0, prednostnostne zhruba 5,1-5,7, ako napríklad 5,4. Alternatívne môžu byť použité pre diafiltráciu aj iné pufre, ako je napríklad fosforečnan sodný alebo kyseliny. V diafiltrácii je pokračované, dokiaľ vodivosť je menšia alebo rovná 1 mS/cm. Roztok obsahujúci IgG je voliteľne ďalej sterilne zfiltrovaný.

Pokiaľ je to požadované, je purifikovaný roztok obsahujúci roztok IgG, ktorý je významne zbavený látky inaktivujúcej vírusy, podrobený ďalším postupom za účelom vytvorenia vhodného preparátu vo forme tekutého produktu, ktorý môže byť použitý napríklad intravenózne, subkutánne, alebo intramuskulárne.

Z praktického pohľadu je preferované, aby obsah tekutého preparátu imunoglobulínového produktu bol rovnaký pre skladovanie aj pre použitie. Finálna koncentrácia IgG v produkte je prednostne v rozmedzí 0,25-20% váhovo (čo odpovedá 2,5-200 g IgG/l), ako napríklad 1-20% váhovo, tj. 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%.

Je známe, že vysoká koncentrácia bielkovín vedie k vyššej stabilite IgG. Na druhú stranu vysoké koncentrácie IgG značia, že maximálna infúzna rýchlosť pri podaní IgG pacientovi intravenózne musí byť pomerne nízka, aby boli vylúčené transfúzne problémy vyplývajúce z vysokého osmotického tlaku produktu. V súčasnosti doporučovaná koncentrácia pre intravenózne podanie podľa Európskeho Liekopisu (Ph. Eur.) je 5% (w/v). Na druhú stranu koncentrovaný produkt (napríklad 10% a viacej) je výhodný pre intramuskulárne alebo subkutánne podanie.

Ačkoľvek to nie je preferované, je zrejmé, že môžu byť tiež použité aj produkty, ktoré možno získať rôznymi krokmi,



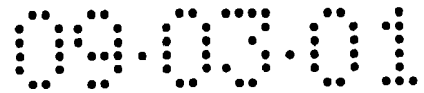
napríklad lyofilizované produkty namiesto tekutých produktov, ačkoľvek tieto produkty sú menej výhodné ako použitie imunoglobulínových produktov vo forme pripravených tekutých preparátov. Druhá forma bude detailnejšie popísaná v nasledujúcom.

Tekuté imunoglobulínové produkty sú najstabilnejšie pri iónovej sile významne nižšej ako je iónová sila plazmy, tj. vodivosť je prednostne nižšia ako 1,0 mS/cm, prednostne okolo 0,8 mS/cm.

Hodnota pH má vplyv na stabilitu IgG a na rýchlosť infúzie. Tekuté imunoglobulínové produkty sú najstabilnejšie za kyslých podmienok, tj. pod izoelektrickým bodom IgG, pri pH 6,4-8,5. Čím viac sa blíži hodnota pH hodnote fyziologického pH (7,1-7,3), tým vyššia infúzna rýchlosť môže byť použitá. V dôsledku požadovanej stability bude pH imunoglobulínového produktu, ktorý je predmetom vynálezu, prednostne v rozmedzí 5,1-5,7, ako napríklad medzi 5,2 a 5,6, ako napríklad okolo 5,4.

Imunoglobulínový produkt môže ďalej obsahovať látky stabilizujúce bielkoviny, ako je popísané vyššie. Navyše môžu byť ako stabilizačné látky použité tiež cukorné alkoholy a sacharidy (ako napríklad sorbitol, manóza, glukóza, trealóza, maltóza), tiež proteíny (ako napríklad albumín), aminokyseliny (ako napríklad lyzín, glycín) a organické látky (ako napríklad PEG a Tween 80). Vhodné koncentrácie stabilizačných látok v roztoku obsahujúcom IgG závisí na použitej špecifickej látke, ako je popísané vyššie.

Purifikovaný roztok IgG je, pokiaľ je to požadované, upravený, aby sa získal stabilný a izotonický roztok. Termín "izotonický roztok" značí, že roztok má rovnaký osmotický tlak ako plazma. Ako je zmienené vyššie, je iónová sila imunoglobulínového



produktu, ktorý je predmetom vynálezu, a ktorý je v tekutej forme, významne nižší, ako je iónová sila v plazme. Z tohoto dôvodu je preferované, aby boli ke zvýšeniu osmolality roztoku použité mono a disacharidy, pretože nezvyšujú iónovú silu. V prednostnej forme predkladaného vynálezu je pridaná maltóza v koncentrácii zaistujúcej, že roztok je izotonický. Maltóza súčasne funguje ako látka stabilizujúca imunoglobulíny. Toto je prednostne prevedené pridaním maltózy, aby finálna koncentrácia bola v rozmedzí pridaním zhruba 5% až 15% (w/v), prednostne 10% (w/v). Alternatívne môžu byť použité aj iné sacharidy, ako je napríklad manóza a glukóza.

Prednostné finálne podmienky imunoglobulínového produktu sú kompromisom medzi stabilitou a fyziologicky prijateľnými podmienkami s ohľadom na napríklad pH, iónovú silu a tonicitu. Imunoglobulínový roztok musí navyše spĺňať požiadavky testov kontrolujúcich kvalitu, ako je špecifikované v Monografii č. 918, Európsky Liekopis, 1997.

Hlavnými výhodami produktu získaného spôsobom, ktorý je predmetom vynálezu je fakt, že pokiaľ je produkt formulovaný v tekutom preparáte, je pripravený k okamžitému použitiu, kedy produkt je súčasne veľmi stabilný, vysoko purifikovaný, má zhruba normálne zastúpenie podtried IgG a má extrémne nízky obsah IgA rovnako tak, ako IgM, a protilátkové a biologické aktivity preukázané Fc funkciami.

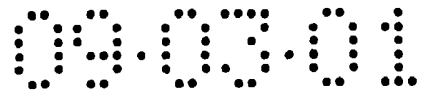
Navyše neobsahuje prakticky žiadne agregáty imunoglobulínov a/alebo iných plazmatických bielkovín meraných ako polyméry vyššie ako diméry, a má nízku antikomplementárnu aktivitu a má veľmi vysoký obsah IgG monomérov a dimérov. Monomérne IgG tvoria aspoň 90%, čo je považované ako ideálne. V dôsledku vysokej stability je možné zamedziť pridávaním stabilizačných látok, ako je napríklad albumín, glycín, detergenty alebo PEG.



Produkt je konečne zbavený vírusov, pretože postup zahŕňa použitie dobre definovaných a validovaných krokov znižujúcich prítomnosť vírusov, ktoré sú zamerané na odstránenie a/alebo inaktiváciu vírusov s lipidovým obalom aj vírusov bez lipidového obalu.

Cieľom validácie kroku znižujúceho prítomnosť vírusov v príprave produktu je zaistiť dôkaz, že postup výroby vedie k účinnej inaktivácii/odstráneniu vírusov, o ktorých je známe, že kontaminujú východzí materiál, alebo ktoré by mohli tento materiál kontaminovať. Validačné štúdiá zahŕňajú opatrné pridanie vírusu zahájením krokov prípravy produktu, ktoré majú byť validované a meranie rozsahu odstránenia/inaktivácie vírusu po ukončení kroku alebo krokov prípravy produktu. GMP obmedzenie zabraňuje vírusovej kontaminácii zariadení používaných pri príprave produktu. GMP obmedzenie zabraňuje vírusovej kontaminácii zariadení používaných pri príprave. Preto by validácia mala byť prevádzaná v oddelenom laboratóriu vybavenom pre virologické práce v zmenšenom merítke pôvodného postupu a prevádzaná personálom so skúsenosťami vo virológii spoločne s inžiniermi zameranými na prípravu produktu. Množstvo vírusu pridaného k východzemu materiálu zamýšľaného k použitiu v krokoch prípravy produktu, ktoré majú byť validované, by malo byť čo najväčšie, aby bolo možno určiť kapacitu skúmaného kroku prípravy dostatočne inaktivovať/odstraňovať vírusy. Avšak vírus by mal byť pridaný v takom množstve, aby nebolo významne narušené zloženie výrobného materiálu. Objem vzorky, ktorý obsahuje vírus by mal byť prednostne rovnaký alebo nižší ako 10%.

Kvantitatívne stanovenie bezinfekčnosti by malo byť prevedené podľa princípov GLP a môže zahŕňať tvorbu plakov, detekciu ďalších cytopatických efektov, ako sú napríklad syncýtia alebo tvorba ložisiek, konečnú titráciu (napr. stanovenie TCID<sub>50</sub>),



detekciu syntézy vírusových antigénov, alebo ďalšie spôsoby. Tieto spôsoby by mali mať dostatočnú citlivosť a reprodukovateľnosť, a mali by byť prevádzané v dostatočnom opakovaní a kontrolách, aby bola zaistená dostatočná statistická presnosť výsledkov.

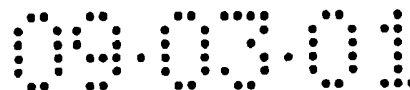
Krok prípravy produktu je typicky podnietený množstvom 6 log vírusu, a pokiaľ je získané zníženie v rádu 4 log alebo viacej, ukazuje to na jasný efekt zníženia konkrétneho testovaného vírusu, ktorý je predmetom skúmania. Podobne zníženie v rádu 4,5 log, 5 log alebo dokonca 5,5 log indikuje jasný efekt zníženia konkrétneho testovaného vírusu, ktorý je predmetom skúmania, a tento krok môže byť klasifikovaný ako validový krok vedúci k zníženiu prítomnosti vírusu.

Vírusové validačné štúdiá by mali byť prevádzané s vírusy napodobujúcimi vírusy, ktoré kontaminujú produkt, tak tesne, ako je to jen možné, a za druhé by mali reprezentovať čo najširšie rozmedzie fyzikálne-chemických vlastností za účelom otestovania obecné schopnosti systému eliminovať vírusy.

Vírusové validačné štúdiá by mali byť prevádzané v zhode s CPMP smernicou pre vírusové validačné štúdiá: The Design, Contribution and Interpretation of Studies Validating the Inactivation and Removal of Viruses (CPMP/BWP/268/95) a smernicou pre medicínálne produkty derivované z plazmy (CPMP/BWP/269/95).

Validačné štúdiá, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu sú prezentované v príkladu 5.

Produkt, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu má viacej jako 95% čistotu, prednostne viacej jako 98%. Vysoký stupeň čistoty je, *inter alia*, spôsobený faktom, že produkt, ktorý je

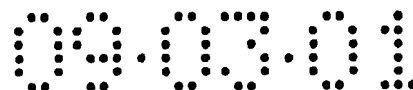


predmetom predkladaného vynálezu, je získaný aspoň jedným, prednostne dvoma, voliteľne sériovo zapojenými krokmi anexovej-katexovej chromatografie. V tomto kontexte stojí za zmienku, že bolo možné získať vysoký výťažok napriek veľkému počtu použitých krokov postupu prípravy, vo výrobnom merítku aspoň 3,5 g IgG proteínu na kg čerstvej zmrazenej plazmy.

Srovnávacie štúdia, ktoré boli prevedené (Príklad 2), preukázali, že imunoglobulínový produkt, ktorý je možno získať postupom podľa vynálezu, má ideálne funkčné vlastnosti, ako sú napríklad výrazné väzobné aktivity vôči antigénu a vysoká Fc funkcia. Predkladaný prednostný liek vyvinutý predkladajúcimi vynálezcami je váhovo 5% roztokom imunoglobulínov. Testy stability doposiaľ preukázali stabilitu pri skladovaní pri 4°C po dobu viacej ako jeden rok, tzn. že imunoglobulínový produkt nevytvára agregáty a ani nedochádza k fragmentácii imunoglobulínov G, ku strate požadovanej biologickej aktivity, aleboku zvýšeniu nežiadúcich aktivít, napr. antikomplementárne aktivity a preklikreínové aktivity, ako je zamerané *in vitro*.

Na základe predkladaného vynálezu je možné získať IgG produkt, ktorý má viacej ako 95%, ako napríklad aspoň 96%, alebo aspoň 97%, napríklad aspoň 98%, prednostne aspoň 99%, najprednostnejšie aspoň 99,5% čistotu. IgG produkt by mal obsahovať menej ako 6 mg IgA/1, ako napríklad menej ako 4 mg IgA/1, prednostne menej ako 3 mg IgA/1, najprednostnejšie menej ako 2 mg IgA/1.

Malo by byť zdôraznené, že iné produkty obsahujú stabilizačné látky vo forme detergentov, PEG alebo albumínu. V prednostnej forme vynálezu neobsahuje produkt, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, žiadnu zo spomínaných stabilizačných látok, namiesto nich bol zvolený dobre tolerovaný sacharid.



Produkt, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu má ako jednu zo svojích charakteristík veľmi nízky obsah polymérov a agregátov. V prednostnej forme vynálezu obsahuje produkt, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu menej ako 1,5% polymérov a agregátov, ako napríklad menej ako 1%, napríklad menej ako 0,5%, alebo menej ako 0,25% polymérov a agregátov. Obsah IgG monomérov a dimérov je aspoň 95%, ako napríklad aspoň 96% alebo aspoň 97%, napríklad aspoň 98%, prednostne 98,5%, alebo 99%. Obsah monoméreného IgG v produkte je aspoň 90%.

Klinické štúdiá preukázali klinický efekt produktu, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, ktorého efekt je porovnateľný s registrovanými IVIG produktami. Produkt bol veľmi dobre tolerovaný pacientami a obrat imunoglobulínov v cirkulácii bol určený na štyri týždne. V predkladaných klinických štúdiách bol presvedčivo preukázaný imunomodulačný efekt IVIG, SSI (dáta sú prezentovaná v príklade 3).

Indikáciami pre IVIG sú primárne hypo/agamaglobulinémie zahŕňajúci bežnú variabilnú imunodeficienciu, Wiskott-Aldrichov syndróm a ťažká kombinovaná imunodeficiencia (SCID), sekundárna hypo/agamaglobulinémia u pacientov s chronickou lymfatickou leukémiou (CLL) a veľanásobným myelómom, deti s AIDS a bakteriálnymi infekciami, akútna a chronická idiopatická trombocytopenická purpúra (ITP), alogénna transplantácia kostnej drene (BMT), Kawasakiho choroba a syndróm Guillan-Barré.

Neurológia: Chronická zápalová demyelizačná polyneuropatia (CIDP), multifokálna motorická neuropatia, roztrúsená skleróza, myasténia gravis, Eaton-Lambertov syndróm, neuritída optika, epilepsia.

Gynekológia: Habitualne potraty, primárny antifosfolipidový syndróm.

Revmatológia: Revmatoídna artritída, systémový lupus erytematosus, systémová sklerodermia, vaskulitída, Wegenerova granulomatóza, Sjögrenov syndróm, juvenilna revmatoídna artritída.

Hematológia: Autoimúnna neutropénia, autoimúnna hemolytická anémia, neutropénia.

Gastrointestinálna: Crohnova choroba, ulcerózna kolitída, coeliakia.

Ďalšie: Astma, syndróm septického šoku, chronický únavový syndróm, psoriáza, syndróm toxického šoku, diabetes, sinuzítis, dilatčná kardiomyopatia, endokardítis, ateroskleróza, dospelí s AIDS a bakteriálnymi infekciami.

Okrem spomínaných indikácií pre liečbu pomocou IVIG produktov je považované niekoľko závažných autoimúnnych ochorení, ktorá bežne odpovedajú na kortikosteroídnu a imunopresívnu liečbu, za cieľové ochorenie pre liečbu produktom, ktorý je predmetom oredkladaného vynálezu. Medzi tieto patrí niekoľko neurologických ochorení, ako je napríklad polyradikuloneurítis a niektoré imunitne podmienené periférne polyneuropatie, ale tiež niektoré chronické zápalové revmatické a vaskulárne ochorenia, ako je napríklad systémová vaskulitída postihujúca malé cievy, polymyozitída a ďalší.

Odlíšnym spôsobom účinku produktu, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu môže byť eliminácia infekčných antigénov u chronických infekcií a zvýšenie metabolismu IgG.

Vynález je ďalej ilustrovaný nasledujúcimi príkladmi, ktoré nie sú myslené ako obmedzujúce.

#### Príklady prevedenia vynálezu

##### **Príklad 1**



Výrobné kroky purifikácie imunoglobulínu (s výnimkou kroku 5 sú všetky kroky prevádzané pri teplote  $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ )

#### Krok 1: Príprava Cohnovy frakcie II + III vo forme pasty

Pasta tvorená Cohnovou frakciou II + III je pripravená z ľudskej plazmy štandardným spôsobom Cohnovy frakcionácie (Cohn E., et al., (1946) J Am Chem Soc, 459-475) podľa modifikácie Kistler-Nitschmanna (Kistler P a Nitschmann HS, (1952), Vox Sang, 7, 414-424). Po odstránení kryoprecipitátu, pokiaľ je požadované, aj po adsorpcii určitých plazmatických proteínov (ako napríklad Faktoru IX a antitrombínu) na napríklad ionexový materiál a/alebo matrici, ktorá je tvorená Heparin Sepharosou ®, je zahájená etanolová precipitácia.

Presné podmienky (pH, koncentrácie etanolu, teplota, koncentrácia bielkoviny) pre získanie pasty tvorenej frakciou II -III sú uvedené na obrázku na strane 266 v publikácii Harns JR (ed), Blood Separation and Plasma Fractionation, Wiley-Liss, New York, 1991. Pasta je izolovaná filtráciou pretlačením cez filter.

#### Krok 2: Extrakcia imunoglobulínov z pasty tvorenej Cohnovou frakciou II + III:

Zo 140 kg pasty tvorenej frakciou II + III zahŕňajúcej 30 kg filtrátu (Schenk, Nemecko) (odpovedá východnemu objemu plazmy okolo 1150 kg) je extrakcie dosiahnuté poprvé pridaním 525 kg 2,33 mM sodnofosfátového/acetátového pufru, pH 4,0 pri pomalom miešaní po dobu 1,5 hodiny, s následným po sebe idúcom dvojom pridaní 350 kg vody pre injekcie (WFI) s miešaním po dobu 1,5 hodiny po každom pridaní. Nakoniec je pridané okolo 280 kg 21,5 mM sodnofosfátového/acetátového pufru, pH 7,0, čím dôjde k úprave pH suspenzie na hodnotu 5,4.

Suspenzia je zfiltrovaná cez hĺbkový filter (C-150AF, Schenk, Nemecko). Filtrát obsahuje okrem iných bielkovín imunoglobulíny.

Krok 3: Precipitácia agregátov bielkovín a odstránenie vírusov pomocou PEG 6000:

K filtrátu z kroku 2 je pridaný PEG 6000 (Merck, Nemecko) do finálnej koncentrácie 6% váhovo. Po štvorhodínovej precipitácii je PEG suspenzia zcentrifugovaná v prietokovej centrifúge (Westfalia BKA28, Nemecko) za účelom získania číreho supernatantu a zfiltrovaná cez hĺbkový filter (50LA a 90LA, Cuno, Francie) a následne sterilne zfiltrovaná cez 0,22 um filter (Durapore, Millipore, USA). Hodnota pH zfiltrovaného PEG supernatantu je upravená pufrom pridaním 1 dielu 0,45 M sodnoacetátového pufru, pH 5,7, k 29 dielom supernatantu, čo vedie k dosaženiu pH 5,7.

Krok 4: Purifikácia anexovou a katexovou chromatografiou zapojených do série (I):

Dve chromatografické kolóny sú naplnené 56 l DEAE Sepharosy FF® (Pharmacia, Biotech, Švédsko) a 56 l CM Sepharosy FF® (Pharmacia, Biotech, Švédsko). Kolóny sú zapojené do série, a preto tekutiny pretiekajú najprv cez DEAE Sepharosu a následne cez CM Sepharosu. Sorbenty sú ekvilibrovabé 15mM sodnoacetátovým pufrom, pH 5,7. Potom je na tieto dve kolóny zapojených do série nanosený roztok z kroku 3.

Počas ionexovej chromatografie sa väčšina kontaminujúcich bielkovín z nanoseného vzorku viaže na DEAE Sepharosu. Zatiaľ čo IgG pretieka DEAE Sepharosou bez väzby na tento sorbent, v priebehu chromatografie na CM Sepharose dochádza k väzbe IgG. Po nanosení roztoku a po premytí jedným objemom kolóny ekvilibračného pufru je DEAE kolóna odpojená od CM kolóny. Potom je CM kolóna premytá tromi objemy 15 mM sodnoacetátového

puftru, pH 5,4 a potom je IgG eluované pomocou gradiendu NaCl od 125 mM do 350 mM, v 15 mM sodnoacetátovom puftru, pH 5,4. Eluovaná IgG frakcia je zbieraná do sorbitolu o finálnej koncentrácii 2,5% váhovo.

Krok 4: Podrobenie IgG frakcie postupu rozpúšťadlo/detergent (S/D):

Eluovaná IgG frakcia je zakoncentrovaná a odsolená ultra/diafiltráciou na koncentráciu približne 50 g IgG/liter. Použitou membránou je polysulfónová membrána, cutoff nominálne váhy 30 kDa (Millipore). Diafiltrácia je prevedená proti 15 mM sodnoacetátovému puftru, pH 5,4, obsahujúcim 2,5% váhovo sorbitolu, a v diafiltrácii je pokračované až do dosaženia vodivosti menšej ako 1,4 mS/cm. Obsah IgG v roztoku je určený spektrofotometricky meraním pri 280 nm ( $A_{280}$ ). Koncentrácia sorbitolu je upravená na 10% váhovo a roztok je zfiltrovaný cez 0,45µm filter (Pall Corporation, UK). Potom sú pridané Tween 80 a TNBP do finálnej koncentrácie 1% a respektíve 0,3% váhovo pre následný postup S/D. S/D postup pokračuje po dobu aspoň 6 hodín pri teplote 25 °C.

Krok 6: Odstránenie S/D pomocou ionexovej chromatografie (II):

Dve do série zapojené kolóny naplnené 28l DEAE a 56 l CM Sepharosy FF sú ekvilibrované 15 mM acetátu sodného, pH 5,4. IgG frakcia podrobená postupu S/D z kroku 5 je nariedená 5 dielmi 15 mM acetátového puftru, pH 5,4, zfiltrovaná cez hĺbkový filter (Cuno 90LA), následne sterilne zfiltrovaná (Satobran, Sartorius) a nanosená na dve kolóny zapojené do série. Ionexová chromatografia a následná elúcia IgG z Cm kolóny sú prevedené presne tak, ako je popísané v kroku 4, s výnimkou, že Cm kolóna je výrazne premývaná 6 objemy puftru za účelom odstránenia látok z postupu S/D. Eluovaná IgG frakcia je zbieraná do maltózy (Merck, Nemecko) vo finálnej koncentrácii 2,5% váhovo.

Krok 7: Finálna koncentrácia a príprava imunoglobulínu pre intravenózne podanie:

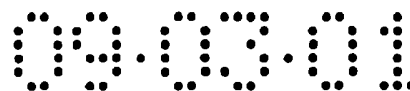
Eluovaná IgG frakcia z kroku 6 je podrobená ultrafiltrácii a odsoleniu diafiltráciou proti 7,5 mM acetátu sodnému obsahujúcom 2,5% váhovo maltózy, pH 5,4, až do dosaženia finálnej vodivosti menšej ako 1 mS/cm. Použitou membránou je polysulfónová membrána s cutoff nominálnej váhy 100 kDa, čo umožňuje elimináciu bielkovín s nižšou molekulovou váhou. Finálna koncentrácia IgG je upravená na 50 g/l a koncentrácia maltózy činia finálne 10% (w/v). Finálny preparát upravený maltózou je zfiltrovaný cez sterilný filter (Sartpure GF2, Sartorius) a asepticky naplnený.



## Príklad 2

Výsledky analytickej štúdie produktu získaného predkladaným postupom v srovnaní s inými produkty

|             | Gammonatív             | Octagam                | Gammagard              | IVIG, SSI              |
|-------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|             | Lyofilizovaný          | tekutý                 | lyofilizovaný          | tekutý                 |
| Čistota     | 45,4%                  | 99,1%                  | 94,6%                  | 99,8%                  |
| Albumín     | 50 mg/ml               | malé množstvo          | 3 mg/ml                | nedetekov.             |
| Obsah mono- |                        |                        |                        |                        |
| mérov + di  |                        |                        |                        |                        |
| mérov       | 98,3%                  | 96,8%                  | 97,6%                  | 99,3%                  |
| polyméry +  |                        |                        | menej ako              | menej ako              |
| agregáty    | 0,8%                   | 1,6%                   | 0,1%                   | 0,1%                   |
| ACA         | 26%                    | 30%                    | 34%                    | 32%                    |
| PAK         | menej ako 8,5<br>IE/ml | menej ako 8,5<br>IE/ml | menej ako 8,5<br>IE/ml | menej ako<br>8,5 IE/ml |
| Hemaglu-    |                        |                        |                        |                        |
| tinín,      |                        |                        |                        |                        |
| 3% roztok   |                        |                        |                        |                        |
| anti A      | negatívne              | negatívne              | negatívne              | negatívne              |
| viacej ako  |                        |                        |                        |                        |
| 1:2         |                        |                        |                        |                        |
| anti B      | negatívne              | negatívne              | negatívne              | negatívne              |
| viacej ako  |                        |                        |                        |                        |
| 1:2         |                        |                        |                        |                        |
| Fc funkcia  | 169%                   | 121%                   | 132%                   | 178%                   |
| Rozloženie  |                        |                        |                        |                        |
| podtried    |                        |                        |                        |                        |
| IgG1        | 60,0%                  | 61,9%                  | 67,7%                  | 56,6%                  |
| IgG2        | 35,8%                  | 33,1%                  | 27,2%                  | 39,4%                  |
| IgG3        | 3,5%                   | 3,6%                   | 4,4%                   | 2,6%                   |
| IgG4        | 0,7%                   | 1,4%                   | 0,6%                   | 1,5%                   |
| IgGA        | 2,96 mg/l              | 54,7 mg/l              | 0,85 mg/l              | 1,36 mg/l              |
| IgM         | 0,28 mg/l              | 39,1 mg/l              | 0,99 mg/l              | 0,16 mg/l              |
| Tween 80    | menej ako<br>20 ppm    | menej ako<br>20 ppm    | neurčené               | menej<br>ako 20 ppm    |
| TNBP        | 2,0 ppm                | 1,5 ppm                | 1,5 ppm                | 1,5 ppm                |
| PEG         | 0,01 mg/ml             | 0,01 mg/ml             | 1,6 mg/ml              | 0,02 mg/ml             |
| PH          | 6,7                    | 5,7                    | 6,7                    | 5,6                    |
| Koncen-     | 97 g/l                 | 45 g/l                 | 50 g/l                 | 51 g/l                 |



|                        |          |          |          |          |
|------------------------|----------|----------|----------|----------|
| trácia                 | 97 g/l   | 45 g/l   | 50 g/l   | 51 g/l   |
| celkovej<br>bielkoviny |          |          |          |          |
| Maltóza                | 20 mg/ml | 92 mg/ml | 15 mg/ml | 88 mg/ml |
| alebo<br>glukóza       |          |          |          |          |

1: bez korekcie na HSA; 2: deklarované výrobcom; 3: korigované na HSA; 4: použité ako stabilizačná látka

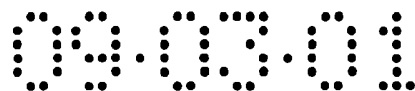
#### Čistota (bielkovinné zloženie)

Liekopisnými požiadavkami na čistotu preparátu IVIG je 95 % IgG, kedy nie je prítomné viacej ako 5% kontaminujúcich bielkovín. Čistota má veľký význam z niekoľkých dôvodov. Z racionálneho dôvodu by mala byť prítomná iba bielkovina, ktorá má požadovanú funkciu. Ostatné kontaminujúce bielkoviny môžu byť potenciálne škodlivé, napríklad môžu spôsobovať nechtiace nežiadúce účinky a/alebo ovplyvňovať stabilitu produktu.

Čistota môže byť analyzovaná napríklad pomocou aaelektroforetických techník, ako je detailne popísané v Európskom Liekopise, 1997, strany 964-965, kde sú bielkoviny separované na celulóza acetátovom gélu. Z praktických dôvodov je ale použitý gél agarózový. Po elektroforéze je gel fixovaný, vysušený a ofarbený. Bielkovinné prúžky sú nakoniec monitorované skenovaním. Z vyššie uvedenej tabuľky je zrejmé, že produkt, ktorý je predmetom vynálezu, je skutočne čistý (99,8%).

#### Albumín

Obsah albumínu bol analyzovaný skríženou imunoelktroforézou presne tak, ako je popísané C.B Laurellom (Anal Biochem (1965), 10, 358-361). Päť ul produktu bolo analyzované proti protilátkam proti ľudskému albumínu (DAKO A/S, Dánsko, č.A0001 (1/100)). Z dôvodov vysokej čistoty nebol v analyzovanom



produktu, ktorý je predmetom vynálezu, detekován žiadny albumín.

#### Obsah IgG monomérov a dimérov

Obsah monomérov a dimérov môže byť analyzovaný gelovou permeačnou chromatografiou a monitorovaný intergráciou plôch vrcholu monoméru a diméru z chromatogramu, cf. Ph. Eur. Výsledky z rôznych analýz sú vymenované vo vyššie uvedenej tabuľke a z týchto výsledkov vyplýva, že suma plôch monoméru a diméru tvorí 99,3 % celkovej plochy chromatogramu ( z čoho monomérený IgG tvorí 92%) pre produkt, ktorý je predmetom vynálezu.

#### Obsah polymérov a agregátov

O prítomnosti polymérov a agregátov je známe, že môže spôsobiť závažné nežiadúce účinky, často príznaky podobné príznakom chrípky. Z dôvodov veľmi vysokého stupňa čistoty dosiahnutého veľmi šetrným výrobným postupom neobsahuje imunoglobulínový produkt získaný postupom, ktorý je predmetom vynálezu, prakticky žiadne polyméry a agregáty.

Polyméry môžu byť analyzované gelovou permeačnou chromatografiou. Akýkoľvek bielkovinný vrchol s retenčným časom kratším ako je retenčný čas pre dimerický IgG je považovaný za polymérny, ako je popísané v Európskom Liekopise.

Podľa Európskeho Liekopisu a tiež iných smerníc by mal byť obsah bielkovinných agregátov prednostne nižší ako 3%. Produkt, ktorý je predmetom predkladaného postupu, neobsahuje merateľné agregáty a je tedy považovaný, že neobsahuje menej ako 0,1% polymérov a agregátov.

### Antikomplementárna aktivita (ACA) a aktivita prkalikreínového aktivátoru (PAK)

ACA PAK sú merané, ako je popísané v Európskom Liekopisu.

ACA by mala byť prednostne čo najnižšia. Podľa Európskeho Liekopisu by mala byť konzumpcia komplementu nižšia alebo rovná 50%. Konzumpcia komplementu meranej vzorky produktu, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu je okolo 30%. tj. hodnota srovnateľná s inými analyzovanými produktami. Malo by byť poznamenané, že prítomnosť albumínu má tendenciu potlačovať konzumpciu komplementu (pozorovanie vynálezcov).

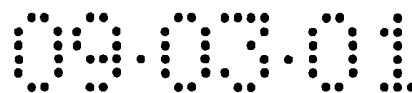
PAK, pokiaľ je prítomná vo významnom množstve, je podkladom nežiadúcim hypotenzívnym účinkom produktu. Z tohto dôvodu by mala byť PAK v imunoglobulínovom produkte prednostne čo najnižšia. Podľa Európskeho Liekopisu by mala byť pod 35 IU/ml, pokiaľ je meraná spôsobom popísaným v tomto dokumente. PAK produktu, ktorý je predmetom vynálezu, rovnako tak ako ostatných analyzovaných produktov je menšia, ako je hladina kvantitatívnej detekcie metód, tj. pod 8,5/ml.

### Hemaglutiníny

IgM frakcie plazmatických imunoglobulínov zahŕňa hemaglutiníny, čo sú protilátky proti krvným antigénom typu A a B. Pokiaľ má príjemca krvi typu A a B môže prítomnosť takých protilátok spôsobiť nechtiace nežiadúce účinky v dôsledku možnej hemolytickej reakcie.

Podľa požiadavkov Liekopisu musí byť obsah hemaglutinínov nižší ako množstvo spôsobujúce hemaglutináciu A/B erytrocytov v pomere imunoglobulínového produktu 1:64. Všetky analyzované produkty spĺňajú tento požiadavok.

### Fc funkcia



Zachované aktivity väzby antigénu sú nezbytné pre biologické funkcie IVIG. Toto platí tiež pre imunomodulačné aktivity. Na druhú stranu je zachovaná Fc funkcia nezbytná pre účinok IVIG na rôzne fagocytujúce bunky a pre aktiváciu komplementového systému. Fc funkcia môže byť demonstrovaná za použitia rôznych techník, ale akceptovaná metodika popísaná v Európskom Liekopise merí potenciál protilátok aktivovať komplement v preparáte proti antigénu šarlachu. Aktivita je porovnaná s aktivitou referenčného preparátu (BRP, Európsky Liekopis) imunoglobulínov nastaveného na 100%. Produkt spĺňa test, pokiaľ je relatívna aktivita vyššia ako 60% referenčného preparátu. Zdá sa, že Fc funkcia produktu, ktorý je predmetom vynálezu, je veľmi dobre zachovaná, najmä v srovnaní s ďalším analyzovaným tekutým produktom, najpravdepodobnejšie v dôsledku šetriaceho purifikačného postupu.

#### Rozloženie podtried

Rozloženie IgG podtried je merané štandardnou Manciniho imunodifúznou metódou presne tak, ako je popísané A. Ingildom (Scand J Immunol, (1983), 17, 41). Koncentrácie sú určené pomocou WHO referenčného séra (67/97). Je požadované, že rozloženie podtried by malo byť v rozmedzí normálnej ľudskej plazmy s mediánom koncentrácií v rozmedzí 3,7-10,2 g IgG1 séra, 1,1-5,9 g IgG2/1 séra, 0,15-1,3 g IgG3/1 séra a 0,06-1,9 g IgG4/1 séra (R. Djurup et al. Scand J Clin Lab Invest 48, 77-83). Z tohto dôvodu je rozloženie podtried vo všetkých produktoch prijateľné.

#### Obsah IgA

O prítomnosti IgA je známe, že môže potenciálne spôsobovať senzibilizáciu IgA deficientných príjemcov. Pokiaľ IgA deficientný príjemca obdrží imunoglobulínový preparát obsahujúci IgA, môže byť IgA považované za cudzí antigén a výsledkom môže byť u príjemca indukcia protilátok proti IgA.

Pokiaľ je preparát obsahujúci IgA aplikovaný infúziou druhýkrát, môže dôjsť k vyvolaniu anafylaktickej reakcie. Z tohto dôvodu je nezbytné, aby imunoglobulínový preparát obsahoval čo najnižšie množstvo IgA. IgA v IVIG produkte môže byť monitorovaný pomocou ELISA techniky, kde napríklad je k vyvážaniu IgA použitá polyklonálna protilátka anti-IgA a označená protilátka anti-IgA je použitá pre detekciu naviazaného IgA. Štandardy sú vytvorené riedením kalibrátoru (č. X908, DAKO A/S, Dánsko) s deklarovaným obsahom IgA.

Produkt postupu popísaného v Príklade 1 obsahuje menej ako 2 mg IgA/l, čo je znateľne menej ako je obsah IgA v ďalšom analyzovanom tekutom produkte. Fyzikálne-chemické podobnosti medzi IgG a IgA činia obtiažnym oddeliť od seba tieto imunoglobulíny počas purifikačného postupu. Avšak dva anexové/katexové chromatografické kroky znižujú obsah IgA na veľmi nízku úroveň.

#### Obsah IgM

IgM v imunoglobulínovom preparáte môže byť monitorované pomocou ELISA techniky, kde napríklad je k vyvážaniu IgM použitá polyklonálna protilátka anti-IgM a značená protilátka anti-IgM je použitá pre detekciu. Štandardy sú vytvorené riedením kalibrátora (č. X908, DAKO A/S, Dánsko) s deklarovaným obsahom IgM. Z tabuľky je patrné, že produkt, ktorý je predmetom vynálezu obsahuje veľmi nízke množstvo IgM a znateľne menej IgM ako je obsah IgM v ďalšom analyzovanom tekutom produkte.

#### Tween 80, TNBP a PEG

Tween 80, TNBP a PEG sú merané štandardnými postupmi. Obecne by mal byť obsah týchto aditívnych látok čo najnižší.

#### pH

pH analyzovaných tekutých produktov je kyslé, pH 5,6-5,7, zatiaľ čo analyzované lyofilizované produkty sú po rozpustení neutrálne s pH 6,7.

#### Celková koncentrácia bielkoviny

Podľa Európskeho Liekopisu by mala byť koncentrácia bielkoviny aspoň 50 g/l  $\pm$  10%; všetky produkty spĺňajú túto požiadavku. Koncentrácia bielkoviny je meraná metódou podľa Kjeldahla.

#### Stabilizačné látky maltóza a glukóza

Sacharidy sú bežne používané ako stabilizačné látky imunoglobulínových produktov, majú dobré stabilizačné vlastnosti a sú rýchlo vylúčené. Obsah maltózy, sacharózy a glukózy je určený pomocou komerčného kitu (Boehringer Mannheim, Nemecko) s maltózou ako referenčnou látkou.

Je zrejmé, že dva lyofilizované produkty stabilizované albumínom a albumín, rovnako tak jako PEG, tiež obsahujú sacharidovú stabilizačnú látku v koncentráciách od 15 mg/ml do 20 mg/ml. Produkt, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu a ďalší tekutý produkt sú veľmi podobne stabilizované, tj. obsahujú okolo 9%, 88 mg/ml a 92 mg/ml maltózy. Čo sa týka obsahov polymérov a agregátov ako parametrov stability, má produkt, ktorý je predmetom vynálezu väčšiu stabilitu ako druhý analyzovaný tekutý produkt, ačkoľvek sa ich zloženie javí ako veľmi podobné.

### **Príklad 3**

Výsledky klinických štúdií

Klinické štúdie s produktom, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu, ktorý je tiež nazývaný ako IVIG, SSI, sú prevádzané v zhode so smernicami ICH a CPMP/388/95.

Boli vyšetrované farmakokinetiká, účinok a bezpečnosť. Klinické štúdie dosiaľ zahŕňali štyri skupiny pacientov: pacientov so syndrómom primárnej imunodeficiencie (15 pacientov), pacientov so syndrómom sekundárnej imunodeficiencie (6 pacientov), pacienty s idiopatickou trombocytopenickou purpurou (15 pacientov) a pacientov s chronickou zápalovou demyelinizačnou polyneuropatiou (5 pacientov).

Pacienti so syndrómom primárnej a sekundárnej imunodeficiencie boli liečení 0,2-0,4 g/kg s intervalom 2-5 týždňami. Pacienti s idiopatickou trombocytopenickou purpurou boli liečení 400 mg/kg za deň po dobu 5 dní alebo 1000 mg/kg za deň po dobu 2 dní.

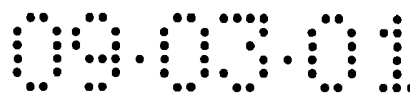
Ako parametre bezpečnosti boli stanovené u všetkých pacientov sérové transaminázy, sérový kreatinín a vírusové markery. U piatich pacientov s idiopatickou trombocytopenickou purpurou boli po dobu 24 mesiacov sledované vírusové markery a markery poškodenia ľadvín a pečene.

#### Farmakokinetika

$T_{1/2}$  bol zmeraný na 30,5 dňa (medián). To je v zhode s výsledky ďalších IVIG liekov.

#### Účinok

U pacientov so syndrómom primárnej a sekundárnej imunodeficiencie boli registrované retrospektívne pre 6-mesačné obdobie, v ktorom boli pacienti liečení inými registrovanými IVIG liekmi, dny chorobnosti, hospitalizácie, dny na antibiotickej terapii, dny s horúčkou a počet zápalov pľúc. V nasledujúcom 6-mesačnom období, v ktorom boli pacienti



liečeni tekutým imunoglobulínom SSI boli registrované rovnaké parametre. Záverom je, že tekutý imunoglobulín SSI je rovnako účinný v profylaxii/prevencii infekcií u pacientov so syndrómom primárnej a sekundárnej imunodeficiencie jako ďalší IVIG preparáty.

U 80% pacientov s idiopatickou trombocytopenickou purpurou došlo ke zvýšeniu počtu krvných doštičiek z menej ako  $30 \times 10^9/l$  pred liečbou tekutým imunoglobulínom SSI na viacej ako  $50 \times 10^9/l$  po liečbe. Zvýšenie počtu krvných doštičiek a trvanie remisie u individuálneho pacienta bolo v prípadoch, kedy bolo možné srovnanie, rovnaké ako po podaní rovnakej dávky iných IVIG preparátov. Jeden pacient, ktorý bol liečený IVIG poprvýkrát bol refraktórny na testovaný liek. Taká reakcia na IVIG nie je vzácna, a preto neprekvapuje. Analýza detailov vzostupu krvných doštičiek a trvanie tohto vzostupu prebieha.

Záverom je, že tekutý imunoglobulín SSI je rovnako účinný liečbe nízkeho počtu krvných doštičiek u pacientov s idiopatickou trombocytopenickou purpurou jako ďalší IVIG preparáty.

Podľa klinikov a pacientov trpiacich chronickou zápalovou demyelinizačnou polyneuropatiou sú IVIG SSI rovnako účinné ako IVIG podávané pred klinickou štúdiou. IVIG SSI boli pacientami tolerované rovnako dobre ako boli tolerované ďalšie IVIG produkty.

#### Bezpečnosť

Okrem jednej závažnej nežiadúcej udalosti, splenektómie, ktorá bola posúdená výskumným pracovníkom, že nemá vzťah k testovanému lieku, boli registrované iba mierne nežiadúce účinky. Týmito nežiadúcimi účinkami boli hlavne bolesti hlavy, horúčka a zvracenie. Doposiaľ neboli popísané počas infúznej

liečby IVIG SSI abnormálne vitálne znaky. Nebola registrovaná žiadna vírusová sérokonverzia. Nebolo hlásené žiadne poškodenie ľadvín alebo pečene, ani prípady anafylaktického šoku.

Klinické štúdiá preukázali, že tekutý IVIG SSI je dobre tolerovaný. Častosť vedľajších účinkov, stupeň a ich typ sa nelišili od skúseností s inými IVIG preparátmi.

#### Príklad 4

Výsledky stabilítnej štúdie pre tekutý IVIG

Za účelom testovania, či tekutý IVIG preparát je stabilný po dlhšiu dobu, bola prevedená štúdia na stabilitu tohto preparátu za reálnych podmienok v reálnom čase. V štúdiu bol použitý celkový počet štyroch po sebe idúcich šarží IVIG produktu (250 ml v každej vzorke), ktoré boli skladované pri teplote 2°C - 8°C po dobu 12 mesiacov. Vzorky zo štyroch šarží boli analyzované v čase 0, po 6 mesiacoch skladovania a po 12 mesiacoch skladovania. Výsledky štúdie sú uvedené nižšie ako priemery zo štyroch šarží.

|                            | 0 mesiacov skladovania           | 6 mesiacov skladovania          | 12 mesiacov skladovania          |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Vzhľad                     | mierne opalescentný a bezfarebný | mierne opalescentný a bafarebný | mierne opalescentný a bezfarebný |
| <b>Obsah</b>               |                                  |                                 |                                  |
| <b>Monomérov+</b>          |                                  |                                 |                                  |
| dimérov                    | 100%                             | 99,6%                           | 99,5%                            |
| <b>polyméry+</b>           |                                  |                                 |                                  |
| agregáty                   | menej ako 0,1%                   | menej ako 0,1%                  | menej ako 0,1%                   |
| ACA                        | 39,7%                            | 38,2%                           | 37,3%                            |
| PAK                        | menej ako 8,5 IE/ml              | menej ako 8,5 IE/ml             | menej ako 8,5 IE/ml              |
| <b>Rozloženie podtried</b> |                                  |                                 |                                  |
| IgG1                       | 59,2%                            | 57,7%                           | 57,1%                            |
| IgG2                       | 36,4%                            | 38,1%                           | 38,6%                            |

|              |             |             |             |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| IgG3         | 2,7%        | 2,6%        | 2,5%        |
| IgG4         | 1,8%        | 1,6%        | 1,7%        |
| pH           | 5,5         | 5,5         | 5,5         |
| <hr/>        |             |             |             |
| Zloženie     |             |             |             |
| bielkovín    |             |             |             |
| (%IgG)       | 99,8%       | 99,7%       | 99,1%       |
| <hr/>        |             |             |             |
| Celková      |             |             |             |
| koncentrácia |             |             |             |
| bielkovín    | 48,8 g/l    | 48,3 g/l    | 49,2 g/l    |
| Osmolalita   | 348 mOsm/kg | 347 mOsm/kg | 350 mOsm/kg |
| <hr/>        |             |             |             |

Všetky vyššie spomínané testy boli prevedené v zhode s Európskym Liekopisom, ako je uvedené v Príklade 2.

Pozorovanie, že obsah monomérov a dimérov je konštantný po dobu 12 mesiacov ukazuje, že vo vzorke nevznikajú polyméry. O prítomnosti imunoglobulínových polymérov je známe, že okrem iných spôsobujú závažne nežiadúce účinky, často príznaky podobné chrípke. Kvôli veľmi vysokej stabilite imunoglobulínového produktu získaného postupom, ktorý je predmetom vynálezu, neobsahuje produkt prakticky žiadne polyméry a agregáty dokonca ani po dlhšom čase skladovaní.

Po dobu sledovania nebolo pozorované zvýšenie ACA, ačkoľvek do tejto stabilnej štúdie boli úmyselne zahrnuté šarže s viacej vyššiou ACA. Pokiaľ bolo pozorované zvýšenie ACA, môže to ukazovať, že počas skladovania došlo k vytvoreniu agregátov. Preto konštantná ACA po dobu sledovania ukazuje, že nedošlo k tvorbe žiadnych agregátov.

Výsledky ďalej ukazujú, že počas sledovania produktu nedošlo k rozvoju prekalikreinovej aktivity, pretože sa PAK aktivita nezvýšila. Malo by však byť poznamenané, že zmerané hodnoty sú pod hladinou kvantitatívnej detekcie.

Parameter Fc funkcie ukazuje, že počas skladovania je zachovaná prítomnosť intaktných funkčných IgG. Z tohto dôvodu nie sú vo vzorkách prítomné proteázy, pretože proteázy by degradovali bielkoviny a tým znížili Fc funkciu. K denaturácii IgG molekúl nedošlo, pretože denaturácia by znížila aktivitu viazať antigén.

Ako bude zrejmé osobe znalej oboru, môžu existovať rozdiely v stabilite rôznych podtried IgG. Ako môže byť patrné z predložených výsledkov, sú počas skladovania zachované všetky podtriedy, čo ukazuje na to, že produkt je stabilný. To je ďalej podporené nálezom, že bielkovinné zloženie IgG vo vzorkách s približne rovnakou koncentráciou celkovej bielkoviny je takmer nezmenené po dobu sledovania, čo ukazuje, že nedochádza k degradácii IgG. To značí, že produkt, ktorý je predmetom predkladaného vynálezu je stabilný a môže byť skladovaný po dobu aspoň 12 mesiacov pri teplote 2-8°C bez zmien charakteristík, a týmto je demonstrovaná účinnosť a bezpečnosť.

#### **Príklad 5**

Validované kroky znižujúci prítomnosť vírusov v predkladanom postupe prípravy IVIG

#### Odstránenie vírusu oddeľovacím krokom

Precipitácia vírusu prítomného v imunoglobulínovom roztoku polyetylén glykolom.

Validačné štúdiá na prítomnosť vírusu boli prevedené za použitia dvoch neobalených vírusov a bolo získané nasledujúce zníženie prítomnosti vírusu:

odstránenie 6,3 log<sub>10</sub> vírusu hepatitídy A (HAV)

odstránenie 7,2 log<sub>10</sub> vírusu polyomyelitídy

Validačné štúdiá na prítomnosť vírusu boli prevedené za použitia dvoch obalených vírusov a bolo získané nasledujúce zníženie prítomnosti vírusov :

odstránenie 7,6 log<sub>10</sub> vírusu HIV

odstránenie 7,5 log<sub>10</sub> vírusu BVDV

#### Inaktivácia vírusu postupom S/D

Reakcia imunoglobulínového roztoku s 1% roztokom Tween 80 + 0,3% TNBP, pri teplote 25°C po dobu dlhšiu ako 6 hodín.

Validačné štúdiá na prítomnosť vírusu boli prevedené za použitia štyroch obalených vírusov a bolo získané nasledujúce zníženie prítomnosti vírusov:

inaktivácia 7,4 log<sub>10</sub> vírusu HIV

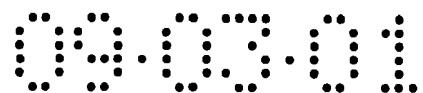
inaktivácia 5,3 log<sub>10</sub> vírusu Sindbis

inaktivácia 4,1 log<sub>10</sub> vírusu BVDV

inaktivácia 5,1 log<sub>10</sub> vírusu PRV

Celkom 8 validačných štúdií bolo prevedené na dvoch rôznych krokoch postupu, ktorý je predmetom predkladaného postupu. PEG precipitačný krok bol validovaný ako krok odstraňujúci vírusy za použitia 4 rôznych vírusov, dvoch malých neobalených vírusov, vírusu HAV a vírusu polimyelitídy, a dvoch obalených vírusov. Vírusu BVDV a vírusu hepatitídy C.

Tieto štúdiá preukázali, že všetky štyri vírusy boli účinne odstránené PEG precipitáciou. PEG precipitačný krok je preto validovaný ako krok účinne odstraňujúci vírusy. S/D postup bol validovaný za použitia 4 rôznych obalených vírusov. Z výsledkov validačných štúdií je zrejmé, že S/D postup účinne inaktivuje všetky štyri vírusy. S/D postup je preto validovaný ako krok účinne inaktivujúci vírusy. U oboch krokov znižujúcich prítomnosť vírusov v postupe prípravy IVIG, teda odstránení PEG precipitáciou a inaktivácie S/D postupom, bolo preukázané, že každý účinne odstraňuje a inaktivuje štyri rôzne vírusy. Kumulatívne faktory zníženia prítomnosti vírusu

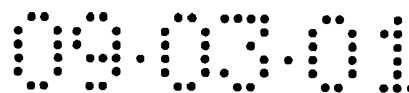


HIV a BVDV počas postupu sú 15, respektíve 11,6. Týmto môže byť predkladaný postup považovaný za bezpečný z hľadiska prítomnosti vírusov.

---

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Postup purifikácie imunoglobulínu G (IgG) z hrubej frakcie plazmatických bielkovín obsahujúcich imunoglobulíny, ktorý postup zahŕňa kroky:
  - a) prípravu vodnej suspenzie hrubej frakcie plazmatických bielkovín obsahujúcich imunoglobulíny
  - b) pridanie vo vode rozpustnej precipitačnej látky, ktorá významnejšie nespôsobuje denaturáciu bielkovín, k spomínanej suspenzii z kroku (a) v množstve dostatočnom k vyvolaniu precipitácie veľkej časti bielkovín nepatriacich k imunoglobulínu G, agregovaných imunoglobulínov a častíc zahŕňajúcich potenciálne infekčné častice, ako sú napríklad vírusové častice, bez spôsobenia významnejšie precipitácie monomérneho imunoglobulínu G, čím dochádza k tvorbe zmesi pevného precipitátu a tekutého supernatantu;
  - c) získanie prečisteného supernatantu obsahujúceho imunoglobulín G zo smesi z kroku (b);
  - d) aplikácia prečisteného supernatantu obsahujúceho imunoglobulín G z kroku (c) na anexovú živicu a následne na katexovú živicu, kde anexová a katexová živica sú zapojené do série, a kde použitý pufor pre anexovú aj katexovú chromatografiu je rovnaký, a pH spomínaného pufru je pod 6,0;
  - e) vymytie bielkovinných kontaminujúcich látok a bielkovinného precipitátu z katexovej živice z kroku (d) pomocou pufru majúceho pH a iónovú silu dostatočnú k odstráneniu kontaminujúcich látok zo živice bez spôsobenia významnejšie elúcie imunoglobulínu G;
  - f) elúcia imunoglobulínu G z katexovej živice z kroku (e) pomocou významnejšie nedenaturujúceho pufru majúceho pH a iónovú silu dostatočnú k spôsobeniu účinnej elúcie imunoglobulínu G, čím dochádza k získaniu eluátu, ktorý obsahuje imunoglobulín G;



- g) prevedenie dia/ultrafiltrácie eluátu obsahujúceho imunoglobulín G z kroku (f) za účelom koncentrácie a/alebo dialýzy eluátu, a voliteľne prídanie stabilizačnej látky;
  - h) prídanie viricídneho množstva látky inaktivujúceho vírusy k dia/ultrafiltrovanej a voliteľne stabilizovanej frakcie z kroku (g) obsahujúci imunoglobulín G, čo vedie k získaniu roztoku obsahujúceho imunoglobulín G, ktorý je významne bezpečný s ohľadom na prítomnosť vírusov;
  - i) aplikácia roztoku obsahujúceho imunoglobulín G z kroku (h) na anexovú a následne na katexovú živicu;
  - j) premytie katexovej živice z kroku (i) pomocou pufru majúceho pH a iónovú silu dostatočnú k vymytiu bielkovinných kontaminujúcich látok a látky inaktivujúce vírusy zo živice bez spôsobenia významejšie elúcie imunoglobulínu G;
  - k) elúcia imunoglobulínu G z katexovej živice z kroku (j) pomocou významejšie nenedenaturujúceho pufru majúceho pH a iónovú silu dostatočnú k spôsobeniu účinnej elúcie imunoglobulínu G, čím dochádza k získaniu eluátu obsahujúceho imunoglobulín G; a
  - l) podrobenie eluátu z kroku (k) dia/ultrafiltrácii za účelom zníženia iónovej sily a zakoncentrovania imunoglobulínu G v roztoku, a upravenie osmolality prídanim sacharidu.
2. Postup podľa patentového nároku 1, kde frakcia plazmatických bielkovín obsahujúca imunoglobulín G je vybraná zo skupiny tvorenej Cohnovou frakciou II; Cohnovými frakciami II a III; a Cohnovými frakciami I, II a III.
  3. Postup podľa patentových nárokov 1 a 2, kde suspenzia v kroku (a) je udržiavaná pri teplote od 0°C do 12°C a suspenzia v kroku (a) je udržiavaná pri pH pod 6,0.
  4. Postup podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich patentových nárokov, kde bielkovinná precipitačná látka v kroku (b) je

vybraná zo skupiny tvorenej polyetylén glykolom (PEG), kyselinou kaprylovou a síranom amónnym.

5. Postup podľa patentového nároku 4, kde bielkovinná precipitačná látka je vybraná zo skupiny tvorenej PEG v rozmedzí molekulových vah 3 000 - 8 000 Da, ako sú napríklad PEG 3 350, PEG 4 000, PEG 5 000 a PEG 6 000.
6. Postup podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich patentových nárokov, kde anexová a katexová živica v kroku (i) sú zapojené do série.
7. Postup podľa patentového nároku 6, kde použitý pufor pre anexovú a katexovú chromatografiu je rovnaký a pH spomínaného rovnakého pufru je pod 6,0.
8. Postup podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich patentových nárokov, kde anexová živica v kroku (d) a/ alebo kroku (i) obsahuje dietylamoetyl skupiny a/alebo katexová živica v kroku (d) a/alebo kroku (i) obsahuje karboxymetylové skupiny, živicami sú prednostne DEAE Sepharosa FF® a CM Sepharosa FF®.
9. Postup podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich patentových nárokov, kde použitý pufor v krokoch (b) až (l) je acetátový pufor, ako napríklad acetátový pufor s pH 5,0 až 6,0 majúci molaritu 5-25 mM.
10. Postup podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich patentových nárokov, kde látka inaktivujúca vírusy v kroku (h) je zmesou aspoň jedného neiónového alebo iónového detergentu a aspoň jedného rozpúšťadla.
11. Postup podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich patentových nárokov, kde látka inaktivujúca vírusy v kroku (h) je zmesou aspoň jedného významnejšie nenedenaturujúceho detergentu a aspoň jedného tri (nižší alkyl) fosfátového rozpúšťadla.
12. Imunoglobulínový produkt, ktorý možno získať podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 1-11.

13. Imunoglobulínový produkt, ktorý možno získať postupom podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 6-8.

14. Imunoglobulínový produkt majúci nasledujúce charakteristiky:

a) čistota viacej jako 98%

b) obsah monomérov a dimérov vyššia jako 98,5 %,

c) obsah IgA menší jako 4 mg IgA/l, a

d) obsah IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4.

15. Imunoglobulínový produkt podľa patentového nároku 14, ktorý neobsahuje detergent, PEG, alebo albumín ako stabilizačnú látku.

16. Imunoglobulínový produkt podľa patentových nárokov 14 alebo 15, ktorý obsahuje menej ako 3 mg/l IgA.

17. Imunoglobulínový produkt podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 14 až 16, ktorý obsahuje medzi 55 a 65 % IgG1, medzi 30 a 40% IgG2, medzi 2 a 5% IgG3 a medzi 1 a 4 % IgG4.

18. Imunoglobulínový produkt podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 14 až 17, ktorý obsahuje menej jako 0,5% polymérov a agregátov.

19. Tekutý imunoglobulínový produkt podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 14 až 18.

20. Imunoglobulínový produkt podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 14 až 19 pre okamžité intravenózne podanie.

21. Imunoglobulínový produkt podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 14 až 20 pre použitie v medicíne.

22. Použitie imunoglobulínového produktu podľa akéhokoľvek z patentových nárokov 14 až 21 pre prípravu lieku pre liečbu cicavcov s PID (primárnou imunodeficienciou), SID (sekundárnou imunodeficienciou), ITP (idiopatickou trombocytopenickou purpurou), polyradikulitídou, periférnou polyneuropatiou, Kawasakiho chorobou, polymyositídou, závažnými chronickými autoimúnnymi ochoreniami, chronickými zápalovými demyelizačnými polyneuropatiami (CIDP), multifokálnou motorickou neuropatiou, roztrúsenou sklerózou, myasténiou

gravis, Eaton-Lambertovým syndrómom, neuritídou optiku, epilepsiou, habituálnymi potraty, primárnym antifosfolipidovým syndrómom, reumatoídnou artritídou, systémovým lupus erytematózus, systémovou sklerodérmiou, vaskulitídou, Wegenerovou granulomatózou, Sjögrenovom syndrómom, juvenilnou revmatoídnou artritídou, autoimmúnnou neutropéniou, autoimmúnnou anémiou, neutropéniou, Crohnovou chorobou, ulceróznou kolitídou, coeliakií, astmatom, syndrómom septického šoku, chronickým únavovým syndrómom, psoriázou, syndrómom toxického šoku, diabetom, sínusitídou, dilatačnou kardiomyopatiou, endokarditídou, aterosklerózou, a liečbu dospelých jedincov s AIDS a bakteriálnymi infekciami.

23. Použitie podľa patentového nároku 22, kde cicavcom je človek.