РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 614 119**(13) **C9**

(51) МПК
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) СКОРРЕКТИРОВАННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Примечание: библиография отражает состояние при переиздании

(21)(22) Заявка: **2014135665, 22.02.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.02.2013

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
22.02.2012 CN 201210041098.6

(43) Дата публикации заявки: **10.04.2016** Бюл. № **10**

(45) Опубликовано: **22.03.2017**

(15) Информация о коррекции:
Версия коррекции №1 (W1 C2)

(48) Коррекция опубликована:
15.08.2017 Бюл. № 23

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **22.09.2014**

(86) Заявка PCT:
CN 2013/071754 (22.02.2013)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2013/123889 (29.08.2013)

Адрес для переписки:
190000, Санкт-Петербург, BOX 1125, "ПАТЕНТИКА

(72) Автор(ы):
ЯН Хуэйчуань (CN),
ЛВ Цзячэн (CN),
ЛИАН Хун (CN),
ВАН Янь (CN),
ВУ Пэн (CN),
ЛИ Цзэлинь (CN),
ЛАН Сюэюань (CN)

(73) Патентообладатель(и):
ЧЭНДУ ЖУНШЭН ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО., ЛТД (CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2010134944 A, 27.02.2012. RU 2361612 C1, 20.07.2009. US 0004515776 A1, 07.05.1985. US 0004374763 A1, 22.02.1983.**

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии. Описана группа изобретений, включающая способ получения иммуноглобулина человека и препарат иммуноглобулина человека, полученный вышеуказанным способом. Способ содержит в себе стадии растворения компонента Кона (Cohn component) I+II+III или компонента Кона II+III в воде для инъекций; осаждение каприловой кислотой или каприлатом; первый этап анионообменной хроматографии, включающий доведение pH фильтрата, полученного на этапе (2), до 5,2, очистку анионообменной хроматографией и получение элюирующего раствора; осаждение IgM, включающее регулирование проводимости элюирующего раствора, полученного на этапе (3), до 500-1000 мкСм/см с помощью воды и дальнейшее доведение pH до 6,0-7,3, с последующим выдерживанием в течение 1-2 ч, фильтрацию и сбор фильтрата; второй этап анионообменной хроматографии, включающий доведение pH фильтрата, полученного на этапе (4), до 5,6, последующую очистку анионообменной хроматографией и сбор элюирующего раствора; получение иммуноглобулина человека посредством диализа

RU 2614119 C9

RU 2614119 C9

элюирующего раствора, полученного на этапе (5), путем ультрафильтрации, получение фармацевтической формы и инактивация вирусов.

Изобретение расширяет арсенал способов для получения иммуноглобулина человека. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 2 ил., 3 табл., 2 пр.

RU 2614119 C9

RU 2614119 C9

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 614 119**(13) **C9**

(51) Int. Cl.
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

Note: Bibliography reflects the latest situation

(21)(22) Application: **2014135665, 22.02.2013**

(24) Effective date for property rights:
22.02.2013

Priority:
(30) Convention priority:
22.02.2012 CN 201210041098.6

(43) Application published: **10.04.2016** Bull. № **10**

(45) Date of publication: **22.03.2017**

(15) Correction information:
Corrected version no1 (W1 C2)

(48) Corrigendum issued on:
15.08.2017 Bull. № 23

(85) Commencement of national phase: **22.09.2014**

(86) PCT application:
CN 2013/071754 (22.02.2013)

(87) PCT publication:
WO 2013/123889 (29.08.2013)

Mail address:
190000, Sankt-Peterburg, BOX 1125, "PATENTIKA

(72) Inventor(s):
YAN Khuejchuan (CN),
LV Tszyachen (CN),
LIAN Khun (CN),
VAN Yan (CN),
VU Pen (CN),
LI Tszelin (CN),
LAN Syueyuan (CN)

(73) Proprietor(s):
CHENDU ZHUNSHEN FARMASYUTIKALS KO., LTD (CN)

RU 2614119 C9

RU 2614119 C9

(54) METHOD OF PRODUCING HUMAN IMMUNOGLOBULIN

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry. Group of inventions is described, which involves method of producing human immunoglobulin and preparation of human immunoglobulin, obtained using said method. Method includes stage of dissolving of Cohn component I+II+III or Cohn component II+III in water for injections; deposition with caprylic acid or caprylate; first stage of anion-exchange chromatography, involving bringing pH of filtrate obtained at step (2), to 5.2, cleaning by anion-exchange chromatography and obtaining eluating solution; deposition of IgM, including control of conductivity of eluating solution obtained at step (3), up to 500–1,000 μS/cm by means of water and further bringing pH to 6.0–7.3,with subsequent settling for 1–2 hours, filtration and filtrate collection; second stage of anion-exchange chromatography, involving bringing pH of filtrate obtained at step (4) to 5.6, subsequent purification by anion-exchange chromatography and collection of eluating solution; production of human immunoglobulin by dialysis of eluating solution obtained at step (5), by ultrafiltration, obtaining pharmaceutical form and inactivation of viruses.

EFFECT: invention extends range of methods for producing human immunoglobulin.

9 cl, 2 dwg, 3 tbl, 2 ex

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу получения препаратов крови, и в частности к способу получения иммуноглобулина человека.

Уровень техники

Иммуноглобулин включает по меньшей мере IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, из которых IgG является самым важным, и отсутствие IgG приведет к снижению защиты организма. Препараты иммуноглобулина можно подразделить в основном на три группы: иммуноглобулин человека для внутримышечной инъекции, специфический иммуноглобулин и иммуноглобулин для внутривенной инъекции. В настоящее время препараты иммуноглобулинов в основном выделяют из плазмы.

В 1940-х годах профессор Е.Ю. Кон (E.J. Cohn) из Гарвардского университета изобрел способ отделения белков плазмы низкотемпературным этанолом. После этого Нисчманн и Кистлер с соавторами (Nistchmann and Kistler, et. al.) модернизировали низкотемпературный этанольный способ Кона и предложили усовершенствованный способ разделения белков плазмы низкотемпературным этанолом, который отличается упрощенными этапами и сокращенным временем получения. Тем не менее способ разделения низкотемпературным этанолом имеет определенные ограничения при производстве иммуноглобулина, и восстановление глобулинов колеблется в диапазоне от 3,8 до 4,4 г/л. Кроме того, содержание IgA в составе препарата иммуноглобулина, полученного низкотемпературным этанольным способом, является относительно высоким, и, таким образом, у пациентов, страдающих врожденной селективной недостаточностью IgA, могут возникнуть побочные эффекты после инъекций.

В 1969 году Штейнбрах с соавторами (Steinbruch, et al.) описали способ отделения IgG от плазмы млекопитающих с помощью осаждения каприловой кислотой в сочетании с анионообменной хроматографией. Под воздействием слабокислой среды с pH≥4,5 можно осаждать другие примесные белки, помимо иммуноглобулина. Тем не менее этот способ требует дальнейшей очистки IgG с помощью диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ-целлюлозы) в качестве среды анионного обмена, и характеризуется сложностью процесса и высокой стоимостью.

В патенте США №6,307,028 предложен способ очистки с помощью осаждения каприловой кислотой в комбинации с двухэтапной анионообменной хроматографией, и был получен препарат иммуноглобулина высокой чистоты с тем же распределением подклассов IgG, как в нормальной плазме.

Тем не менее у китайцев содержание IgM в плазме более высокое, чем у некитайцев (содержание IgM в плазме у китайцев составляет около 10% от общего содержания белка, в то время как содержание IgM в плазме у некитайцев колеблется от 1% до 3% от общего содержание белка). Для получения иммуноглобулина с подходящей чистотой в соответствии с предыдущим способом требуется хроматографическая колонка большого объема для абсорбции большого количества IgM, что влечет повышенные расходы. Этот фактор затрудняет возможность реализации способа в промышленном масштабе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для решения вышеупомянутой проблемы в настоящем изобретении предложен новый способ получения иммуноглобулина человека.

Прежде всего, настоящее изобретение относится к способу получения иммуноглобулина человека, включающему следующие этапы:

(1) растворение: растворение компонента Кона (Cohn component) I+II+III или компонента Кона II+III в воде для инъекций;

(2) осаждение каприловой кислотой: осаждение примесей каприловой кислотой или каприлатом, фильтрация и получение фильтрата;

(3) первый этап анионообменной хроматографии: доведение pH фильтрата, полученного на этапе (2), до 5,2, очистка анионообменной хроматографией и получение элюирующего раствора;

(4) осаждение IgM: регулировка проводимости элюирующего раствора, полученного на этапе (3), до 500-1000 мкСм/см с помощью воды и дальнейшее доведение pH до 6,0-7,3, с последующим выдерживанием в течение 1-2 ч, фильтрация и получение фильтрата;

(5) второй этап анионообменной хроматографии: доведение pH фильтрата, полученного на этапе (4), до 5,6, последующая очистка анионообменной хроматографией и получение элюирующего раствора;

(6) получение продукта иммуноглобулина человека посредством ультрафильтрации или диализа, получение фармацевтического препарата и инактивация вирусов.

На этапе (1) компонент Кона I+II+III или компонент Кона II+III добавляют в воду для инъекций и перемешивают при температуре 2-8°C, до растворения с доведением pH до 3,8-4,9. Как правило, количество воды для инъекций составляет: отношение объема к массе воды для инъекций к компоненту Кона I+II+III или компоненту Кона II+III 10:1-15:1.

На этапе (2) добавляют каприловую кислоту или каприлат в концентрации 10 мМ - 20 мМ и доводят pH до 5,0-5,3.

На этапе (3) в качестве носителя для указанной анионообменной хроматографии используют Capto Q, Gigacap Q или Unosphere Q, причем объем колонки для анионообменной хроматографии составляет 1/105-1/50 от объема образца.

На этапе (4) предпочтительное значение pH составляет 6,3-6,74, еще более предпочтительное 6,51-6,7, и еще более предпочтительное 6,51 или 6,7.

На этапе (5) в качестве носителя для указанной анионообменной хроматографии используют Macrocap Q, причем объем колонки обменной хроматографии составляет 1/50-1/35 от объема образца.

Также в настоящем изобретении предложен иммуноглобулин человека, полученный вышеуказанным способом.

В настоящем изобретении в конечном счете предложена фармацевтическая композиция, которая получена из указанного выше иммуноглобулина человека в качестве активного ингредиента совместно с фармацевтически приемлемым адъювантом или вспомогательными ингредиентами.

Способ получения, предложенный в настоящем изобретении, включает дополнительный этап осаждения IgM, добавленный, согласно изобретению, между двумя этапами анионной хроматографии, и, таким образом, объем второго этапа анионообменной хроматографии, очевидно, уменьшается, стоимость производства снижается, и, таким образом, данный способ имеет многообещающие перспективы по применению на рынке.

Очевидно, что в соответствии с указанным выше описанием настоящего изобретения в сочетании с общими техническими знаниями и обычными техническими средствами в данной области, можно осуществлять различные замены или изменения или модификации в отсутствие отклонений от основной технической концепции согласно настоящему изобретению, упомянутой и выше.

Приведенное выше описание настоящего изобретения далее более подробно раскрыто в отдельных вариантах реализации в виде примеров, которые, однако, не следует понимать как ограничивающие объем настоящего изобретения следующими примерами.

Все способы реализации на основании вышеупомянутого описания попадают в пределы объема настоящего изобретения.

Описание чертежей

На Фиг. 1 схематически представлен способ получения иммуноглобулина человека согласно настоящему изобретению.

На Фиг. 2 показана взаимосвязь между pH, количеством осажденного IgM и выходом IgG.

Варианты реализации

Пример 1. Получение иммуноглобулина человека способом согласно настоящему изобретению

1. Экспериментальные материалы

Компонент Кона I+II+III или компонент II+III: полученный низкотемпературным методом осаждения с использованием этанола, как описано на стр. 1194 книги Medical Biologicology, 2nd edition (People's Medical Publishing House Co., LTD).

Соляная кислота, каприловая кислота, носитель Capto Q, носитель Gigacap Q, носитель Unosphere Q, Macrocap Q, диатомит и набор для обнаружения IgA Beckman IMMAGE - все коммерчески доступны.

2. Методика проведения экспериментов

Как показано на Фиг. 1, иммуноглобулин получали следующим образом:

(1) Компонент Кона I+II+III: 4 кг осадка компонента Кона I+II+III растворяли в 40 л ВДИ (вода для инъекций) при 5°C и перемешивали в течение 1 часа. pH доводили до 4,20 хлористоводородной кислотой 0,5M и полученный раствор нагревали и перемешивали в водяной бане при 25°C в течение 2 ч;

(2) осаждение каприловой кислотой: каприловая кислота была непосредственно добавлена до достижения конечной концентрации 15 мМ, и pH доводили до 5,20 при помощи 0,5M NaOH. Полученный раствор нагревали и перемешивали на водяной бане при 25°C в течение 2 ч, а затем оставляли на 2 ч при 8°C;

(3) Первый этап анионообменной хроматографии: суспензия, полученная в результате реакции осаждения каприловой кислотой, была подвергнута фильтрации фильтрующим слоем обычной глубины, и pH фильтрата доводили до 5,20 хлористоводородной кислотой 0,5M или NaOH 0,5M. Впоследствии первый этап анионообменной хроматографии проводили с носителем Capto Q, при pH хроматографии 5,20 и с линейной скоростью потока 200 см/час. Объем колонны обменной хроматографии составлял 1/75 от объема образца;

(4) осаждение IgM: сначала проводимость хроматографического элюирующего раствора доводили до 700 мкСм/см. Затем pH раствора доводили до 6,3 с 0,5M NaOH, с последующим выдерживанием в течение 1 ч;

(5) второй этап анионообменной хроматографии: была осуществлена фильтрация с добавлением диатомита и при проведении второго этапа анионообменной хроматографии pH фильтрата доводили до 5,6. Использовали носитель Macrocap Q с линейной скоростью потока 75 см/ч, а объем колонки обменной хроматографии составлял 1/40 от объема образца;

(6) собирали хроматографический элюирующий раствор и его pH доводили до 3,9-4,2 хлористоводородной кислотой 0,5M. Затем раствор был подвержен ультрафильтрационной концентрации до достижения концентрация белка 20 мг/мл. Для того чтобы осуществить фильтрацию вирусов, раствор пропускали через вирусные фильтры с размером пор 200-15 нм, такие как DV50, DV20, Planova75, Planova35 и подобные. После завершения этого этапа раствор концентрировали до концентрации

белка, требуемой для конечного препарата, такой как 5% или 10% (вес/объем). После этого добавляли подходящие добавки, чтобы осмотическое давление раствора удовлетворяло требованию для внутривенного введения, при этом добавки могут представлять собой сахара или аминокислоты. pH раствора доводили до 4,0-4,8. Раствор инкубировали при 25°C в течение 21 дня и по отдельности упаковывали в инфузионные бутылки в соответствии с требованиями по получению фармацевтического препарата.

3. Определение продукта

(1) Способ определения

В соответствии с методикой, указанной для исполнения в Фармакопее Китая (Chinese Pharmacopoeia) (2010), были соответственно определены индексы, такие как чистота продукта, распределение мономера продукта + димера (т.е. размер молекулы), распределение подкласса продукта, и прочие.

Содержание IgA в продукте было определено на анализаторе белка плазмы Beckman IMMAGE с помощью метода иммунной турбидиметрии. Кроме того, определение проводили с использованием набора для определения IgA Beckman IMMAGE, конкретный способ определения указан на инструкциях упомянутого набора для определения.

Способ определения выхода: после концентрации ультрафильтрацией, концентрация белка препарата была определена по способу определения Кьельдаля (который представляет собой первый способ, указанный в приложении VI B в Фармакопее Китая 2010), при этом

выход = концентрация белка × объем состава/объем плазмы.

(2) Результат определения

Результат определения показан в таблице 1:

Таблица 1. Сравнение показателей качества препарата иммуноглобулина, полученного в настоящем изобретении, и препарата, полученного существующим способом с использованием низкотемпературного этанола

Показатели определения	Испытуемый образец согласно настоящему способу (5% ВВИГ)			Существующие продукты (способ с использованием низкотемпературного этанола)
	20110309	20110312	20110414	
Чистота	99,9%	99,3%	99,9%	~ 98%
Мономер + димер	99,9%	99,9%	99,2%	~ 98%
IgA (мг/л)	12,5	14,5	18,1	~ 150

IgG_1	54,50%	55,50%	53,47%	~ 55%
IgG_2	37,39%	35,80%	36,99%	~ 35%
IgG_3	6,13%	6,21%	7,05%	~ 8%
IgG_4	2,08%	2,46%	2,48%	~ 2%
другие показатели	все они удовлетворяют требованиям, изложенным в Фармакопее Китая			
Выход (г/л плазмы)	5,85	5,71	5,61	~ 5,0

Согласно таблице 1, все показатели иммуноглобулина человека, полученного в соответствии со способом согласно настоящему изобретению, отвечают требованиям, изложенным в Фармакопее Китая. По сравнению с традиционным способом с использованием низкотемпературного этанола, способ согласно настоящему изобретению может повысить чистоту препарата, уменьшить содержание мультимера и IgA, и дополнительно повысить безопасность в случае вливания высоких доз. Кроме того, способ получения иммуноглобулина человека согласно настоящей заявке имеет высокий выход, который увеличен более чем на 10% по сравнению с существующим способом с использованием низкотемпературного этанола.

Пример 2. Эксперименты по оптимизации параметров

Были определены значения pH и проводимость при осаждении IgM на этапе (4) способа настоящего изобретения:

(1) Эксперимент по оптимизации проводимости

Методика проведения эксперимента: при постоянных прочих условиях, были изменены проводимость и pH на этапе (4) примера 1 для определения взаимосвязи между проводимостью и количеством осадка IgM и выходом IgG.

Результат эксперимента: посредством множества экспериментов было обнаружено, что, когда проводимость хроматографического раствора элюирования выше, чем 1 мкСм/см, даже если pH раствора поднимали, осаждения IgM не было. Когда проводимость хроматографического элюирующего раствора была между 500 и 1000 мкСм/см, pH доводили до 6,0 и выше, и IgM, очевидно, выпадал в осадок.

(2) Эксперимент по оптимизации pH

Методика эксперимента: при постоянных прочих условиях, были изменен pH на этапе (4) примера 1 для определения взаимосвязи между pH, количеством осадка IgM и выходом IgG.

Результат эксперимента: посредством множества экспериментов было обнаружено, что скорость удаления IgM увеличивалась при увеличении pH, но чрезмерно высокое значение pH привело к увеличению потерь IgG.

В Таблице 2 и на Фиг. 1 показано:

Таблица 2. Взаимосвязь между количеством осадка IgM, выходом IgG и pH

Серийный номер	pH	Выход IgG	Количество осадка IgM (%)
1	6,2	100	37,5
2	6,28	91,63	43,04
3	6,3	98	50
4	6,3	100	41,57
5	6,31	100	47
6	6,51	100	60
7	6,52	98,64	51,23
8	6,59	96,44	55
9	6,7	100	60
10	6,7	98,87	60
11	6,74	97	48,9
12	7,01	92	70
13	7,3	100	61,58

Согласно Таблице 2 и Фиг. 1, при pH между 6,2 и 7,3 IgM, очевидно, выпадает в осадок. При pH между 6,3 и 6,74 IgM осаждается в высокой степени и выход IgG также высок. При pH между 6,51 и 6,7 как осаждение IgM, так и выход IgG проявлены лучше.

В целом, для сбалансирования скорости удаления IgM и выхода IgG, на этапе (4) способа согласно настоящему изобретению проводимость доводили до 500-1000 мкСм/см и pH доводили до 6,0-7,0.

В целях более подробного исследования преимуществ способа согласно настоящему изобретению, был проведен следующий сравнительный эксперимент:

1. Получение иммуноглобулина человека

(1) Способ получения согласно настоящему изобретению: как описано в Примере 1;

(2) Сравнительный способ получения:

1) растворение компонента Кона I+II+III: 4 кг осадка компонента Кона I+II+III растворяли в 40 л ВДИ (вода для инъекций) при 5°C и перемешивали в течение 1 часа. pH доводили до 4,20 хлористоводородной кислотой 0,5M и полученный раствор нагревали и перемешивали на водяной бане при 25°C в течение 2 ч;

2) осаждение каприловой кислотой: каприловая кислота была непосредственно добавлена до достижения конечной концентрации 15 мМ, и pH доводили до 5,20 при помощи 0,5M NaOH. Полученный раствор нагревали и перемешивали на водяной бане

при 25°C в течение 2 ч, а затем оставляли на 2 ч при 8°C;

3) первый этап анионообменной хроматографии: суспензия реакции осаждения каприловой кислотой была подвергнута фильтрации с использованием фильтрующего слоя обычной глубины, pH фильтрата доводили до 5,20 хлористоводородной кислотой 0,5M или NaOH 0,5M. Впоследствии первый этап анионообменной хроматографии проводили с носителем Capto Q, при pH хроматографии 5,20 и с линейной скоростью потока 200 см/час;

4) второй этап анионообменной хроматографии: сбор хроматографического элюирующего раствора, фильтрация была осуществлена с добавлением диатомита, при проведении второй ступени анионообменной хроматографии pH фильтрата доводили до 5,6. Использовали носитель Macrocap Q с линейной скоростью потока 75 см/ч, а объем колонки обменной хроматографии составлял 1/19 от объема образца;

5) собирали хроматографический элюирующий раствор, его pH доводили до 3,9-4,2 хлористоводородной кислотой 0,5M. Затем раствор был подвержен ультрафильтрационной концентрации до достижения концентрация белка 20 мг/мл. Для того чтобы осуществить фильтрацию вирусов, раствор пропускали через вирусные фильтры с размером пор 200-15 нм, такие как DV50, DV20, Planova75, Planova35 и подобные. После завершения этого этапа раствор концентрировали до концентрации белка, требуемой для конечного состава, такой как 5% или 10% (вес/объем). После этого добавляли подходящие добавки, чтобы осмотическое давление раствора удовлетворяло требованию для внутривенного введения, при этом добавки могут представлять собой сахара или аминокислоты. pH раствора доводили до 4,0-4,8. Раствор инкубировали при 25°C в течение 21 дня и по отдельности упаковывали в инфузионные бутылки в соответствии с требованием для приготовления.

2. Определение продукта

(1) Способ определения

Способ определения такой же, как в Примере 1.

(2) Результат определения

Результат определения показан в Таблице 3:

Таблица 3. Сравнение качества иммуноглобулинов человека, полученных способом согласно настоящему изобретению и сравнительным способом

Показатели определения	Испытуемый образец настоящего процесса (5% ВВИГ)			Продукт сравнительного эксперимента
	20110309	20110312	20110414	
Чистота	99,9%	99,8%	99,9%	99,8%
Мономер + димер	99,9%	99,7%	99,2%	99,7%
IgA (мг/л)	12,5	21	18,1	21
IgG_1	54,50%	57,26%	53,47%	57,26%
IgG_2	37,39%	31,59%	36,99%	31,59%
IgG_3	6,13%	8,08%	7,05%	8,08%
IgG_4	2,08%	3,07%	2,48%	3,07%
другие показатели	все они удовлетворяют требованиям, изложенным в Фармакопее Китая			
Выход (г/л плазмы)	5,85	5,71	5,61	5,7

Как показано в таблице 3, показатели качества иммуноглобулинов, полученных двумя способами, не имеют никакой существенной разницы, и их выход составляет 5,5-6,0 г/л плазмы и 5,7 г/л плазмы, соответственно, также без каких-либо существенных различий.

Во втором этапе анионообменной хроматографии объем колонны обменной хроматографии был 1/40 от объема образца в способе по настоящему изобретению, в то время как в сравнительном способе он составлял 1/19.

Экспериментами доказано, что для получения иммуноглобулинов с соответствующими показателями качества на втором этапе анионообменной хроматографии способ по настоящему изобретению способен существенно сократить требуемой объем хроматографической колонки по сравнению со сравнительным способом.

Таким образом, способ, предложенный в настоящем изобретении, позволяет успешно решить проблему высокой стоимости производства иммуноглобулина человека, вызванного чрезмерно высоким содержанием IgM в плазме китайцев; существенно снизить стоимость производства, делает возможным промышленное производство

иммуноглобулинов человека в крупных масштабах и обладает многообещающими перспективами применения на рынке.

(57) Формула изобретения

1. Способ получения иммуноглобулина человека, включающий следующие этапы:

(1) растворение компонента Кона (Cohn component) I+II+III или компонента Кона II+III в воде для инъекций;

(2) осаждение каприловой кислотой или каприлатом, включающее осаждение примесей каприловой кислотой или каприлатом, фильтрацию и сбор фильтрата;

(3) первый этап анионообменной хроматографии, включающий доведение pH фильтрата, полученного на этапе (2), до 5,2, очистку анионообменной хроматографией и получение элюирующего раствора;

(4) осаждение IgM, включающее регулирование проводимости элюирующего раствора, полученного на этапе (3), до 500-1000 мкСм/см с помощью воды и дальнейшее доведение pH до 6,0-7,3, с последующим выдерживанием в течение 1-2 ч, фильтрацию и сбор фильтрата;

(5) второй этап анионообменной хроматографии, включающий доведение pH фильтрата, полученного на этапе (4), до 5,6, последующую очистку анионообменной хроматографией и сбор элюирующего раствора;

(6) получение иммуноглобулина человека посредством диализа элюирующего раствора, полученного на этапе (5), путем ультрафильтрации, получение фармацевтической формы и инактивация вирусов.

2. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что на этапе (1) компонент Кона I+II+III или компонент Кона II+III добавляют в воду для инъекций и перемешивают при температуре 2-8°C до растворения с доведением pH до 3,8-4,9.

3. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что на этапе (2) добавляют каприловую кислоту или каприлат в концентрации 10 мМ - 20 мМ и доводят pH до 5,0-5,3.

4. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что носитель для указанной анионообменной хроматографии на этапе (3) представляет собой Capto Q, Gigacap Q или Unosphere Q.

5. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что указанный pH на этапе (4) имеет значение 6,3-6,74.

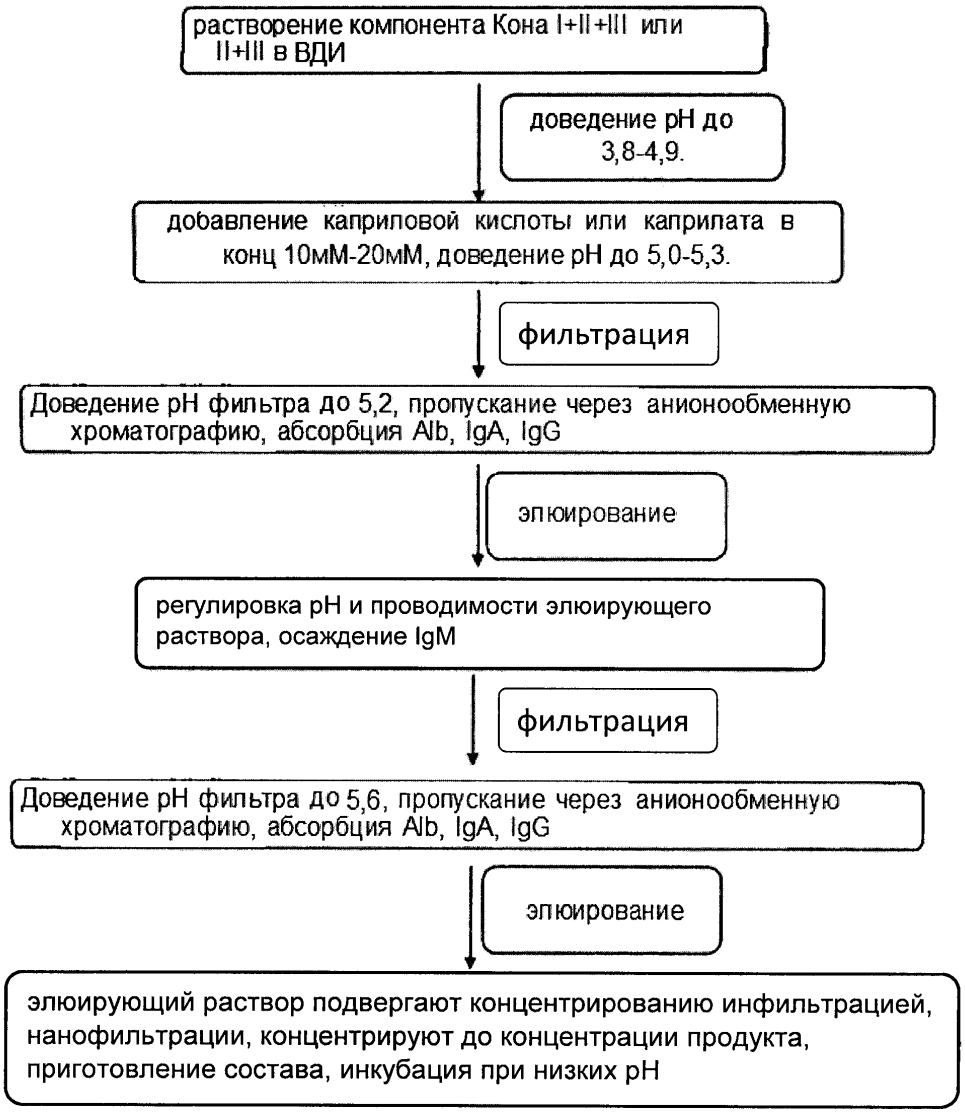
6. Способ по п. 5, характеризующийся тем, что указанный pH на этапе (4) имеет значение 6,51-6,7.

7. Способ по п. 6, характеризующийся тем, что указанный pH на этапе (4) имеет значение 6,51 или 6,7.

8. Способ по п. 1, характеризующийся тем, что носитель для указанной анионообменной хроматографии на этапе (5) представляет собой Macrocap Q.

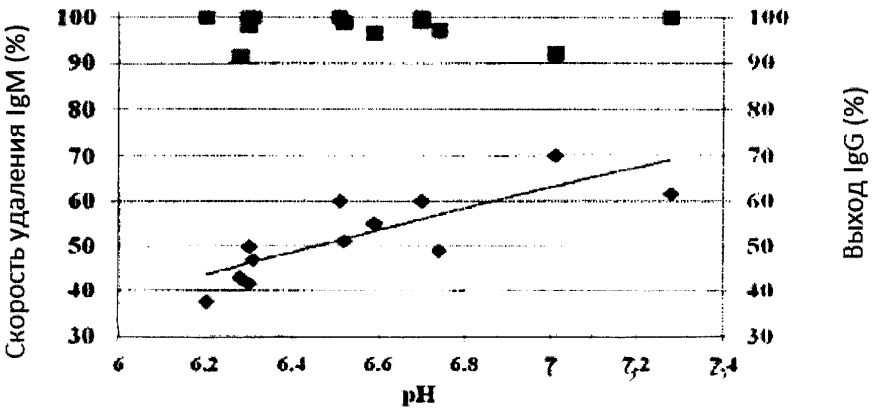
9. Препарат иммуноглобулина человека, полученный согласно способу по любому из пп. 1-8, при этом указанный препарат характеризуется повышенной чистотой и уменьшенным содержанием мультимеров и IgA, при этом чистота препарата составляет от 99,3% до 99,9%, указанное содержание мультимеров не превышает 0,8% и указанное содержание IgA не превышает 18,1 мг/л.

1


растворение компонента Кона I+II+III или II+III в ВДИ
доведение pH до 3,8-4,9.
добавление каприловой кислоты или каприлата в конц 10мМ-20мМ, доведение pH до 5,0-5,3.
фильтрация
Доведение pH фильтра до 5,2, пропускание через анионообменную хроматографию, абсорбция Alb, IgA, IgG
элюирование
регулировка pH и проводимости элюирующего раствора, осаждение IgM
фильтрация
Доведение pH фильтра до 5,6, пропускание через анионообменную хроматографию, абсорбция Alb, IgA, IgG
элюирование
элюирующий раствор подвергают концентрированию инфильтрацией, нанофильтрации, концентрируют до концентрации продукта, приготовление состава, инкубация при низких pH

ФИГУРА 1

2


Скорость удаления IgM (%)
Выход IgG (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
6
6.2
6.4
6.6
6.8
7
7,2
7,4
pH

ФИГУРА 2