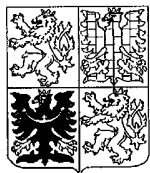


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.12.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **24.12.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/997952**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/25208**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/33484**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2934

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 38/17
A 61 K 39/395
A 61 K 35/14
C 07 K 16/00
C 12 N 7/06
A 61 P 37/02

(71) Přihlašovatel:

ALPHA AND THERAPEUTIC CORPORATION,
Los Angeles, CA, US;

(72) Původce:

Mamidi Raja R., Pomona, CA, US;
Abgdasarian Andranik, San Dimas, CA, US;
Takechi Kazuo, Osaka, CA, JP;
Canaveral Gorgonio, Walnut, CA, US;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob přípravy intravenózně aplikovatelného
roztoku gammaglobulinu a výsledný produkt**

(57) Anotace:

Způsob přípravy intravenózně aplikovatelného roztoku gama-globulinu, který v podstatě neobsahuje kontaminující viry, tepelnou úpravou, přičemž dochází k deaktivaci a dělení znečištěného roztoku gama-globulinu. Pak se čištěný gama-globulin upravuje směsí rozpouštědlo-detergent, přičemž dochází k další deaktivaci virů.

Způsob přípravy intravenózně aplikovatelného roztoku gama-globulinu a výsledný produkt

Oblast techniky

Vynález se týká integrovaného, víceetapového způsobu produkce intravenózně aplikovatelného imunitního sérového globulinu, který obsahuje jako hlavní složku IgG (γ -globulin).

Dosavadní stav techniky

Vynález se týká integrovaného, víceetapového způsobu výroby intravenózně aplikovatelného imunitního sérového globulinu, který obsahuje jako hlavní složku IgG (γ -globulin). Intravenózně aplikovatelné roztoky γ -globulinu připravované z počátečních materiálů, které se získaly Cohnovým dělením z lidské plazmy, je možné připravit různými postupy. Určité Cohnovy frakce ve srovnání s jinými frakcemi obsahují vyšší titry γ -globulinu. Obvyklými vstupními materiály v případě roztoku γ -globulinu jsou Cohnova frakce II nebo Cohnova frakce II + III.

Ačkoli způsoby výroby popsané v předchozím stavu techniky používají různé metody separace a sterilizace, je nutné použít jisté modifikace pro zlepšení čistoty a bezpečnosti konečného produktu a ke zvýšení výtěžku produktu.

Při deaktivaci viru je možné použít řadu komerčních postupů, buď úpravu směsí rozpouštědlo/detergent nebo tepelnou úpravu. Do současné doby se v dosavadním stavu techniky nevyskytuje popis víceetapového procesu, který jako počáteční materiál používá kaši Cohnovy frakce II nebo II + III a který zahrnuje různé metody deaktivace viru, jako část procesu výroby γ -globulinu s vysokým výtěžkem.

Patent USA č. 5,151,499 (Kameyama et al.) popisuje postup výroby virových deaktivovaných proteinových kompozic, kde se

deaktivaci virů s obalem proteinové kompozice provede úpravou směsí rozpouštědlo/detergent a deaktivaci virů bez obalu se provede tepelnou úpravou. Patent USA č. 5,151,499 uvádí, že v přítomnosti proteázových inhibitorů je výhodnější použít nejdříve krok úpravy směsí rozpouštědlo/detergent a pak teprve tepelnou úpravu. V případě, že tepelná úprava probíhá v kapalném stádiu, protein se nejdříve získává ze směsí rozpouštědlo/detergent adsorbci na koloně s výměnou iontů a pak následuje libovolná tepelná úprava. Tepelná úprava roztoku se může provést v přítomnosti cukru, cukerného alkoholu a stabilizátoru aminokyselin. Ačkoli v patentu USA č. 5,151,499 se uvádí seznam řady počátečních proteinových kompozic, které zahrnují imunoglobulin, v příkladech popisujících jeho výrobu se používá Faktor IX, trombin, fibrinogen a fibronectin. Nezmiňuje se také odstranění denaturovaného proteinu, který vzniká při kroku tepelné úpravy při dělení.

Jisté postupy předchozího stavu techniky produkce intravenózně injektovatelných roztoků γ -globulin popisují začlenění tepelnou úpravu kapaliny, které probíhá při vícestupňovém čištění v přítomnosti sorbitolového stabilizátoru, kde se jako počáteční materiál používá kaše Cohnovy frakce II + III. Patent USA č. 4,845,199 (Hirao et al.) popisuje, jak dělení polyetylglykolem (PEG) (8 % hmotnost/objem, pak následuje 12 % hmotnost/objem PEG), pak následuje chromatografie s výměnou iontů (DEAE-Sephadex) a odstranění skupiny protilátek z lidské krve a tepelná úprava kapaliny v přítomnosti sorbitolu, jenž působí jako stabilizátor proteinu. Na druhé straně v příkladu 1 patentu USA č. 4,876,088 (Hirao et al.) se popisuje příprava roztoku γ -globulinu aplikovatelného intravenózní injekcí z kaše Cohnovy frakce II + III, kde se kaše suspenduje ve vodě, pH suspenze se upravuje na hodnotu 5,5 a vše se centrifuguje. V supernatantu se deaktivují viry tepelnou úpravou v přítomnosti 33 % (hmotnost/objem) sorbitolu, pak následuje dělení za

použití PEG (6 %/12 %), kterým se odstraní protein denaturovaný teplem, a pak dochází ke kroku čištění, jenž zahrnuje chromatografii na koloně s výměnou iontů s náplní DEAE-Sephadex.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je produkce integrovaného, komerčně použitelného postupu pro výrobu vysoce čistého roztoku γ -globulinu vycházejícího z postupu Cohnova dělení.

Jiným předmětem vynálezu je velmi čistý intravenózně aplikovatelný roztok γ -globulinu, který neobsahuje ani obalené ani neobalené viry, které zahrnují všechny viry citlivé na teplotu.

Dalším předmětem vynálezu je komerční postup umožňující odstranění libovolného denaturovaného proteinu, který vzniká během sterilizace teplem před druhým stádiem deaktivace virů.

Vynález popisuje shora v textu uvedené a jiné předměty, které, jak je odborníkovi zřejmé, vznikají tak, že alkoholová Cohnova frakce, jenž může být částečně čištěná, ale obsahuje vysoký obsah γ -globulinu, je tepelně upravena ve vodném médiu v přítomnosti tepelného stabilizátoru, přičemž dochází k deaktivaci virů. Pak se provede dělení za použití PEG a pak následuje druhá deaktivace viru v přítomnosti rozpouštědla. Za účelem porušení viru s obalem se upřednostňuje použít směs rozpouštědla a detergentu, pak následuje separace z rozpouštědla nebo ze směsi rozpouštědlo-detergent.

Ve výhodném provedení vynálezu se jako tepelný stabilizátor používá sorbitol a jako rozpouštědlo se používá trialkylfosfat.

V jiném preferovaném provedení vynálezu se denaturované produkty, které vznikají při deaktivaci viru při vysoké teplotě odstraní dělením za použití PEG a pak následuje druhá

virová deaktivace, při níž dochází k produkci rozsáhle čištěného teplotně ošetřeného γ -globulinu.

U jiného preferovaného provedení vynálezu se před úpravou rozpouštědlem a detergentem odstraní jakékoli přítomné partikule.

V jiném provedení vynálezu se popisuje teplem sterilizovaný a rozpouštědlem-detergentem sterilizovaný γ -globulin vhodný pro případ intravenózní aplikace.

Jako počáteční materiál se používá frakce obsahující imunoglobulin. Tato frakce nemá žádná zvláštní omezení než, že pochází z lidského séra a obsahuje imunoglobulinovou frakci. Specifické příklady takové frakce obsahující imunoglobulin zahrnují frakci II + III a frakci II, které lze získat etanolovým dělením podle Cohna, a kaše frakcí, jenž obsahují imunoglobulin a odpovídají uvedeným frakcím. Jiné počáteční materiály jsou frakce I + II + III a frakce II + IIIw. Počáteční materiál může obsahovat nečistoty, jako je skupina protilátek lidské krve, plazminogen, plazmin, kallikrein, prekallikreinový aktivátor, polyméry IgM, IgA, IgG (agregáty) atd.

Výhodným počátečním materiálem jsou frakce II nebo Cohnova frakce II + III. Když se používá kaše frakce II + III, doporučuje se, aby se nejdříve provedlo promytí za vzniku frakcí II + IIIw, jenž se pak použijí v postupu podle vynálezu. Frakce II + IIIw je sraženina Cohnovy frakce II + III promyté roztokem hydrogenfosforečnanu sodného.

Frakce II + IIIw se mohou získat tak, že se sraženina frakce II + III resuspenduje ve studené vodě v poměru přibližně 1 kilogram kaše II + III na přibližně 20 objemů vody, přičemž suspenze je vhodná pro aplikaci injekcí. Za účelem stabilizace lipidů, lipoproteinů a albuminu se přidá roztok fosforečnanu sodného, aby konečná koncentrace byla 0,003M. Dále se přidá studený etanol, aby konečná koncentrace alkoholu byla

přibližně 20 %. Během přidání alkoholu se teplota postupně snižuje na teplotu -5 ± 1 °C a pH se upraví a udržuje se na hodnotě $7,2 \pm 0,1$, přičemž se může použít například acetátový pufr nebo ředěný hydroxid sodný. Frakce II + III_w tvoří sraženinu, jejíž formy se získaly centrifugací a/nebo filtrací, zatímco se udržuje teplota -5 ± 1 °C.

Před tím, než dojde k prvnímu kroku deaktivace viru podle vynálezu, mohou se provést různé kroky čištění a/nebo snížení obsahu agregátů. Například když se použije kaše frakce II + III_w, která v typickém případě obsahuje přibližně 20 % alkoholu a více než 70 % IgG, může se suspendovat ve třech až deseti objemech, upřednostňují se tři až pět objemů chladné vody, při teplotě 0 °C až 5 °C a hodnota pH se upraví na 4,5 až 6,0. Upřednostňuje se hodnota pH 5,0 až 5,5 za použití acetátového pufru s hodnotou pH 4,0 nebo kyseliny chlorovodíkové. Směs se míchá po dobu přibližně 2 až 15 hodin, což umožňuje aby se všechny γ -globulin rozpustil. Pak se nerozpuštěné proteiny, jako je albumin a α -globuliny, mohou odstranit centrifugací a/nebo filtrací. V případě, že se použijí počáteční rozdílné Cohnovy frakce, mohou se správně vybrat počáteční kroky nebo kroky postupu, když to vyžaduje provedení čištění za účelem získání frakce s vysokým obsahem IgG, která se bude dále zpracovávat. Například, když se od Cohnovy frakce III oddělí Cohnova frakce II (obsahuje více jak 95 % IgG), která se bude dále zpracovávat, počáteční zpracování probíhá při kyselém pH (hodnota je 3,2 až 5,0, upřednostňuje se hodnota pH 3,8 až 4,2), jak se popisuje v dokumentu patent USA č. 4,371,520 (Uemura et al.), přičemž účelem je rozbít agregáty imunitního globulinu přítomného ve formě imunitních globulinových monomérů a dimérů, protože je známo, že agregáty způsobují anti-komplementární aktivitu (ACA). V případě, že se použije jako počáteční materiál Cohnova frakce II + III podle Uemura et al., může se jako další krok probíhající po počátečním čištění a před krokem

teplotní deaktivace provést ošetření při nízké hodnotě pH, jak se popisuje shora v textu.

V případě kroku teplotní sterilizace se imunitní globulinový protein rozpustí ve vodě nebo, jestliže se vyskytuje ve formě vodné směsi jako filtrát shromážděný ve shora popsaném kroku částečného čištění frakce II + III, se může použít jak je a přidá se k němu cukr, cukerný alkohol a/nebo teplotní stabilizátor aminokyselin. Jako teplotní stabilizátor se upřednostňuje sacharóza, maltóza, sorbitol nebo manitol, nejvýhodnější je sorbitol. Cukr nebo cukerný alkohol se přidává do roztoku imunitního globulinu ve formě prášku nebo se nejdříve smíchá s malým objemem vody a pak se přidá k roztoku, aby konečná koncentrace byla 10 až 50 % (hmotnost/objem) až po dosažení saturace. V tomto bodě vodný roztok imunitního globulinu obsahuje dostatek vody tak, že tento roztok obsahuje přibližně 1 až 6 % celkového proteinu, přičemž v typickém případě počáteční materiál frakce II + III obsahuje kolem 300 gramů proteinu na jeden kilogram kaše.

Po přidání teplotního stabilizátoru se za účelem deaktivace na teplotu citlivých virů směs zahřeje na teplotu přibližně 50 až 70 °C po dobu přibližně 10 až 100 hodin. Upřednostňuje se teplota přibližně 60 °C po dobu 10 až 20 hodin. Krok tepelné úpravy neslouží pouze k deaktivaci virů, ale také prostřednictvím denaturizace proteinu může snižovat množství jistých nežádoucích proteinů, které jsou v normálním případě spojeny s Cohnovými frakcemi II + III, jako je prekallikrein, plasmin, plasminogen a IgA.

Po ošetření vysokou teplotou je nutné přidat chladnou vodu tak, že koncentrace proteinu se udržuje na hodnotě přibližně 0,3 až 2,0 %. Roztok se ochladí na teplotu 0 až 2 °C.

Dále dělení použitím PEG se provádí v roztoku ošetřeném při vysoké teplotě. Dělení za použití PEG je postup čištění imunitního globulinu dobře známý v oboru, který se používá za účelem separace požadovaného IgG monoméru a diméru od agregátu

IgG a od dalších nečistot, které se přirozeně vyskytují v počáteční frakci proteinu plazmy. Avšak dělení použitím PEG také umožňuje oddělení požadovaného monoméru a diméru IgG a nežádoucích produktů denaturovaných proteinů, které vznikají při tepelné úpravě. Těmito denaturovanými proteinovými produkty jsou denaturovaný prekallikrein, plazminogen, plazmin, IgA, IgM a agregáty.

Mohou se použít libovolné postupy dělení za použití PEG, které se popisují v předchozím stavu techniky. V obecném případě probíhají dvě stádia dělení použitím PEG. V první fázi dělení pomocí PEG se koncentrace PEG a hodnota pH vybrala tak, že požadovaný monomér a dimér IgG zůstává v roztoku, zatímco nežádoucí proteiny tak agregáty se srážejí z roztoku. Po centrifugaci a/nebo filtraci se zvýší koncentrace PEG, přičemž upravená hodnota pH způsobuje srážení požadovaného monoméru a diméru IgG.

Například první stádium dělení za použití PEG se provádí při hodnotě pH okolo 5,0 až 7,5, přičemž se upřednostňuje pH okolo 6,5 až 7,5, kdy se jako počáteční materiál používá kaše frakce II a IIIw. V případě, že počátečním materiálem je kaše frakce II + III, pH je přibližně 5,5 a 6,0, přičemž koncentrace PEG se pohybuje v rozmezí od přibližně 4 do 8 %, upřednostňuje se koncentrace buď 4 až 6 %, když se jako počáteční materiál používá kaše frakce II + IIIw, nebo 6 až 8 %, když se jako počáteční materiál používá kaše frakce II + III. Zatímco se teplota udržuje na hodnotě 0 až 2 °C, probíhá první fáze dělení pomocí PEG po dobu okolo 1 až 8 hodin, pak se sraženina odstraní, způsobem, který se popisuje dříve v textu. Jestliže se pH filtrátu upraví na hodnotu okolo 8,0 až 9,0, upřednostňuje se 8,5 až 8,9, a přidá se další PEG, aby konečná koncentrace byla okolo 10 až 15 %, upřednostňuje se 12 %. Vzniklá sraženina, kterou je čištěný imunoglobulin, se odstraní filtrací a/nebo centrifugací.

Další detaily postupu dělení pomocí PEG, které se mohou použít v praxi podle vynálezu, se nachází ve shora v textu uvedených publikacích. Jde o patent USA č. 4,876,088 (Hirao et al.) a patent USA č. 4,845,199 (Hirao et al.).

Konečným podstatným krokem podle vynálezu je provedení druhé deaktivace virů, při níž se používá rozpouštědlo nebo směs rozpouštědla a detergentu. Jak se popisuje dále v textu další kroky čištění, zvláště ty, které zahrnují použití iontoměničových pryskyřic, se mohou provést před a/nebo po ošetření směsí rozpouštědlo-detergent. Zvláště výhodným postupem je provedení výměny aniontů před deaktivací virů směsí rozpouštědlo-detergent a po provedení uvedené deaktivace je vhodné aplikovat výměnu kationtů. Tímto postupem se mohou z IgG odstranit jisté nežádoucí proteinové materiály (jako je prekellikreinový aktivátor, IgA, IgM a albumin), které se nacházejí v lidské plazmě. Použitím výměny aniontů lze odstranit takové materiály, jako jsou prekalikreinový aktivátor, IgA, IgM, albumin a PEG) spolu se zbylými činidly, které se používají při ošetření směsí detergent-rozpouštědlo, což se odstraňuje použitím postupy výměny kationtů.

Jestliže není uvedeno jinak, roztok se musí upravit směsí rozpouštědla-detergentu tak, aby se odstranila všechna určitá hmota, která může obsahovat denaturované proteiny. Proto se, dříve než se přidá směs rozpouštědlo-detergent, preferuje provedení filtrace roztoku přes filtr s póry o velikosti 1 mikrónu a menší. To také snižuje pravděpodobnost přítomnosti viru ve velkých částicích, což ho pravděpodobně chrání před působením směsí rozpouštědlo-detergent.

Preferovaným rozpouštědlem pro deaktivaci virů s obalem je trialkylfosfat. Trialkylfosfat, který se používá podle vynálezu, není předmětem omezení, ale upřednostňuje se použití tri(n-butyl)fosfat (TNBP). Dále se mohou použít fosfáty: tri(ter-butyl)fosfat, tri(n-hexyl)fosfat, tri(2-

etylhexyl)fosfat atd. Je také možné použít směs dvou nebo více různých trialkylfosfatů.

Používané množství trialkylfosfatu se pohybuje mezi 0,01 až 10 % (hmotnost/objem). Upřednostňuje se množství přibližně 0,1 až 3 % (hmotnost/objem).

Trialkylfosfat je možné použít v případě, že je či není přítomen detergent nebo povrchově aktivní činidlo. Upřednostňuje se použít trialkylfosfatu v kombinaci s detergentem. Detergent zesiluje kontakt virů v imunitní globulinové kompozici s trialkylfosfatem.

Příklady detergentů zahrnují polyoxyetylenové deriváty mastné kyseliny, zvláště estery bezvodého sorbitolu, jako je polysorbát 80 (obchodní jméno Tween 80, atd.) a polysorbát 20 (obchodní jméno Tween 20, atd.); činidlo pro promývací neiontové olejové lázně, jako je oxyetylovaný alkylfenol (obchodní jméno triton X100, atd.). Příklady zahrnují jiná povrchově aktivní činidla a detergenty, jako je Zwitterovy iontové detergenty a podobně.

Když se používá detergent, nepřidává se v kritickém množství. Například může se použít v rozmezí mezi přibližně 0,001 % a 10 %, upřednostňuje se rozmezí mezi přibližně 0,01 % a 3 %.

Podle vynálezu se úprava kompozice obsahující imunitní globulin trialkylfosfatem provádí přibližně při teplotě 20 až 35 °C, upřednostňuje se teplota 25 až 30 °C, po dobu delší než 1 hodina. Upřednostňuje se doba přibližně 5 až 8 hodin, nejvýhodnější je doba přibližně 6 až 7 hodin.

Během ošetření trialkylfosfatem je imunitní globulin přítomen v přibližně 3 až 8 % proteinovém roztoku ve vodném médiu.

Jestliže se před ošetřením směsí detergentu a rozpouštědla neprovede výměna aniontů, může se provést u imunitního globulinu upraveného směsí detergentu a rozpouštědla. Upřednostňuje se, aby se výměna kationtů provedla u produktu upraveného směsí detergentu a rozpouštědla. Úprava výměnou iontů se provádí s imunitním globulinem rozpuštěným ve vodném

rozpouštědla, jehož pH je v obecném případě okolo 5 až 8 a požaduje se nízká iontová síla, aby došlo k maximální adsorpci IgG. Koncentrace proteinu se v obecném případě pohybuje v rozmezí přibližně 1 až 15 % (hmotnost/objem), více se upřednostňuje rozmezí okolo 3 až 10 % (hmotnost/objem).

Iontový měnič se uvede do rovnováhy stejným vodným rozpouštědlem, jako se používá dříve v textu a použije se buď vsádkový nebo kontinuální systém. Například výměna aniontů vsádkovým systémem se provádí smícháním roztoku imunitního globulinu s aniontovým měničem v množství od přibližně 10 do 100 ml na mililitr předem upraveného aniontového měniče (například 1 gram pryskyřice DEAE Sephadex A-50 nabobtná na 20 gramů vlhké váhy v roztoku 0,4 % roztoku chloridu sodného). Směs se míchá při teplotě okolo 0 až 5 °C po dobu přibližně 0,5 až 5 hodin a pak se filtruje nebo centrifuguje při 6 000 až 8 000 otáčkách za minutu po dobu 10 až 30 minut, aby se získal roztok supernatantu. Kontinuální systém ošetření se provádí tak, že imunitní globulin prochází skrz kolonu aniontového měniče rychlostí od přibližně 10 do 100 ml na mililitr iontového měniče a tak se získá neadsorbovaná frakce. Používaný aniontový měnič například obsahuje skupiny pro výměnu aniontů vázané na nerozpustném nosiči. Tyto skupiny zahrnují dietylaminoetyl (DEAE), kvarterní aminoetylovou skupinu (QAE), atd. a nerozpustný nosič zahrnuje agarózu, celulózu, dextran, polyakrylamid atd..

Použitelné kationtové měniče jsou karboxymethyl-Sephadex (CM-Sephadex), CM-celulóza, SP-Sephadex, CM-sepharóza S-sepharóza. 1 ml předem upraveného kationtového měniče (například 1 gram pryskyřice CM-Sephadex C-50 nabobtná na 30 až 35 gramů vlhké váhy v roztoku 0,4% chloridu sodného) se smísí s 0,5 ml až 5 ml roztoku imunitního globulinu a míchá se při teplotě 0 až 5 °C po dobu 1 až 6 hodin. Suspenze se centrifuguje nebo filtruje, aby se získal IgG, který je adsorbovaný na pryskyřici. Může se použít také kontinuální systém.

V případě, že shora uvedené podmínky se používají ve spojení s kationtovým měničem, IgG se bude absorbovat, a po té následuje promytí proteinu adsorbovaného na pryskyřici kationického měniče. IgG se může vymýt například roztokem chloridu sodného o koncentraci 1,4 N.

Pak následují kroky shora popsaného postupu. IgG se vyčiří, diafiltruje a koncentruje se na požadovanou koncentraci. Jestliže je to nutné, může se přidat stabilizátor, jako je D-sorbitol, a nakonec se vše upraví tak, aby výtěžek roztoku kompozice obsahoval přibližně 100 mg/ml IgG a 50 mg/ml D-sorbitolu, přičemž hodnotu pH je 5,4. Roztok se pak sterilizuje filtry, které zachycují bakterie, a rozdělí se do zkumavek.

Jestliže je to nutné, mohou se se zde pospaným postupem kombinovat jiné postupy čištění imunitního globulinu. Jde například o krok čiření bentonitem, který je možné použít při snížení množství kallikreinů a pre-kallikreinového aktivátoru. Tento přístup se popisuje v příkladu 1.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: γ -globulin upravený tepelně a směsí rozpouštědlo-detergent

685 gramů kaše fr. II + IIIw se suspendovalo v přibližně 11,9 kg studené vody. Do suspenze se přidal roztok sole acetát sodný trihydrát tak, aby její konečná koncentrace byla přibližně 0,04 M, což umožňuje selektivně rozpustit IgG. Po 15 minutovém míchání se upravilo pH suspenze na hodnotu 4,8 za použití acetátového pufru s hodnotou pH 4,0. K suspenzi se přidal chlazený alkohol (95 %) tak, aby konečná koncentrace byla 17 %. Během přidání alkoholu se teplota suspenze postupně snižovala na teplotu -6 °C. Do suspenze se dále přidalo 303 gramů preparátu Celite 535, který je možné získat u firmy Celite Corporation tak, aby jeho konečná koncentrace byla

přibližně 2,0 %. Po míchání po dobu jedné hodiny se na tlakovém filtru odstranila kaše složená z preparátu Celite a frakce II obsahující nežádoucí protein, jako je plasmin, plasminogen, IgA a IgM. Filtrát se dále vyčeřil na filtrech o velikosti pórů 0,45 μm a 0,2 μm .

pH čištěného roztoku frakce II + III se upravilo na hodnotu 4,0 použitím 1,0 N kyseliny chlorovodíkové. Pak se roztok koncentroval ultrafiltrací na objem okolo 3,4 litrů (což je 1/5 původního objemu). Ke koncentrovanému roztoku se přidala studená voda v množství, které odpovídá množství odstraněnému první ultrafiltrací. Roztok se opět koncentroval ultrafiltrací na přibližně 1/5 původního objemu. Při tomto kroku koncentrace proteinu roztoku je přibližně 2 %. Roztok se dále koncentroval na 4 % a proběhla diafiltrace proti studené vodě až do okamžiku, kdy vodivost roztoku je nižší než 300 $\mu\text{S/cm}$, což brání agregaci a denaturaci proteinu během tepelné úpravy. Roztok se dále koncentroval na přibližnou koncentraci proteinu 8,8 %. Do roztoku se přidal D-sorbitol tak, aby konečná koncentrace byla přibližně 33 %. Po promíchání po dobu 30 minut se pH roztoku obsahujícího sorbitol upravilo na hodnotu 5,5 za použití 0,5 N hydroxidu sodného. Roztok se pak zahříval po dobu 10 hodin při teplotě 60 °C. Po ošetření při vyšší teplotě se k roztoku přidala studená voda v objemu, který odpovídá 3 násobku objemu roztoku ošetřeného vyšší teplotou a ředěný roztok se ochladil na teplotu 0 až 2 °C.

pH roztoku se upravilo na hodnotu 6,9 za použití 0,25 N hydroxidu sodného a k roztoku se přidal 50 % polyethylenglykol (PEG) 3350 tak, aby konečná koncentrace PEG byla 4 %. Koncentrace roztoku chloridu sodného se upravila na přibližnou koncentraci 8 mM, přičemž při pH 6,9 dochází ke srážení nečistot a agregátů. Takto vytvořená sraženina se odstranila filtrací. pH filtrátu se upravilo za použití 1,0 N kyseliny chlorovodíkové na hodnotu 4,8 a přidal se bentonit tak, aby výsledná koncentrace byla 0,25 %. pH suspenze bentonitu se

znovu upravilo na hodnotu 5,2, pak se suspenze filtrovala, aby se odstranil bentonit. pH filtrátu se upravilo na hodnotu 8,5 0,25 N hydroxidem sodíku a přidal se roztok 50 % PEG 3350 tak, aby konečná koncentrace PEG v roztoku byla 12 %. Takto vzniklá sraženina (čištěný imunitní globulin) se odstranil centrifugací.

Přibližně 175 gramů čištěné kaše imunitního globulinu získané, jak se uvádí shora v textu, se suspendovalo v přibližně 790 g 0,3 % roztoku chloridu sodného. pH suspenze se upravilo na hodnotu 5,5 a pak se suspenze míchala po dobu 2 hodin 30 minut. Do roztoku se přidalo 62 gramů dříve ekvilibrované pryskyřice DEAE-Sephadex A-50 (s 0,3 % chloridem sodným při pH 5,5) a suspenze se míchala po dobu 2 hodin. Suspenze se pak filtrovala, aby se odstranila pryskyřice. Po úpravě koncentrace chloridu sodného na hodnotu 0,4 % se do filtrátu přidala směs tri-n-butylfosfatu (TNBP) a polysorbátu 80 za vzniku roztoku, kde konečná koncentrace TNBP je 0,3 % a polysorbátu 80 je 1,0 %. Po celonoční inkubaci se pH roztoku upravilo na hodnotu 5,8 a přidalo se přibližně 860 gramů dříve ekvilibrovaného CM-Sephadex C-50 (s 0,4 % chloridem sodným při pH 5,8). Po míchání po dobu 2 hodin se suspenze filtrovala. Pak se pryskyřice CM-Sephadex promyla třikrát 0,3 % chloridem sodným a adsorbovaný IgG se eluoval 1,4 N chloridem sodným. Eluát se vyčeřil, diafiltroval a koncentroval se. Dále se přidal D-sorbitol a konečná úprava se provedla tak, aby vznikl roztok se složením přibližně 100 mg/ml IgG, 50 mg/ml D-sorbitolu při pH 5,4. Roztok se pak sterilizoval filtrací za použití sterilního filtru zachycujícího bakterie a rozdělil se do zkumavek. Krok používající bentonit je vhodný pro další snížení přítomnosti hypotenzních enzymů, jako je kallikrein a pre-kallikreinovým aktivátor.

Výsledky testů provedené s produktem z příkladu 1.

Testované parametry	
Anti-komplementární aktivita (CH ₅₀ U/mg IgG)	0,34
Čistota IgG (%)	100
Obsah IgG (mg/ml)	112,7
Prekallikrein (%CBER Ref#3)	21
Protilátky morbilli (% CBER Ref Lot. Č. 176)	0,67
Rozdělení molekul IgG podle velikosti pomocí HPLC	
% monoméru	82,2
% diméru	17,4
% fragmentů	0,10
% agregátů	0,3
Protilátky hepatitidy A (titr)	1:200
Protilátky hepatitidy B (titr)	1:1024
IgA (μg/ml)	22
IgM (μg/ml)	16
Plazminogen (μg/ml)	ND
Plazmin (μg/ml)	16
PH	5,4

ND nebylo detekováno

Příklad 2: : γ-globulin upravený tepelně a směsí rozpouštědlo-detergent

Jeden kilogram kaše fr. II + III se suspendoval ve 4,5 kg studené vody o teplotě 0 až 2 °C. Po míchání po dobu 1 hodiny se pH suspenze upravilo na hodnotu 5,0 s 1 N kyselinou chlorovodíkovou. Pak se suspenze míchala po dobu 3 hodin při pH 5,0 a sraženina se odstranila centrifugací . Dále se přidal D-sorbitol tak, aby jeho konečná koncentrace byla 33 % a vše se míchalo po dobu 1 hodiny. pH suspenze se upravilo na hodnotu 5,5 a pak se suspenze zahřívala při teplotě 60 °C po dobu 10 hodin. Po tepelné úpravě se přidala studená voda v množství, které odpovídá třinásobku objemu roztoku ošetřeného vyšší teplotou a ředěný roztok se ochladil na teplotu 0 až 2 °C. Dále se přidal 50 % roztok polyetylglykolu (PEG) 3350 tak, aby jeho konečná koncentrace byla 6 %. pH 6 % suspenze PEG se upravilo na hodnotu 5,7

pomocí 0,5 N hydroxidu sodného a suspenze se míchala po dobu 2 hodin. Pak se přidal kyselinou promytý celit 535 tak, aby konečná koncentrace byla 1,5 % a suspenze se míchala po dobu 1 hodiny. Sraženina spolu s celitem se odstranila filtrací. pH filtrátu se upravilo na hodnotu 8,8 hydroxidem sodným o koncentraci 0,5 N a koncentrace PEG se upravila na hodnotu 12 % přidáním 50 % roztoku PEG. pH 12 % suspenze PEG se znovu upravilo na hodnotu 8,8 a suspenze se míchala po dobu 1 hodiny. Suspenze se pak filtrovala za účelem získání čištěné kaše imunitního globulinu. Získalo se přibližně 251 g čištěné kaše imunitního globulinu.

251 gramů čištěné kaše imunitního globulinu, která se získala postupem popsaným shora v textu, se suspendovalo v přibližně 1,4 kg 0,3 % roztoku chloridu sodného. Po míchání po dobu jedné hodiny se upravilo pH suspenze na hodnotu 6,0 5 % kyselinou octovou. Po té, co se kaše zcela rozpustila, přidalo se do suspenze 104 gramů pryskyřice DEAE-Sephadex A-50 předem upravené 0,3 % chloridu sodného při pH 6,0, a vše se míchalo po dobu 2 hodin. Pryskyřice se odstranila filtrací. Filtrát se dále vyčeřil použitím filtru s velikostí pórů 0,2 μm . Koncentrace chloridu sodného se ve vyčeřeném roztoku zvýšila na 0,4 % přidáním dalšího chloridu sodného. K roztoku se dále přidala směs tri-n-butylofosfátu (TNBP) a polysorbátu 80 tak, aby konečná koncentrace TNBP byla 0,3 % a polysorbátu 80 1,0 %. Roztok se pak inkuboval po dobu 1 hodiny při teplotě 27 °C a nechal se stát přes noc v chladícím boxu při teplotě 4 °C. Další den se pH roztoku upravilo na hodnotu 5,8 a přidalo se 1,8 kg pryskyřice CM-Sephadex C-50 předem upravené 0,4 % chloridem sodným při pH 5,8. Po míchání po dobu 2 hodin se pryskyřice separovala filtrací. Po 3 násobném promytí pryskyřice CM-Sephadex chloridem sodným o koncentraci 0,3 % se adsorbovaný IgG eluoval 1,4 N chloridem sodným. Eluát se čiřil, diafiltroval a koncentroval. Přidal se D-sorbitol. Roztok se nakonec upravil tak, aby obsahoval přibližně 100

mg/ml IgG a přibližně 50 mg/ml sorbitolu. Roztok se rozdělil do dvou částí, na část A a B. pH části A se upravil na 5,4 a části B na pH 4,3. Roztoky části A a B se pak jednotlivě sterilizovaly filtrací za použití sterilizovaných filtrů zadržujících bakterie a rozdělily se do zkumavek.

Výsledky testů provedené s produktem z příkladu 2.

Testované parametry		
Anti-komplementární aktivita (CH ₅₀ U/mg IgG)	<0,05	
Čistota IgG (%)	100	
Obsah IgG (mg/ml)	104,2	
Prekallikrein (%CBER Ref#3)	ND	
Protilátky diftérie (antitoxin U/ml)	8,2	
Rozdělení molekul IgG podle velikosti pomocí HPLC	pH5,4	pH4,3
% monoméru	88,8	97,5
% diméru	10,9	2,3
% fragmentů	0,3	ND
% agregátů	<0,3	<0,3
Protilátky hepatitidy A (titr)	1:100	
IgA (μg/ml)	78	
IgM (μg/ml)	28	
Kallikrein (A ₄₀₅)	0,09	
Plazminogen (ng/ml)	<8,4	
Plazmin (μg/ml)	<8,4	

ND nebylo detekováno

Variace vynálezu jsou odborníkovi zřejmé.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy intravenózně aplikovatelného roztoku gama-globulinu, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

- (a) tepelnou úpravu znečištěného roztoku gama-globulinu za časových a teplotních podmínek, které jsou dostatečné pro deaktivaci virů citlivých na teplotu,
- (b) dělení tepelně upraveného roztoku gama-globulinu za použití polyetylenglykolu, přičemž se získá čištěný roztok gama-globulinu a
- (c) úpravu čištěného roztoku gama-globulinu organickým rozpouštědlem, při čemž dochází k deaktivaci virů s obalem.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e znečištěný roztok gama-globulinu je Cohnova frakce I + II + III, Cohnova frakce II + III, Cohnova frakce II + IIIw nebo Cohnova frakce II.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e znečištěný roztok gama-globulinu prochází alespoň jedním krokem čištění před tím, než dojde k tepelné úpravě (a).

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tepelná úprava (a) se provádí při přibližné teplotě 50 až 70 °C po dobu přibližně 10 až 100 hodin.

5. Způsob podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e tepelná úprava (a) se provádí po dobu přibližně 10 hodin při teplotě přibližně 60 °C.

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e dělení za použití polyetylenglykolu probíhá alespoň ve

dvou fázích, kdy se v první fázi odstraňují nečistoty ve formě srážedla a ve druhé fázi se odstraňuje jako srážedlo gama-globulin.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e organické rozpouštědlo používané v kroku (c) je alkylfosfat.

8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e organické rozpouštědlo používané v kroku (c) je alkylfosfosfat.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e alkylfosfat je tri-n-butyfosfat.

10. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e organické rozpouštědlo obsahuje detergent.

11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e organické rozpouštědlo obsahuje detergent.

12. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e po kroku (a) se roztok gama-globulinu upravuje pryskyřicí aniontového měniče a pryskyřicí kationtového měniče.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e úprava pryskyřicí aniontového měniče se provádí dříve než krok (c) a úprava pryskyřicí kationtového měniče se provádí po kroku (c).

14. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e krok čiření bentonitem se provádí po první fázi dělení polyetylenglykolem.

15. Intravenózně aplikovatelný roztok gama-globulinu,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se produkuje způsobem
podle nároku 1.

16. Intravenózně aplikovatelný roztok gama-globulinu,
v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e se produkuje způsobem
podle nároku 1.