



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112014020602-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 25/02/2013

**(45) Data de Concessão:** 20/12/2022

**(54) Título:** MÉTODO PARA A FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA IGG ENRIQUECIDA

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/06; A61K 39/395; A61K 35/16; C07K 1/30.

**(30) Prioridade Unionista:** 23/02/2012 US 61/602488.

**(73) Titular(es):** TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED.

**(72) Inventor(es):** LEOPOLD BRUCKSCHWAIGER; THOMAS GUNDINGER; JULIA NUERNBERGER; WOLFGANG TESCHNER; HANS-PETER SCHWARZ.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2013027681 de 25/02/2013

**(87) Publicação PCT:** WO 2013/126904 de 29/08/2013

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 21/08/2014

**(57) Resumo:** MÉTODO PARA A FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA IgG ENRIQUECIDA. Entre outros aspectos, a presente invenção fornece métodos para a fabricação de composições de proteína do sangue do plasma agrupado. Em uma modalidade, a invenção fornece um esquema de fracionamento de álcool que permite aumentos significativos no rendimento de proteínas do sangue purificado a partir da amostra de plasma inicial. Em uma modalidade específica, um método para fracionamento de plasma agrupado é fornecido, o método compreendendo um pH inicial baixo, etapa de precipitação de álcool elevada. A presente invenção fornece também composições farmacêuticas de proteínas terapêuticas do sangue.

## “MÉTODO PARA A FABRICAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO DE IMUNOGLOBULINA IgG ENRIQUECIDA”

### REFERÊNCIAS CRUZADAS AOS PEDIDOS

[0001] Este pedido reivindica prioridade ao Pedido de Patente Provisório US Série N° 61/602488 depositado em 23 de fevereiro de 2012, cuja divulgação é aqui incorporada por referência na sua totalidade para todos os fins.

### FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] Produtos de imunoglobulina de plasma humano foram utilizados pela primeira vez em 1952 para tratar a deficiência imunológica. Inicialmente, a administração intramuscular ou subcutânea de isótopo de imunoglobulina G (IgG) isolado a partir de plasma eram os métodos de escolha. No entanto, estes métodos não permitiram a administração de grandes quantidades de IgG necessárias para um tratamento eficaz de várias doenças. Assim, os produtos de IgG que podem ser administrados por via intravenosa, foram desenvolvidos. Geralmente, a imunoglobulina intravenosa (IVIG) contém a imunoglobina agrupada G (IgG) do plasma de mais de um milhão de doadores de sangue. As preparações contêm geralmente mais do que 95% de IgG não modificada, que possui funções efetoras dependentes de Fe intactas e apenas quantidades vestigiais de imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina M (IgM). Tipicamente, IVIGs são esterilizadas por filtração e o processo de fabricação inclui os estágios para inativar e/ou remover vírus. Estes produtos IgG purificados são utilizados principalmente no tratamento de três categorias principais de condições médicas: (1) deficiências imunes: agamaglobulinemia ligada ao X, hipogamaglobulinemia (imunodeficiências

primárias), e condições de imunidade comprometidas adquiridas (imunodeficiências secundárias), apresentando baixos níveis de anticorpos; (2) doenças inflamatórias e autoimunes; e (3) infecções agudas.

[0003] Especificamente, muitas pessoas com imunodeficiências primárias não têm anticorpos necessários para resistir à infecção. Em certos casos, essas deficiências podem ser complementadas pela infusão de IgG purificada, comumente através administração intravenosa (ou seja, a terapia de IVIG). Várias imunodeficiências primárias são comumente tratadas na moda, incluindo Agamaglobulinemia ligada a X (ALX), imunodeficiência comum variável (ICV), síndrome de hiper-IgM (HIM), imunodeficiência grave combinada (SCID), e algumas deficiências das subclasses de IgG ((Blaese and Winkelstein, *J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases*. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007).

[0004] Embora o tratamento de IgG possa ser muito eficaz para a gestão das doenças imunodeficiência primária, esta terapia é apenas uma substituição temporária de anticorpos que não estão sendo produzidos no corpo, em vez de uma cura para a doença. Assim, os pacientes dependem de doses repetidas de terapia IgG, geralmente uma vez por mês por toda a vida. Esta terapia coloca uma grande demanda na produção contínua de composições IgG. No entanto, ao contrário de outros produtos biológicos que são produzidos via expressão in vitro de vetores de DNA recombinante, IgG é fracionado a partir de sangue humano e de doações de plasma. Assim, o nível de IgG comercialmente disponível é limitado pelo fornecimento disponível de doações de sangue e de plasma.

[0005] Vários fatores impulsionam a demanda por IgG, incluindo a aceitação de tratamentos de IgG, a identificação de indicações adicionais para a terapia de IgG é eficaz e aumentando o diagnóstico do paciente e prescrição IgG. Notadamente, a demanda mundial de IgG mais do que quadruplicou

entre 1990 e 2009, e continua a aumentar a uma taxa anual entre 7% e 10% (Robert P., *Pharmaceutical Policy and Law*, 11 (2009) 359-367). Por exemplo, a Autoridade Nacional de Sangue Australiana informou que a demanda por IgG na Austrália cresceu de 10,6% para o ano fiscal de 2008-2009 (Relatório Anual da Autoridade Nacional de Sangue Australiana 2008-2009).

[0006] Devido em parte à crescente demanda global e as flutuações na oferta disponível de produtos de imunoglobulina, vários países, incluindo Austrália e Inglaterra, têm programas de gestão da demanda implementados para proteger o abastecimento desses produtos para a mais alta demanda de pacientes durante períodos de escassez de produtos.

[0007] Tem sido relatado que, em 2007, 26,5 milhões de litros de plasma foram fracionados, gerando 75,2 toneladas métricas de IgG, com um rendimento de produção média de 2,8 gramas por litro (Robert P., *supra*). Este mesmo relatório estima que os rendimentos globais de IgG devem aumentar para cerca de 3,43 gramas por litro até 2012. No entanto, devido ao contínuo crescimento da demanda global por IgG, projetada entre 7% e 13% ao ano até 2015, melhoria do rendimento IgG total será necessária para atender à demanda global.

[0008] Um número de métodos de preparação de IgG são utilizados por fornecedores comerciais de produtos de IgG. Um problema comum com os métodos atuais de produção de IgG é a perda substancial de IgG durante o processo de purificação, estima-se que pelo menos 30% a 35% do teor de IgG total do material de partida. Uma dificuldade consiste em manter a qualidade de inativação viral e remoção de impurezas que podem causar reações adversas, melhorando a eficiência do processo para aumentar o rendimento de IgG. Nos níveis atuais de produção de IgG, o que pode ser considerado um pequeno aumento no rendimento é de fato altamente significativo. Por exemplo, em 2007 os níveis de produção, um aumento de 2% na eficiência,

igual a um adicional de 56 miligramas por litro, geraria 1,5 toneladas adicionais de IgG.

[0009] No quarto capítulo de uma série de artigos seminais publicados sobre a preparação e as propriedades das proteínas de soro e plasma, Cohn et al. (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475) descreveram pela primeira vez um método para o fracionamento de álcool de proteínas do plasma (método 6), que permite o isolamento de uma fração enriquecida em IgG a partir de plasma humano. Alguns anos mais tarde, Oncley *et al.* (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550) explicou os métodos de Cohn publicando um método (Método 9) que resultou no isolamento de uma preparação de IgG mais pura.

[0010] Estes métodos, enquanto que estabelecem as bases para uma indústria inteira de proteínas do sangue derivadas do plasma, não foram capazes de fornecer Preparações de IgG com suficientemente elevado grau de pureza para o tratamento de várias doenças autoimunes, incluindo a síndrome de Kawasaki, púrpura trombocitopênica imunológica, e imunodeficiências primárias. Como tal, as metodologias adicionais utilizando várias técnicas, tais como a cromatografia de troca iônica, foram desenvolvidas para proporcionar formulações de pureza de IgG mais elevadas. Hoppe et al (Munch Med Wochenschr 1967 (34): 1749-1752), Falksveden (Patente Sueca No. 348942), e Falksveden e Lundblad (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980) foram os primeiros a empregar cromatografia de troca iônica para esta finalidade.

[0011] Vários métodos modernos para a purificação das imunoglobulinas a partir de plasma empregam um estágio de precipitação, como precipitação caprilato (Lebing et al., Vox Sang 2003 (84): 193-201) e precipitação com etanol de Fração Cohn (I+) II + III (Tanaka et al. Braz J Med Biol Res 2000 (33), 37-30) acoplada à cromatografia em coluna. Mais recentemente, Teschner et al (Vox Sang, 2007 (92): 42-55) descrevem um método para a produção de um produto de IgG de 10% em que crio-

precipitado é removido em primeiro lugar a partir de plasma reunido e, em seguida, um fracionamento com etanol frio Cohn-Oncley então modificado é executado, seguido por tratamento S/D da cromatografia de permuta intermédia, de íons, de nanofiltração, e opcionalmente ultrafiltração/diafiltração.

[0012] Apesar da pureza, segurança, e rendimento proporcionados por estes métodos de isolamento de IgG, o rendimento de IgG recuperado a partir de plasma pode ainda ser melhorado. Por exemplo, Teschner et al. relatam que os seus métodos resultam num aumento de rendimento de IgG de 65% (Teschner et al. Supra). Como relatado nas várias reuniões de produtos de plasma, os rendimentos médios para a preparação em larga escala de IgG, tal como da Baxter, CSL Behring, Upfront Technology, Cangene, Prometric BioTherapeutics e da Cruz Vermelha finlandesa, variam de cerca de 61% a cerca de 65 % no recipiente final. Embora melhor do que os métodos anteriormente empregados, esta quantidade de recuperação de IgG ainda representa uma perda de, pelo menos, cerca de um terço do IgG presente na fração de plasma reunido, durante o processo de isolamento.

[0013] Devido à quantidade limitada de plasma disponível para a fabricação de produtos derivados do plasma, o isolamento de diversas proteínas de sangue a partir de um conjunto de plasma de partida comum pode ser conseguido através da integração das purificações em um único quadro. Por exemplo, o IgG é geralmente enriquecido através da formação de uma precipitação de Fração Cohn II + III ou precipitação de Kistler-Nitschmann A, os sobrenadantes correspondentes dos quais são então utilizados para a fabricação de alfa-1-antitripsina (A1PI) e albumina. Similarmente, vários métodos têm sido descritos para a fabricação do Fator H de subprodutos formados durante a produção das imunoglobulinas IgG, incluindo WO 2008/113589 e WO 2011/011753.

[0014] Como tal, existe uma necessidade para métodos melhorados e

mais eficazes para a fabricação de produtos terapêuticos de IgG. Além disso, estes métodos também devem permitir a fabricação de produtos derivados de plasma adicional a partir de uma única fonte de plasma. A presente invenção satisfaz estas e outras necessidades proporcionando métodos de isolamento de IgG que produzem rendimentos que são aproximadamente 20 a 25% maior do que atualmente possível, assim como composições de IgG ali fornecidas. Com vantagem, os métodos aqui previstos permitem o co-isolamento de outras proteínas derivadas do plasma terapeuticamente importante, incluindo alfa-1-antitripsina (A1PI), fator H, proteínas inibidoras inter-alfa (IaIP), complexos de protrombina, fator VII (FVII), Fator VIII (FVIII), antitrombina III (AT III), fibrinogênio, butirilcolinesterase, e outros.

### **BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

[0015] Os métodos atuais para a produção de IVIG e alfa-1-antitripsina (A1PI) dependem de vários estágios de precipitação de proteína para separado para imunoglobulina IgG e A1PI de outros componentes encontrados no plasma humano. Por exemplo, muitos fabricantes utilizam uma variação do método de Cohn-Oncley 6, no qual três estágios iniciais de precipitação de álcool são utilizados. O primeiro estágio de precipitação, referido como Precipitação de Fração I, é realizada a um pH elevado (7,2) e baixa concentração de etanol (8-10% v/v) para precipitar proteína, tais como o fibrinogênio e o Fator XIII de distância a partir de IgG e A1PI, que permanecem no sobrenadante. IgG é então precipitado a partir da fração I sobrenadante numa segunda reação de precipitação, referido como uma precipitação de Fração II + III, realizada a um pH moderado (6,8) e de elevada concentração de etanol (20%-25%). A maior parte do A1PI permanece no sobrenadante da reação de precipitação da Fração II + III, como é subsequentemente separada da albumina numa terceira reação de precipitação inicial, denominada como uma precipitação de Fração I-IV-1, realizada a um pH baixo (5,2) e a concentração de etanol moderado (18%).

[0016] Infelizmente, uma vez que o método de Cohn-Oncley descrito acima, bem como o processo de Kistler-Nitschmann comparável que emprega quatro precipitações iniciais para fracionar IgG e A1PI, os componentes individuais separados através de uma série complexa de reações de precipitação, o fracionamento é ineficiente. Uma perda significativa no rendimento de IgG e A1PI, nestes estágios iniciais de precipitação, pode ser atribuída à precipitação parcial em frações não segmentadas, bem como a precipitação incompleta, nas frações segmentadas. Por exemplo, o IgG co-precipita em certa medida, com o fibrinogênio e o Fator XIII, no precipitado da Fração I e algum IgG não é precipitado por precipitação da Fração II + III. Após clarificação de um precipitado da Fração II + III, o rendimento de IgG é tipicamente entre 75% e 85% de IgG presente no conjunto de Cohn. Por conseguinte, de 15% a 25% do teor de IgG total de material de partida é perdido após estas duas etapas de fracionamento.

[0017] A presente divulgação melhora a recuperação de IgG e A1PI do plasma reunido, removendo a necessidade de múltiplos estágios iniciais de precipitação. Em vez disso, os métodos descritos dependem de um único estágio inicial de precipitação que captura todas as proteínas normalmente precipitadas na Fração I, Fração II + III, e precipitações da Fração IV-1 combinadas. Este estágio único de precipitação é aqui referido como uma "precipitação de Fração I + II + III + IV-1" uma "precipitação de Fração I-IV-1", ou um "baixo pH inicial, precipitação de álcool elevado". Com vantagem, foi encontrado que a IgG e A1PI pode ser eficientemente extraída da Fração IV-I-1 precipitada sem a utilização de precipitações subsequentes proteína. Além disso, verificou-se que a fração I-IV-1 precipitada continha quase todo o teor de A1PI e IgG de plasma de origem, enquanto que a albumina permanece no sobrenadante. Tomados em conjunto, estas vantagens resultam num aumento significativo na recuperação global destes produtos comerciais importantes.



[0018] Como mostrado nos Exemplos, a utilização de um pH baixo, de alta álcool estágio de precipitação (Fração I-IV-1 de precipitação) como um estágio inicial na purificação de IgG a partir do crio-sobrenadante, permite a produção de composições de IgG de grau farmacêutico com rendimentos sem precedentes de 4,3-4,7 g plasma de origem IgG/L. Estes rendimentos representam um 20% a 25% de aumento aproximado de rendimento em comparação com os processos de fabricação do estado da técnica, tais como as utilizadas para fabricar GAMMAGARD LIQUID® (Baxter International, Deerfield, IL) a partir do mesmo tipo de plasma.

[0019] Assim, entre outros aspectos, a presente invenção prevê um novo processo de fracionamento de plasma, que separa o plasma ou crio-sobrenadante em um estágio inicial em uma Fração I-IV-1 e um precipitado da Fração I-IV-1 de sobrenadante. A Fração I-IV-1 precipitada contém quase todas as imunoglobulinas (por exemplo, IgG, IgA, e IgM) e um inibidor de elastase de alfa 1 (A1PI), enquanto que o sobrenadante contém principalmente a albumina.

[0020] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida a partir de um conjunto de Cohn, o método compreendendo os estágios de: (a) co-imunoglobulinas precipitadas e alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de crio-sobrenadante, num primeiro estágio de precipitação, de modo a formar um primeiro precipitado e um primeiro sobrenadante; (b) solubilizar as imunoglobulinas do primeiro precipitado, para formar uma primeira suspensão que tem uma porção solúvel que compreende imunoglobulinas e uma porção insolúvel compreendendo A1PI; (c) separar a porção solúvel da primeira suspensão a partir da porção insolúvel da primeira suspensão; e (d) recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida.

[0021] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro

estágio de precipitação é um estágio de precipitação com álcool.

[0022] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, o estágio de precipitação com álcool compreende a adição de etanol ao crio-sobrenadante para alcançar uma concentração final de entre 20% e 30% de etanol (v/v) a um pH de 5 a 6.

[0023] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a concentração final de etanol na primeira etapa de precipitação é de  $25 \pm 4\%$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a concentração final de etanol seja de  $25 \pm 3\%$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a concentração final de etanol seja de  $25 \pm 2\%$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a concentração final de etanol seja de  $25 \pm 1\%$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a concentração final de etanol a 25%.

[0024] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o pH do primeiro estágio de precipitação é de  $5,5 \pm 0,4$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o pH é de  $5,5 \pm 0,3$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o pH é de  $5,5 \pm 0,2$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o pH é de  $5,5 \pm 0,1$ . Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o pH é de 5,5.

[0025] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o pH é mantido durante todo o período do primeiro estágio de precipitação.

[0026] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro estágio de precipitação com álcool compreende a adição do álcool por pulverização.

[0027] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro estágio de precipitação com álcool compreende a adição do álcool a um local adjacente a um impulsor. Numa outra modalidade, o álcool é introduzido na solução em mais de um local. Numa modalidade, o álcool é introduzido na solução em uma pluralidade de pequenos portos. Numa modalidade

específica, os múltiplos locais de adição de álcool estão localizados em ou perto de uma ou impulsor outro elemento dispersivo. Numa outra modalidade, o álcool é introduzido na solução por meio de uma porta do difusor que compreende uma pluralidade de aberturas. Numa modalidade específica, uma ou mais das respectivas aberturas na pluralidade de aberturas na porta difusor está localizado no ou próximo a um impulsor, ou outro elemento dispersivo.

[0028] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro estágio de precipitação é realizado a uma temperatura de desde -3°C a - 10°C. Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro estágio de precipitação é realizado a uma temperatura desde -5°C a -9°C.

[0029] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro precipitado é suspenso com 4 L de 60 L de tampão por kg de precipitado. Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro precipitado é suspenso a partir de 8 L de 15 L de tampão por kg de precipitado.

[0030] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a primeira suspensão tem um pH de 4,0 a 5,4. Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a primeira suspensão tem um pH de 4,7-5,1.

[0031] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a primeira suspensão tem uma condutividade de 0 mS/cm a 4 mS/cm. Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a primeira suspensão tem uma condutividade de 0,5 mS/cm a 2 mS/cm.

[0032] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o primeiro precipitado é suspenso num tampão compreendendo acetato e/ou fosfato.

[0033] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a porção solúvel da primeira suspensão é separada da porção insolúvel da primeira suspensão, por centrifugação ou filtração.

[0034] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, o estágio de separar a porção solúvel da primeira suspensão a partir da porção insolúvel da primeira suspensão compreende: (i) a mistura de dióxido de silício finamente

dividido ( $\text{SiO}_2$ ), com a primeira suspensão; e (ii) a separação a partir da suspensão de  $\text{SiO}_2$ .

[0035] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, o dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ) tem uma área de superfície média de desde  $350 \text{ m}^2/\text{g}$  a  $410 \text{ m}^2/\text{g}$ .

[0036] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, o dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ) é adicionada à primeira suspensão com uma concentração final de 15 g/kg primeiro precipitado a 80 g/kg primeiro precipitado.

[0037] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende as etapas de: (a) de precipitação de imunoglobulinas a partir de crio-sobrenadante, em uma primeira etapa de precipitação, com entre 24% e 26% de álcool com um pH de entre 5,3 e 5,7 e temperatura entre  $-6^\circ\text{C}$  e  $-8^\circ\text{C}$ , para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; (b) a suspensão do primeiro precipitado, para formar uma primeira suspensão; (c) tratamento da primeira suspensão com dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ); (d) separação da fração solúvel da primeira suspensão da fração insolúvel da primeira suspensão; e (e) recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida.

[0038] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a composição de imunoglobulina enriquecida contém pelo menos 90% do teor de imunoglobulina IgG presente no conjunto Cohn utilizado no estágio (a).

[0039] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a composição de imunoglobulina enriquecida contém pelo menos 95% do teor de imunoglobulina IgG presente no conjunto Cohn utilizado no estágio (a).

[0040] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende ainda os estágios de (f) imunoglobulinas precipitadas a partir da fração solúvel da primeira suspensão, em uma segunda etapa de precipitação, para obter um segundo precipitado e um segundo sobrenadante; (g) a segunda

suspensão precipitada para formar uma segunda suspensão; e (h) recuperar a fração solúvel da segunda suspensão, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida.

[0041] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o segundo estágio de precipitação é um estágio de precipitação com álcool.

[0042] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o segundo estágio de precipitação com álcool compreende a adição de etanol para a fração solúvel da primeira suspensão para alcançar uma concentração final de entre 22% e etanol a 28% a um pH entre 6,5 e 7,5.

[0043] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o segundo estágio de precipitação com álcool compreende a adição do álcool por pulverização.

[0044] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o segundo estágio de precipitação com álcool compreende a adição do álcool a um local adjacente a um impulsor. Numa outra modalidade, o álcool é introduzido na solução em mais de um local. Numa modalidade, o álcool é introduzido na solução em uma pluralidade de pequenos portos. Numa modalidade específica, os múltiplos locais de adição de álcool estão localizados em ou perto de um impulsor, ou outro elemento dispersivo. Numa outra modalidade, o álcool é introduzido na solução por meio de uma porta do difusor que compreende uma pluralidade de aberturas. Numa modalidade específica, uma ou mais das respectivas aberturas na pluralidade de aberturas na porta difusor está localizado no ou próximo a um impulsor, ou outro elemento dispersivo.

[0045] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o segundo estágio de precipitação é realizado a uma temperatura entre -3°C e -10°C.

[0046] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a composição de imunoglobulina enriquecida contém pelo menos 90% do teor de IgG presente no crio-sobrenadante utilizado no estágio (a).

[0047] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a

composição de imunoglobulina enriquecida contém pelo menos 95% do teor de IgG presente no crio-sobrenadante utilizado no estágio (a).

[0048] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende ainda uma etapa de cromatografia de permuta aniônica de enriquecimento.

[0049] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende ainda uma etapa de cromatografia de permuta catiônica de enriquecimento.

[0050] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende ainda um estágio de remoção ou inativação viral.

[0051] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende um solvente/detergente (S/D), estágio de inativação viral.

[0052] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende um estágio de nanofiltração.

[0053] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método compreende um estágio de incubação da composição a um pH de 4,0 a 5,0 e temperatura de 20°C a 40°C durante pelo menos uma semana.

[0054] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a composição final de IgG enriquecido compreende, pelo menos, 98% de IgG.

[0055] Em uma modalidade dos métodos descritos acima, a composição final de IgG enriquecido compreende, pelo menos, 99% de IgG.

[0056] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método produz pelo menos 4 g de IgG por L de crio-sobrenadante usada no estágio (a).

[0057] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método produz, pelo menos, 4,25 g de IgG por L de crio-sobrenadante usada no estágio (a).

[0058] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o método produz, pelo menos, 4,5 g de IgG por L de crio-sobrenadante usada no estágio

(a).

[0059] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a alfa-1-antitripsina (A1PI) é ainda purificada a partir de uma fração insolúvel da primeira suspensão.

[0060] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o fibrinogênio é ainda mais purificado a partir de uma fração insolúvel da primeira suspensão

[0061] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, o Fator H é ainda purificado a partir de uma fração insolúvel da primeira suspensão.

[0062] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, um alfa-tripsina inibidor de Inter proteína (IaIp) é ainda purificada a partir de uma fração insolúvel da primeira suspensão.

[0063] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a fração insolúvel da primeira suspensão é tratada com dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ).

[0064] Em uma modalidade dos métodos acima descritos, a albumina é ainda purificada a partir do primeiro sobrenadante.

[0065] Em um aspecto, a presente invenção prevê uma composição de imunoglobulina enriquecida preparado por um método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 63.

[0066] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para o tratamento de uma deficiência imune, uma doença inflamatória, uma doença autoimune, ou uma infecção aguda em um indivíduo em necessidade do mesmo, compreendendo o método a administração de uma composição de imunoglobulina enriquecida reivindicação 64 para o sujeito.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[0067] Figura 1. Diagrama de um sistema de fracionamento de plasma de acordo com uma modalidade aqui descrita.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

## **I. Introdução**

[0068] Entre outros aspectos, a presente invenção prevê um método mais eficiente para o isolamento de proteínas terapêuticas de plasma reunido. Os métodos aqui previstos para o fracionamento do plasma reunido proporciona rendimentos mais elevados de várias proteínas do sangue terapeuticamente importantes derivados de plasma, incluindo imunoglobulinas e alfa-1-antitripsina (A1PI). Em um aspecto particularmente importante, a presente invenção prevê métodos que aumentam significativamente o rendimento de imunoglobulina G (IgG), isolado a partir de plasma, em comparação com os métodos do estado da técnica utilizadas para a fabricação de composições terapêuticas IgG. Numa modalidade, estes rendimentos melhorados são obtidos através da precipitação de imunoglobulinas e AIP1 partir de uma amostra de plasma de partida (aqui referido como um "conjunto de Cohn") sob a pH baixo, as condições de álcool elevado. O estágio de elevada precipitação de álcool, pH baixo resulta numa captura de massa da composição de imunoglobulina a partir do conjunto de Cohn. Em comparação com os processos de fabricação do estado da técnica da imunoglobulina, os métodos aqui previstos reduzem significativamente a quantidade de imunoglobulina perdida durante o fracionamento do plasma a montante.

[0069] Os métodos da invenção reduzem o número de etapas de precipitação de proteínas necessárias para o isolamento de proteínas a partir de plasma humano em purezas suficientemente elevada para a administração terapêutica, ao mesmo tempo aumentando o rendimento da recuperação de proteínas do sangue terapeuticamente importantes, tais como a imunoglobulina G (IgG). Especificamente, os métodos eliminam a necessidade de um pH inicial elevado, baixa estágio de precipitação de álcool, comumente designado a uma precipitação de Fração I, utilizados em processos de fabricação de derivados de regimes de fracionamento de



Deutsch, Cohn-Oncley, Kistler-Nitschmann. Em vez disso, os métodos aqui previstos empregam um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool (aqui referido como precipitação de Fração I-IV-1) que compartimenta a grandes quantidades de IgG, IgA, IgM, e teor de alfa-1-antitripsina (A1PI) do plasma no precipitado e a maior parte da albumina no sobrenadante. IgG é então separada de IgA, IgM, e A1PI através de vários meios, o que resulta em composições de IgG de alto rendimento. Em comparação com os métodos que empregam uma etapa de precipitação da fração I, a captura de massa de IgG na etapa de precipitação da fração inicial I-IV-1 aumenta o rendimento final do processo de fabricação, pelo menos, 10 a 25%.

[0070] E.J. Cohn estabeleceu pela primeira vez um método para o fracionamento de plasma com etanol, em vez de sais, em 1946. Desde essa altura, tornou-se a precipitação com etanol o método de escolha para a fabricação em grande escala de produtos derivados do plasma, tais como IgG e A1PI. Tipicamente, estes processos de fabricação empregam uma série de estágios de fracionamento de etanol, proporcionando várias frações brutas de proteínas derivadas do plasma do sangue, que são ainda enriquecidas por vários procedimentos/técnicas a jusante diferentes.

[0071] Os procedimentos de Cohn foram inicialmente desenvolvidos para obter albumina de pureza relativamente elevada (95%) por precipitação fracionada com álcool. No entanto, foi rapidamente percebido por Oncley et al., Deutsch et al. e Kistler e Nitschmann que um precipitado de proteína particular (Fração II + III) do método de Cohn número 6 pode ser usado como um material de partida para a purificação de composições de imunoglobulina altamente enriquecidas. A fim de alcançar a mais alta pureza e segurança necessários para a administração intravenosa de composições de IgG, vários estágios de polimento e purificação (por exemplo, adsorção, em geral ou todas as técnicas cromatográficas diferentes, fluxo de filtração transversal, etc) foram adicionados a processos de fabricação de IgG após as etapas de

fracionamento de álcool.

[0072] Tipicamente, Fabricação de IgG confia em um precipitado de Cohn método 6 de Fração II + III, ou um Precipitado A de Kistler-Nitschmann como material de partida para o processamento a jusante. Ambas as frações são formadas por um processo de dois estágios em que: i.) Proteínas, tais como fibrinogênio e Fator XIII são removidos por um estágio de precipitação (Precipitação de Fração I) realizado a um pH elevado (7,2), com baixa concentração de etanol (8-10% v/v); e ii.) IgG é precipitada a partir da fração I sobrenadante a pH 6,8 com 20-25% (v/v) de etanol (Fração II + III) ou a um pH de 5,85 com 19% de etanol (v/v) de etanol (precipitado A), enquanto que a albumina e uma porção significativa do A1PI permanecem no sobrenadante. No entanto, o uso de uma fração II + III precipitada ou precipitado A como material de partida para a fabricação de composições de IgG resulta na perda de IgG em várias etapas do processo, conforme descrito acima.

[0073] Para superar estes problemas, os inventores desenvolveram um estágio inicial de purificação, que co-precipita imunoglobulinas e A1PI para proporcionar um material de partida que contém quase todo o teor de A1PI e IgG de plasma de origem, enquanto que a albumina permanece no sobrenadante. Este estágio de fracionamento entra em colapso, essencialmente, as etapas de precipitação fracionais I, II e III, e IV-1, tal como descrito por Oncley et al. (Supra), numa única reação de precipitação, aqui referido como precipitação de fração I + II + III + IV-1 (ou fração I-IV-1).

[0074] Em um aspecto, a presente invenção prevê um processo para a fabricação de uma composição de elevado rendimento para a imunoglobulina intravenosa, subcutânea ou intramuscular usando uma fração I-IV-1 precipitada como material de partida. Em várias modalidades, o método compreende ainda a separação de alfa-1-antitripsina (A1PI) em uma fração

insolúvel de uma suspensão formada durante a extração de imunoglobulina da Fração I-IV-1 precipitada. A fração insolúvel separada pode então ser utilizado como um material de partida para a fabricação de uma composição de A1PI derivada de plasma.

[0075] Numa modalidade, a presente invenção fornece métodos para a fabricação de uma composição terapêutica de uma proteína isolada a partir de plasma reunido. Em algumas modalidades, estes métodos de fabricação incluem um baixo pH inicial, elevado de álcool (por exemplo, etanol), o estágio de precipitação que aumenta a recuperação de várias proteínas do sangue, em comparação com os métodos tradicionais. Em algumas modalidades, os métodos são úteis para a fabricação de uma ou mais composições terapêuticas contendo uma imunoglobulina (por exemplo, IgG), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, fator H, ou um inibidor de inter-alfa-tripsina (I $\alpha$ I) proteína isolada a partir de sangue humano, no plasma, ou um seu derivado.

## **II. Definições**

[0076] Tal como aqui utilizado, o termo "tratamento de IgG" refere-se geralmente a um método terapêutico de via intravenosa, subcutânea, ou intramuscular de uma composição de imunoglobulinas IgG de um paciente para o tratamento de inúmeras condições, tais como as deficiências imunes, doenças inflamatórias e doenças autoimunes. As imunoglobulinas IgG são tipicamente reunidas e preparadas a partir de plasma. Anticorpos inteiros ou fragmentos podem ser utilizados. Imunoglobulinas IgG podem ser formuladas em concentrações mais elevadas (por exemplo, superior a 10%) para administração subcutânea, ou formuladas para administração intramuscular. Isto é particularmente comum para preparações de IgG de especialidade que são preparadas com títulos maior do que a média de antígenos específicos (por exemplo, o fator Rho D, toxina pertussis, tétano, toxina do botulismo, raiva, etc).

[0077] Tal como aqui utilizado, "crio-sobrenadante" refere-se ao sobrenadante criado após a remoção do crio-precipitado formado por descongelação de plasma ou de plasma reunido a temperaturas próximas de zero, por exemplo, a temperaturas abaixo de cerca de 10°C, de preferência a uma temperatura não superior a cerca de 6°C. No contexto da presente invenção, o plasma pode referir-se indiferentemente a plasma recuperado (isto é, o plasma que foi separado a partir de sangue total ex vivo) ou de plasma de origem (isto é, o plasma recolhido via plasmaférese). Crio--precipitação é geralmente realizada, por exemplo, por descongelação de plasma congelado reunido anteriormente, que já foi ensaiado para considerações de segurança e qualidade, apesar de também poderem ser utilizados no plasma fresco. Após o descongelamento completo do plasma congelado a uma temperatura baixa, a separação dos sólidos precipitados de crio-sobrenadante do líquido é executada no frio (por exemplo,  $\leq 6^{\circ}\text{C}$ ), por centrifugação ou filtração.

[0078] Tal como aqui utilizado, um "conjunto Cohn" refere-se ao material de partida usado para o fracionamento de uma amostra de plasma ou conjunto de amostras de plasma. Conjuntos Cohn podem incluir um ou mais de plasma completo, crio-sobrenadante, e o crio-sobrenadante que tenha sido submetido a um estágio de pré-processamento. Em certas modalidades, um conjunto de Cohn é uma amostra de crio-sobrenadante a partir do qual um ou mais fator de sangue foram removidos num estágio de pré-processamento, por exemplo, por adsorção sobre uma fase sólida (por exemplo, hidróxido de alumínio, dióxido de silício finamente dividido, etc), ou etapa de cromatografia (por exemplo, de permuta iônica ou cromatografia de afinidade de heparina). Várias proteínas do sangue, incluindo, mas não limitado ao Atividade de Desvio de Inibidor de Fator Oito (FEIBA), Fator IX-complexa, Fator VII, complexos de protrombina e/ou antitrombina III, pode ser isolado a partir da amostra de crio-sobrenadante antes de fracionamento.

[0079] Tal como aqui utilizado, o termo "composição enriquecido"

refere-se a uma composição de proteína isolados a partir de uma amostra de plasma, em que a pureza da proteína é maior do que a pureza da proteína na amostra de plasma de partida. Numa modalidade, uma proteína de uma composição enriquecida é pelo menos 25% mais pura do que na amostra de plasma de partida. Em outras modalidades, uma composição enriquecida é, pelo menos, 50%, 75%, 100%, 2 vezes, 3 vezes, 4 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, oito vezes, 9 vezes, 10 vezes, ou mais pura do que a amostra de plasma de partida. Por exemplo, uma composição de IgG enriquecidas em que 70% da proteína total é de IgG é de 7 vezes enriquecida quando comparada com uma amostra de plasma de partida, em que 10% da proteína total é IgG.

[0080] Tal como aqui utilizado, o termo "adição difusa" refere-se a um meio de adição de uma substância para um sistema de líquido de uma forma deslocalizada. Adição difusa pode ser conseguido, por exemplo, por pulverização ou por nebulização de um líquido (por exemplo, o álcool, o agente modificador de pH, solventes, detergentes, ou outro líquido) para um sistema de líquido (por exemplo, fração de plasma), a introdução de um líquido dentro de um sistema em múltiplos locais, a introdução de um líquido para um sistema que utiliza uma porta de difusor, a introdução de um líquido a ou próximo a um impulsor, ou outro elemento de dispersão ou distribuição de um produto químico presente num estado sólido através de uma área alargada de um sistema líquido.

[0081] Tal como aqui utilizado, o termo "pulverização" refere-se a um meio de entrega de uma substância líquida em um sistema, por exemplo, durante um estágio de precipitação com álcool, tal como uma etapa de precipitação de Fração I-IV-1, sob a forma de gotículas finas ou névoa da substância líquida. A pulverização pode ser conseguida por qualquer dispositivo de pressão, tal como um recipiente (por exemplo, um frasco de spray), que tem uma cabeça de pulverização ou de uma agulheta e é operado manualmente ou automaticamente para gerar uma névoa fina de um líquido.

Tipicamente, a pulverização é realizada, enquanto o sistema de recepção da substância líquida é agitado continuamente ou de outro modo misturados para assegurar a distribuição rápida e igual do líquido no interior do sistema.

[0082] Tal como aqui utilizado, o termo "solvente" inclui qualquer substância líquida capaz de dissolver ou dispersar um ou mais outras substâncias. Um solvente pode ser inorgânico na natureza, tal como a água, ou pode ser um líquido orgânico, tal como etanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, hexano, éter de petróleo, etc Tal como utilizado, o termo "tratamento com detergente solvente," solvente denota um solvente orgânico (por exemplo, fosfato de tri-N-butilo), o qual faz parte da mistura de detergente solvente utilizado para inativar vírus com invólucro lipídico numa solução.

[0083] Tal como aqui utilizado, o termo "detergente" é utilizado nesta aplicação alternadamente com o termo "agente tensioativo" ou "agente atuante de superfície." Os surfactantes são tipicamente compostos orgânicos que são anfifílicas, isto é, que contêm dois grupos hidrofóbicos ("cauda") e grupos hidrofílicos ("cabeça"), que tornam surfactantes solúveis em ambos os solventes orgânicos e água. Um surfactante pode ser classificado pela presença de grupos formalmente carregados na sua cabeça. Um tensioativo não-iônico não tem os grupos de carga na sua cabeça, ao estágio que um agente tensioativo iônico portador de uma carga líquida na sua cabeça. Um surfactante zwitteriônico contém uma cabeça com dois grupos com carga oposta. Alguns exemplos de surfactantes comuns incluem: Anionic (com base no sulfato, sulfonato ou ânions carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA ou PFO), sulfonato de perfluorooctano (PFOS), dodecil sulfato de sódio (SDS), sulfato de amônio laurilo, e outros sais de sulfato de alquilo, de laureth sulfato de sódio (também conhecido como éter de lauril sulfato de sódio, ou SLES), alquil benzeno sulfonato; catiônica (baseado em cátions de amônio quaternário): brometo de cetil trimetil (CTAB) aka hexadecílico trimetil

amônio brometo e outros sais alquiltrimetilamônio, cloreto de cetilpiridínio (CPC), polietoxilada amina de sebo (POEA), cloreto de benzalcônio (BAC), cloreto de benzetônio (BZT) ; Os ácidos gordos de cadeia longa e seus sais, incluindo o caprilato, o ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanóico, ácido heptanóico, ácido nanóico, ácido decanóico e análogos; Zwitteriônico (anfotérico): betaína de dodecilo; cocamidopropil betaína; Coco amfo glicinato; não iônico: alquilo poli (óxido de etileno), de alquilfenol de poli (óxido de etileno), copolímeros de poli (óxido de etileno) e poli (óxido de propileno) (conhecido comercialmente como poloxâmeros ou poloxaminas), alquilpoliglucósidos, incluindo octilglucósido, decilo maltósido, álcoois graxos (por exemplo, álcool cetílico e álcool oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polissorbatos (Tween 20, Tween 80, etc), os detergentes Triton e de óxido de dimetilamina de dodecilo.

[0084] Por "quantidade ou dose terapeuticamente eficaz" ou "quantidade suficiente/ou dose eficaz," entende-se uma dose que produz os efeitos para os quais foi administrada. A dose exata irá depender da finalidade do tratamento, e será determinável por um versado na técnica usando técnicas conhecidas (ver, por exemplo, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); and Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0085] Tal como aqui utilizados, os termos "baixo pH inicial, precipitação de álcool elevado" e "Fração I-IV-1 de precipitação" indiferentemente referem-se a precipitação das proteínas a partir de um conjunto de Cohn a uma concentração final de álcool (normalmente etanol) de entre 20% e 30% (v/v) e pH 5,0-6,0. Geralmente, a fração resultante I-IV-1 precipitada contém pelo menos 90% do teor de imunoglobulina do conjunto a partir de Cohn, de preferência pelo menos 95%, mais preferencialmente pelo

menos 98%, mais preferencialmente pelo menos 99% do teor de imunoglobulina o conjunto de partida Cohn. Numa modalidade preferida, as imunoglobulinas incluem imunoglobulinas IgG. Numa outra modalidade preferida, a alfa-1-antitripsina (A1PI) é co-precipitada com as imunoglobulinas na Fração I-IV-1 de precipitação.

### **III. Fracionamento de Plasma**

[0086] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para o fracionamento de proteínas terapêuticas de plasma reunido empregando um estágio de precipitação inicial, na qual a maior parte da imunoglobulina e de alfa-1-antitripsina (A1PI) o conteúdo do plasma inicial é precipitado e a maioria do teor da albumina do plasma inicial é retida no sobrenadante. Começando a partir deste primeiro estágio de precipitação, um certo número de proteínas do sangue terapeuticamente importantes pode ser fabricado com elevados rendimentos de recuperação.

[0087] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para o fracionamento de proteínas do sangue numa amostra de plasma, compreendendo o método de precipitação de imunoglobulinas e A1PI a partir do plasma de partida sob um pH baixo, as condições de álcool elevado. Este baixo pH, elevado álcool estágio de precipitação resulta na formação de um precipitado (aqui referido como uma fração I-IV-1 precipitado) e um sobrenadante (aqui referido como uma fração I-IV-1 de sobrenadante).

[0088] A Fração I-IV-1 sobrenadante conterà pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90% do teor de proteínas do plasma de partida. Por conseguinte, este sobrenadante pode ser utilizado como um material de partida para a fabricação de uma composição farmacêutica de albumina.

[0089] A Fração I-IV-1 precipitada irá conter pelo menos 90%, de preferência pelo menos 95%, mais preferencialmente pelo menos 98%, mais preferencialmente pelo menos 99% do teor de imunoglobulina do plasma



inicial. Numa modalidade específica, a Fração I-IV-1 precipitada contém pelo menos 98%, preferencialmente 99% do teor de IgG do plasma inicial. Por conseguinte, este precipitado pode ser utilizado como um material de partida para a fabricação de composições farmacêuticas de imunoglobulina. Numa modalidade, a Fração I-IV-1 precipitada é utilizado como um material de partida para a fabricação de uma composição farmacêutica de IgG. Em ainda outra modalidade, a Fração I-IV-1 precipitada é utilizada como um material de partida para a fabricação de uma composição farmacêutica que contém imunoglobulina mais do que um subtipo de imunoglobulina.

[0090] Da mesma forma, a Fração I-IV-1 precipitada irá conter pelo menos 90%, de preferência pelo menos 95%, mais preferencialmente pelo menos 97%, mais preferencialmente pelo menos 98% do teor de A1PI do plasma inicial. Por conseguinte, este precipitado pode ser utilizado como um material de partida para a fabricação de uma composição farmacêutica A1PI.

[0091] A Fração I-IV-1 precipitada também irá conter, pelo menos, 70%, de preferência pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95% do teor do Fator H do plasma inicial. Por conseguinte, este precipitado pode ser utilizado como um material de partida para a fabricação de uma composição farmacêutica do Fator H.

[0092] A Fração I-IV-1 precipitada também irá conter, pelo menos, 70%, de preferência pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95% de inter-alfa-inibidor (IaIP) contida no plasma de partida. Por conseguinte, este precipitado pode ser utilizado como um material de partida para a fabricação de uma composição farmacêutica IaIP.

[0093] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para separar as imunoglobulinas do A1PI encontrados na Fração I-IV-1 precipitada. Numa modalidade, o método compreende as imunoglobulinas de solubilização em uma suspensão da Fração I-IV-1 precipitada, mantendo

A1PI na porção insolúvel da suspensão e, em seguida, separando as partes solúveis e insolúveis, por exemplo, por filtração ou centrifugação. Numa modalidade, a separação é auxiliada pelo tratamento da Fração I-IV-1 a suspensão com dióxido de silício finamente dividido antes de se separar as partes solúveis e insolúveis. Sem estar limitado pela teoria, o dióxido de silício pode-se ligar A1PI que é co-solubilizado com as imunoglobulinas, aumentando a quantidade de A1PI particionado na porção insolúvel da suspensão.

[0094] Além disso, sabe-se que o Fator H e IaIP dióxido de silício em partículas ligam-se, sob certas condições (ver, WO/2011/011753, PCT/US2011/45099, e PCT/US2011/038247; as divulgações dos quais são aqui expressamente incorporados por referência na sua totalidade para todos os fins). Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a separação de imunoglobulinas a partir de A1PI, o Fator H, e IaIP encontrado numa fração I-IV-1 precipitada, compreendendo o método uma suspensão Fração I-IV-1 precipitada em água ou um tampão suficiente para solubilizar imunoglobulinas baixa condutividade; se tratar a suspensão com o dióxido de silício; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel, em que a porção solúvel contém imunoglobulinas e a porção insolúvel contém A1PI, o Fator H, e IaIP.

[0095] Em uma modalidade dos meios previstos acima, a porção solúvel em separado da Fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 80% do teor de IgG da amostra de plasma de partida. Numa modalidade preferida, a porção solúvel em separado da Fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 90% do teor de IgG da amostra de plasma de partida. Numa modalidade mais preferida, a porção solúvel em separado da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 95% do teor de IgG da amostra de plasma de partida. Em ainda outras modalidades, a porção solúvel da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de IgG da amostra de plasma de partida.

[0096] Em uma modalidade dos meios previstos acima, a porção insolúvel separada da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 70% do teor de A1PI da amostra de plasma de partida. Numa modalidade preferida, a porção insolúvel separada da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 80% do teor de A1PI da amostra de plasma de partida. Numa modalidade mais preferida, a porção insolúvel separada da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 90% do teor de A1PI da amostra de plasma de partida. Numa modalidade mais preferida, a porção insolúvel separada da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 95% do teor de A1PI da amostra de plasma de partida. Em ainda outras modalidades, a porção insolúvel separada da fração I-IV-1 a suspensão contém pelo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76 %, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do conteúdo A1PI da amostra de plasma de partida.

[0097] As proteínas do sangue fracionadas utilizando a primeira fase de precipitação (por exemplo, massa, Fração I-IV-1 de precipitação) pode ser ainda mais enriquecido por meio de processos adequados, por exemplo, (por exemplo, fracionamento de álcool ou de polietileno-glicol de fracionamento) (cromatografia de permuta iônica, métodos cromatográficos precipitação, cromatografia de afinidade, cromatografia de imunoafinidade, etc), filtração (ultrafiltração/diafiltração, nanofiltração), ultracentrifugação, a preparação de eletroforese, e semelhantes.

#### **A. Preparação de Crio-sobrenadante**

[0098] O material de partida utilizado para a preparação de composições concentradas IgG geralmente consiste ou recuperado de plasma

(isto é, o plasma que foi separado a partir de sangue total ex vivo) ou de plasma de origem (isto é, o plasma recolhido via plasmaférese). O processo de purificação normalmente começa com a descongelação de plasma congelado reunido anteriormente, que já foi ensaiada por considerações de segurança e qualidade. O descongelamento é tipicamente realizado a uma temperatura não superior a 6°C. Após o descongelamento completo do plasma congelado a uma temperatura baixa, a centrifugação é realizada a frio (por exemplo,  $\leq 6^\circ\text{C}$ ) para separar crio-precipitados sólidos do líquido sobrenadante. Em alternativa, o estágio de separação pode ser realizado por filtração em vez de centrifugação. O sobrenadante líquido (também referida como "crio-sobrenadante", depois de proteínas frias insolúveis removidas por centrifugação a partir de plasma fresco descongelado) é então processado no estágio seguinte. Várias medidas adicionais podem ser tomadas neste momento para o isolamento do fator de oito inibidor atividade extracorpórea (FEIBA), Fator IX-complexa, Fator VII, de antitrombina III, complexos de protrombina, etc

## **B. Primeiro Evento de Precipitação - Precipitação de Fração I-IV-1**

[0099] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para o fracionamento de proteínas do sangue numa amostra de plasma, compreendendo o método de precipitação de imunoglobulinas e A1PI a partir do plasma a partir de um primeiro estágio de precipitação sob a pH baixo, as condições de álcool elevado. Este baixo pH, elevado álcool estágio de precipitação resulta na formação de um precipitado (Fração I-IV-1 precipitada) e um sobrenadante (Fração I-IV-1 de sobrenadante).

[00100] Numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol com um conjunto de plasma de partida (o conjunto de Cohn) para uma concentração final de entre 20% e 30% (v/v) a um pH entre 5,0 e 6,0. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra

modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25\%$  (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de 5,5. Em ainda outras modalidades, a concentração final de etanol e o pH do primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na **Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 7**.

**Tabela 1.** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

pH	Concentração final de Etanol [% (v/v)]							
	20-30	21-30	22-30	23-30	24-30	25-30	20-29	21-29
5,0-6,0	Var. 1	Var. 39	Var. 77	Var. 115	Var. 153	Var. 191	Var. 229	Var. 267
5,1-5,9	Var. 2	Var. 40	Var. 78	Var. 116	Var. 154	Var. 192	Var. 230	Var. 268
5,2-5,8	Var. 3	Var. 41	Var. 79	Var. 117	Var. 155	Var. 193	Var. 231	Var. 269
5,3-5,7	Var. 4	Var. 42	Var. 80	Var. 118	Var. 156	Var. 194	Var. 232	Var. 270
5,4-5,6	Var. 5	Var. 43	Var. 81	Var. 119	Var. 157	Var. 195	Var. 233	Var. 271
5,0 $\pm$ 0,2	Var. 6	Var. 44	Var. 82	Var. 120	Var. 158	Var. 196	Var. 234	Var. 272
5,1 $\pm$ 0,2	Var. 7	Var. 45	Var. 83	Var. 121	Var. 159	Var. 197	Var. 235	Var. 273
5,2 $\pm$ 0,2	Var. 8	Var. 46	Var. 84	Var. 122	Var. 160	Var. 198	Var. 236	Var. 274
5,3 $\pm$ 0,2	Var. 9	Var. 47	Var. 85	Var. 123	Var. 161	Var. 199	Var. 237	Var. 275
5,4 $\pm$ 0,2	Var. 10	Var. 48	Var. 86	Var. 124	Var. 162	Var. 200	Var. 238	Var. 276
5,5 $\pm$ 0,2	Var. 11	Var. 49	Var. 87	Var. 125	Var. 163	Var. 201	Var. 239	Var. 277
5,6 $\pm$ 0,2	Var. 12	Var. 50	Var. 88	Var. 126	Var. 164	Var. 202	Var. 240	Var. 278
5,7 $\pm$ 0,2	Var. 13	Var. 51	Var. 89	Var. 127	Var. 165	Var. 203	Var. 241	Var. 279
5,8 $\pm$ 0,2	Var. 14	Var. 52	Var. 90	Var. 128	Var. 166	Var. 204	Var. 242	Var. 280
5,9 $\pm$ 0,2	Var. 15	Var. 53	Var. 91	Var. 129	Var. 167	Var. 205	Var. 243	Var. 281
6,0 $\pm$ 0,2	Var. 16	Var. 54	Var. 92	Var. 130	Var. 168	Var. 206	Var. 244	Var. 282
5,0 $\pm$ 0,1	Var. 17	Var. 55	Var. 93	Var. 131	Var. 169	Var. 207	Var. 245	Var. 283
5,1 $\pm$ 0,1	Var. 18	Var. 56	Var. 94	Var. 132	Var. 170	Var. 208	Var. 246	Var. 284

Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	20-30	21-30	22-30	23-30	24-30	25-30	20-29	21-29
5,2 ± 0,1	Var. 19	Var. 57	Var. 95	Var. 133	Var. 171	Var. 209	Var. 247	Var. 285
5,3 ± 0,1	Var. 20	Var. 58	Var. 96	Var. 134	Var. 172	Var. 210	Var. 248	Var. 286
5,4 ± 0,1	Var. 21	Var. 59	Var. 97	Var. 135	Var. 173	Var. 211	Var. 249	Var. 287
5,5 ± 0,1	Var. 22	Var. 60	Var. 98	Var. 136	Var. 174	Var. 212	Var. 250	Var. 288
5,6 ± 0,1	Var. 23	Var. 61	Var. 99	Var. 137	Var. 175	Var. 213	Var. 251	Var. 289
5,7 ± 0,1	Var. 24	Var. 62	Var. 100	Var. 138	Var. 176	Var. 214	Var. 252	Var. 290
5,8 ± 0,1	Var. 25	Var. 63	Var. 101	Var. 139	Var. 177	Var. 215	Var. 253	Var. 291
5,9 ± 0,1	Var. 26	Var. 64	Var. 102	Var. 140	Var. 178	Var. 216	Var. 254	Var. 292
6,0 ± 0,1	Var. 27	Var. 65	Var. 103	Var. 141	Var. 179	Var. 217	Var. 255	Var. 293
5	Var. 28	Var. 66	Var. 104	Var. 142	Var. 180	Var. 218	Var. 256	Var. 294
5,1	Var. 29	Var. 67	Var. 105	Var. 143	Var. 181	Var. 219	Var. 257	Var. 295
5,2	Var. 30	Var. 68	Var. 106	Var. 144	Var. 182	Var. 220	Var. 258	Var. 296
5,3	Var. 31	Var. 69	Var. 107	Var. 145	Var. 183	Var. 221	Var. 259	Var. 297
5,4	Var. 32	Var. 70	Var. 108	Var. 146	Var. 184	Var. 222	Var. 260	Var. 298
5,5	Var. 33	Var. 71	Var. 109	Var. 147	Var. 185	Var. 223	Var. 261	Var. 299
5,6	Var. 34	Var. 72	Var. 110	Var. 148	Var. 186	Var. 224	Var. 262	Var. 300
5,7	Var. 35	Var. 73	Var. 111	Var. 149	Var. 187	Var. 225	Var. 263	Var. 301
5,8	Var. 36	Var. 74	Var. 112	Var. 150	Var. 188	Var. 226	Var. 264	Var. 302
5,9	Var. 37	Var. 75	Var. 113	Var. 151	Var. 189	Var. 227	Var. 265	Var. 303
6	Var. 38	Var. 76	Var. 114	Var. 152	Var. 190	Var. 228	Var. 266	Var. 304

**Tabela 2:** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]							
pH	22-29	23-29	24-29	25-29	20-28	21-28	22-28
5,0-6,0	Var. 305	Var. 343	Var. 381	Var. 419	Var. 457	Var. 495	Var. 533
5,1-5,9	Var. 306	Var. 344	Var. 382	Var. 420	Var. 458	Var. 496	Var. 534
5,2-5,8	Var. 307	Var. 345	Var. 383	Var. 421	Var. 459	Var. 497	Var. 535
5,3-5,7	Var. 308	Var. 346	Var. 384	Var. 422	Var. 460	Var. 498	Var. 536
5,4-5,6	Var. 309	Var. 347	Var. 385	Var. 423	Var. 461	Var. 499	Var. 537
5,0 ± 0,2	Var. 310	Var. 348	Var. 386	Var. 424	Var. 462	Var. 500	Var. 538
5,1 ± 0,2	Var. 311	Var. 349	Var. 387	Var. 425	Var. 463	Var. 501	Var. 539
5,2 ± 0,2	Var. 312	Var. 350	Var. 388	Var. 426	Var. 464	Var. 502	Var. 540
5,3 ± 0,2	Var. 313	Var. 351	Var. 389	Var. 427	Var. 465	Var. 503	Var. 541
5,4 ± 0,2	Var. 314	Var. 352	Var. 390	Var. 428	Var. 466	Var. 504	Var. 542
5,5 ± 0,2	Var. 315	Var. 353	Var. 391	Var. 429	Var. 467	Var. 505	Var. 543
5,6 ± 0,2	Var. 316	Var. 354	Var. 392	Var. 430	Var. 468	Var. 506	Var. 544
5,7 ± 0,2	Var. 317	Var. 355	Var. 393	Var. 431	Var. 469	Var. 507	Var. 545
5,8 ± 0,2	Var. 318	Var. 356	Var. 394	Var. 432	Var. 470	Var. 508	Var. 546
5,9 ± 0,2	Var. 319	Var. 357	Var. 395	Var. 433	Var. 471	Var. 509	Var. 547
6,0 ± 0,2	Var. 320	Var. 358	Var. 396	Var. 434	Var. 472	Var. 510	Var. 548
5,0 ± 0,1	Var. 321	Var. 359	Var. 397	Var. 435	Var. 473	Var. 511	Var. 549
5,1 ± 0,1	Var. 322	Var. 360	Var. 398	Var. 436	Var. 474	Var. 512	Var. 550
5,2 ± 0,1	Var. 323	Var. 361	Var. 399	Var. 437	Var. 475	Var. 513	Var. 551
5,3 ± 0,1	Var. 324	Var. 362	Var. 400	Var. 438	Var. 476	Var. 514	Var. 552
5,4 ± 0,1	Var. 325	Var. 363	Var. 401	Var. 439	Var. 477	Var. 515	Var. 553
5,5 ± 0,1	Var. 326	Var. 364	Var. 402	Var. 440	Var. 478	Var. 516	Var. 554
5,6 ± 0,1	Var. 327	Var. 365	Var. 403	Var. 441	Var. 479	Var. 517	Var. 555

Concentração final de Etanol [% (v/v)]							
pH	22-29	23-29	24-29	25-29	20-28	21-28	22-28
5,7 ± 0,1	Var. 328	Var. 366	Var. 404	Var. 442	Var. 480	Var. 518	Var. 556
5,8 ± 0,1	Var. 329	Var. 367	Var. 405	Var. 443	Var. 481	Var. 519	Var. 557
5,9 ± 0,1	Var. 330	Var. 368	Var. 406	Var. 444	Var. 482	Var. 520	Var. 558
6,0 ± 0,1	Var. 331	Var. 369	Var. 407	Var. 445	Var. 483	Var. 521	Var. 559
5	Var. 332	Var. 370	Var. 408	Var. 446	Var. 484	Var. 522	Var. 560
5,1	Var. 333	Var. 371	Var. 409	Var. 447	Var. 485	Var. 523	Var. 561
5,2	Var. 334	Var. 372	Var. 410	Var. 448	Var. 486	Var. 524	Var. 562
5,3	Var. 335	Var. 373	Var. 411	Var. 449	Var. 487	Var. 525	Var. 563
5,4	Var. 336	Var. 374	Var. 412	Var. 450	Var. 488	Var. 526	Var. 564
5,5	Var. 337	Var. 375	Var. 413	Var. 451	Var. 489	Var. 527	Var. 565
5,6	Var. 338	Var. 376	Var. 414	Var. 452	Var. 490	Var. 528	Var. 566
5,7	Var. 339	Var. 377	Var. 415	Var. 453	Var. 491	Var. 529	Var. 567
5,8	Var. 340	Var. 378	Var. 416	Var. 454	Var. 492	Var. 530	Var. 568
5,9	Var. 341	Var. 379	Var. 417	Var. 455	Var. 493	Var. 531	Var. 569
6	Var. 342	Var. 380	Var. 418	Var. 456	Var. 494	Var. 532	Var. 570

**Tabela 3.** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]							
pH	23-28	24-28	25-28	20-27	21-27	22-27	23-27
5,0-6,0	Var. 571	Var. 609	Var. 647	Var. 685	Var. 723	Var. 761	Var. 799
5,1-5,9	Var. 572	Var. 610	Var. 648	Var. 686	Var. 724	Var. 762	Var. 800
5,2-5,8	Var. 573	Var. 611	Var. 649	Var. 687	Var. 725	Var. 763	Var. 801
5,3-5,7	Var. 574	Var. 612	Var. 650	Var. 688	Var. 726	Var. 764	Var. 802
5,4-5,6	Var. 575	Var. 613	Var. 651	Var. 689	Var. 727	Var. 765	Var. 803
5,0 ± 0,2	Var. 576	Var. 614	Var. 652	Var. 690	Var. 728	Var. 766	Var. 804
5,1 ± 0,2	Var. 577	Var. 615	Var. 653	Var. 691	Var. 729	Var. 767	Var. 805
5,2 ± 0,2	Var. 578	Var. 616	Var. 654	Var. 692	Var. 730	Var. 768	Var. 806
5,3 ± 0,2	Var. 579	Var. 617	Var. 655	Var. 693	Var. 731	Var. 769	Var. 807
5,4 ± 0,2	Var. 580	Var. 618	Var. 656	Var. 694	Var. 732	Var. 770	Var. 808
5,5 ± 0,2	Var. 581	Var. 619	Var. 657	Var. 695	Var. 733	Var. 771	Var. 809
5,6 ± 0,2	Var. 582	Var. 620	Var. 658	Var. 696	Var. 734	Var. 772	Var. 810
5,7 ± 0,2	Var. 583	Var. 621	Var. 659	Var. 697	Var. 735	Var. 773	Var. 811
5,8 ± 0,2	Var. 584	Var. 622	Var. 660	Var. 698	Var. 736	Var. 774	Var. 812
5,9 ± 0,2	Var. 585	Var. 623	Var. 661	Var. 699	Var. 737	Var. 775	Var. 813
6,0 ± 0,2	Var. 586	Var. 624	Var. 662	Var. 700	Var. 738	Var. 776	Var. 814
5,0 ± 0,1	Var. 587	Var. 625	Var. 663	Var. 701	Var. 739	Var. 777	Var. 815
5,1 ± 0,1	Var. 588	Var. 626	Var. 664	Var. 702	Var. 740	Var. 778	Var. 816
5,2 ± 0,1	Var. 589	Var. 627	Var. 665	Var. 703	Var. 741	Var. 779	Var. 817
5,3 ± 0,1	Var. 590	Var. 628	Var. 666	Var. 704	Var. 742	Var. 780	Var. 818
5,4 ± 0,1	Var. 591	Var. 629	Var. 667	Var. 705	Var. 743	Var. 781	Var. 819
5,5 ± 0,1	Var. 592	Var. 630	Var. 668	Var. 706	Var. 744	Var. 782	Var. 820
5,6 ± 0,1	Var. 593	Var. 631	Var. 669	Var. 707	Var. 745	Var. 783	Var. 821
5,7 ± 0,1	Var. 594	Var. 632	Var. 670	Var. 708	Var. 746	Var. 784	Var. 822
5,8 ± 0,1	Var. 595	Var. 633	Var. 671	Var. 709	Var. 747	Var. 785	Var. 823
5,9 ± 0,1	Var. 596	Var. 634	Var. 672	Var. 710	Var. 748	Var. 786	Var. 824
6,0 ± 0,1	Var. 597	Var. 635	Var. 673	Var. 711	Var. 749	Var. 787	Var. 825
5	Var. 598	Var. 636	Var. 674	Var. 712	Var. 750	Var. 788	Var. 826

Concentração final de Etanol [% (v/v)]							
pH	23-28	24-28	25-28	20-27	21-27	22-27	23-27
5,1	Var. 599	Var. 637	Var. 675	Var. 713	Var. 751	Var. 789	Var. 827
5,2	Var. 600	Var. 638	Var. 676	Var. 714	Var. 752	Var. 790	Var. 828
5,3	Var. 601	Var. 639	Var. 677	Var. 715	Var. 753	Var. 791	Var. 829
5,4	Var. 602	Var. 640	Var. 678	Var. 716	Var. 754	Var. 792	Var. 830
5,5	Var. 603	Var. 641	Var. 679	Var. 717	Var. 755	Var. 793	Var. 831
5,6	Var. 604	Var. 642	Var. 680	Var. 718	Var. 756	Var. 794	Var. 832
5,7	Var. 605	Var. 643	Var. 681	Var. 719	Var. 757	Var. 795	Var. 833
5,8	Var. 606	Var. 644	Var. 682	Var. 720	Var. 758	Var. 796	Var. 834
5,9	Var. 607	Var. 645	Var. 683	Var. 721	Var. 759	Var. 797	Var. 835
6	Var. 608	Var. 646	Var. 684	Var. 722	Var. 760	Var. 798	Var. 836

**Tabela 4.** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	24-27	25-27	20-26	21-26	22-26	23-26	24-26	25-26
5,0-6,0	Var. 837	Var. 875	Var. 913	Var. 951	Var. 989	Var. 1027	Var. 1065	Var. 1103
5,1-5,9	Var. 838	Var. 876	Var. 914	Var. 952	Var. 990	Var. 1028	Var. 1066	Var. 1104
5,2-5,8	Var. 839	Var. 877	Var. 915	Var. 953	Var. 991	Var. 1029	Var. 1067	Var. 1105
5,3-5,7	Var. 840	Var. 878	Var. 916	Var. 954	Var. 992	Var. 1030	Var. 1068	Var. 1106
5,4-5,6	Var. 841	Var. 879	Var. 917	Var. 955	Var. 993	Var. 1031	Var. 1069	Var. 1107
5,0 ± 0,2	Var. 842	Var. 880	Var. 918	Var. 956	Var. 994	Var. 1032	Var. 1070	Var. 1108
5,1 ± 0,2	Var. 843	Var. 881	Var. 919	Var. 957	Var. 995	Var. 1033	Var. 1071	Var. 1109
5,2 ± 0,2	Var. 844	Var. 882	Var. 920	Var. 958	Var. 996	Var. 1034	Var. 1072	Var. 1110
5,3 ± 0,2	Var. 845	Var. 883	Var. 921	Var. 959	Var. 997	Var. 1035	Var. 1073	Var. 1111
5,4 ± 0,2	Var. 846	Var. 884	Var. 922	Var. 960	Var. 998	Var. 1036	Var. 1074	Var. 1112
5,5 ± 0,2	Var. 847	Var. 885	Var. 923	Var. 961	Var. 999	Var. 1037	Var. 1075	Var. 1113
5,6 ± 0,2	Var. 848	Var. 886	Var. 924	Var. 962	Var. 1000	Var. 1038	Var. 1076	Var. 1114
5,7 ± 0,2	Var. 849	Var. 887	Var. 925	Var. 963	Var. 1001	Var. 1039	Var. 1077	Var. 1115
5,8 ± 0,2	Var. 850	Var. 888	Var. 926	Var. 964	Var. 1002	Var. 1040	Var. 1078	Var. 1116
5,9 ± 0,2	Var. 851	Var. 889	Var. 927	Var. 965	Var. 1003	Var. 1041	Var. 1079	Var. 1117
6,0 ± 0,2	Var. 852	Var. 890	Var. 928	Var. 966	Var. 1004	Var. 1042	Var. 1080	Var. 1118
5,0 ± 0,1	Var. 853	Var. 891	Var. 929	Var. 967	Var. 1005	Var. 1043	Var. 1081	Var. 1119
5,1 ± 0,1	Var. 854	Var. 892	Var. 930	Var. 968	Var. 1006	Var. 1044	Var. 1082	Var. 1120
5,2 ± 0,1	Var. 855	Var. 893	Var. 931	Var. 969	Var. 1007	Var. 1045	Var. 1083	Var. 1121
5,3 ± 0,1	Var. 856	Var. 894	Var. 932	Var. 970	Var. 1008	Var. 1046	Var. 1084	Var. 1122
5,4 ± 0,1	Var. 857	Var. 895	Var. 933	Var. 971	Var. 1009	Var. 1047	Var. 1085	Var. 1123
5,5 ± 0,1	Var. 858	Var. 896	Var. 934	Var. 972	Var. 1010	Var. 1048	Var. 1086	Var. 1124
5,6 ± 0,1	Var. 859	Var. 897	Var. 935	Var. 973	Var. 1011	Var. 1049	Var. 1087	Var. 1125
5,7 ± 0,1	Var. 860	Var. 898	Var. 936	Var. 974	Var. 1012	Var. 1050	Var. 1088	Var. 1126
5,8 ± 0,1	Var. 861	Var. 899	Var. 937	Var. 975	Var. 1013	Var. 1051	Var. 1089	Var. 1127
5,9 ± 0,1	Var. 862	Var. 900	Var. 938	Var. 976	Var. 1014	Var. 1052	Var. 1090	Var. 1128
6,0 ± 0,1	Var. 863	Var. 901	Var. 939	Var. 977	Var. 1015	Var. 1053	Var. 1091	Var. 1129
5	Var. 864	Var. 902	Var. 940	Var. 978	Var. 1016	Var. 1054	Var. 1092	Var. 1130
5,1	Var. 865	Var. 903	Var. 941	Var. 979	Var. 1017	Var. 1055	Var. 1093	Var. 1131
5,2	Var. 866	Var. 904	Var. 942	Var. 980	Var. 1018	Var. 1056	Var. 1094	Var. 1132
5,3	Var. 867	Var. 905	Var. 943	Var. 981	Var. 1019	Var. 1057	Var. 1095	Var. 1133
5,4	Var. 868	Var. 906	Var. 944	Var. 982	Var. 1020	Var. 1058	Var. 1096	Var. 1134
5,5	Var. 869	Var. 907	Var. 945	Var. 983	Var. 1021	Var. 1059	Var. 1097	Var. 1135



Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	24-27	25-27	20-26	21-26	22-26	23-26	24-26	25-26
5,6	Var. 870	Var. 908	Var. 946	Var. 984	Var. 1022	Var. 1060	Var. 1098	Var. 1136
5,7	Var. 871	Var. 909	Var. 947	Var. 985	Var. 1023	Var. 1061	Var. 1099	Var. 1137
5,8	Var. 872	Var. 910	Var. 948	Var. 986	Var. 1024	Var. 1062	Var. 1100	Var. 1138
5,9	Var. 873	Var. 911	Var. 949	Var. 987	Var. 1025	Var. 1063	Var. 1101	Var. 1139
6	Var. 874	Var. 912	Var. 950	Var. 988	Var. 1026	Var. 1064	Var. 1102	Var. 1140

**Tabela 5.** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	20-25	21-25	22-25	23-25	24-25	20 ± 1	21 ± 1	22 ± 1
5,0-6,0	Var. 1141	Var. 1179	Var. 1217	Var. 1255	Var. 1293	Var. 1331	Var. 1369	Var. 1407
5,1-5,9	Var. 1142	Var. 1180	Var. 1218	Var. 1256	Var. 1294	Var. 1332	Var. 1370	Var. 1408
5,2-5,8	Var. 1143	Var. 1181	Var. 1219	Var. 1257	Var. 1295	Var. 1333	Var. 1371	Var. 1409
5,3-5,7	Var. 1144	Var. 1182	Var. 1220	Var. 1258	Var. 1296	Var. 1334	Var. 1372	Var. 1410
5,4-5,6	Var. 1145	Var. 1183	Var. 1221	Var. 1259	Var. 1297	Var. 1335	Var. 1373	Var. 1411
5,0 ± 0,2	Var. 1146	Var. 1184	Var. 1222	Var. 1260	Var. 1298	Var. 1336	Var. 1374	Var. 1412
5,1 ± 0,2	Var. 1147	Var. 1185	Var. 1223	Var. 1261	Var. 1299	Var. 1337	Var. 1375	Var. 1413
5,2 ± 0,2	Var. 1148	Var. 1186	Var. 1224	Var. 1262	Var. 1300	Var. 1338	Var. 1376	Var. 1414
5,3 ± 0,2	Var. 1149	Var. 1187	Var. 1225	Var. 1263	Var. 1301	Var. 1339	Var. 1377	Var. 1415
5,4 ± 0,2	Var. 1150	Var. 1188	Var. 1226	Var. 1264	Var. 1302	Var. 1340	Var. 1378	Var. 1416
5,5 ± 0,2	Var. 1151	Var. 1189	Var. 1227	Var. 1265	Var. 1303	Var. 1341	Var. 1379	Var. 1417
5,6 ± 0,2	Var. 1152	Var. 1190	Var. 1228	Var. 1266	Var. 1304	Var. 1342	Var. 1380	Var. 1418
5,7 ± 0,2	Var. 1153	Var. 1191	Var. 1229	Var. 1267	Var. 1305	Var. 1343	Var. 1381	Var. 1419
5,8 ± 0,2	Var. 1154	Var. 1192	Var. 1230	Var. 1268	Var. 1306	Var. 1344	Var. 1382	Var. 1420
5,9 ± 0,2	Var. 1155	Var. 1193	Var. 1231	Var. 1269	Var. 1307	Var. 1345	Var. 1383	Var. 1421
6,0 ± 0,2	Var. 1156	Var. 1194	Var. 1232	Var. 1270	Var. 1308	Var. 1346	Var. 1384	Var. 1422
5,0 ± 0,1	Var. 1157	Var. 1195	Var. 1233	Var. 1271	Var. 1309	Var. 1347	Var. 1385	Var. 1423
5,1 ± 0,1	Var. 1158	Var. 1196	Var. 1234	Var. 1272	Var. 1310	Var. 1348	Var. 1386	Var. 1424
5,2 ± 0,1	Var. 1159	Var. 1197	Var. 1235	Var. 1273	Var. 1311	Var. 1349	Var. 1387	Var. 1425
5,3 ± 0,1	Var. 1160	Var. 1198	Var. 1236	Var. 1274	Var. 1312	Var. 1350	Var. 1388	Var. 1426
5,4 ± 0,1	Var. 1161	Var. 1199	Var. 1237	Var. 1275	Var. 1313	Var. 1351	Var. 1389	Var. 1427
5,5 ± 0,1	Var. 1162	Var. 1200	Var. 1238	Var. 1276	Var. 1314	Var. 1352	Var. 1390	Var. 1428
5,6 ± 0,1	Var. 1163	Var. 1201	Var. 1239	Var. 1277	Var. 1315	Var. 1353	Var. 1391	Var. 1429
5,7 ± 0,1	Var. 1164	Var. 1202	Var. 1240	Var. 1278	Var. 1316	Var. 1354	Var. 1392	Var. 1430
5,8 ± 0,1	Var. 1165	Var. 1203	Var. 1241	Var. 1279	Var. 1317	Var. 1355	Var. 1393	Var. 1431
5,9 ± 0,1	Var. 1166	Var. 1204	Var. 1242	Var. 1280	Var. 1318	Var. 1356	Var. 1394	Var. 1432
6,0 ± 0,1	Var. 1167	Var. 1205	Var. 1243	Var. 1281	Var. 1319	Var. 1357	Var. 1395	Var. 1433
5	Var. 1168	Var. 1206	Var. 1244	Var. 1282	Var. 1320	Var. 1358	Var. 1396	Var. 1434
5,1	Var. 1169	Var. 1207	Var. 1245	Var. 1283	Var. 1321	Var. 1359	Var. 1397	Var. 1435
5,2	Var. 1170	Var. 1208	Var. 1246	Var. 1284	Var. 1322	Var. 1360	Var. 1398	Var. 1436
5,3	Var. 1171	Var. 1209	Var. 1247	Var. 1285	Var. 1323	Var. 1361	Var. 1399	Var. 1437
5,4	Var. 1172	Var. 1210	Var. 1248	Var. 1286	Var. 1324	Var. 1362	Var. 1400	Var. 1438
5,5	Var. 1173	Var. 1211	Var. 1249	Var. 1287	Var. 1325	Var. 1363	Var. 1401	Var. 1439
5,6	Var. 1174	Var. 1212	Var. 1250	Var. 1288	Var. 1326	Var. 1364	Var. 1402	Var. 1440
5,7	Var. 1175	Var. 1213	Var. 1251	Var. 1289	Var. 1327	Var. 1365	Var. 1403	Var. 1441
5,8	Var. 1176	Var. 1214	Var. 1252	Var. 1290	Var. 1328	Var. 1366	Var. 1404	Var. 1442
5,9	Var. 1177	Var. 1215	Var. 1253	Var. 1291	Var. 1329	Var. 1367	Var. 1405	Var. 1443
6	Var. 1178	Var. 1216	Var. 1254	Var. 1292	Var. 1330	Var. 1368	Var. 1406	Var. 1444

**Tabela 6.** combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	23 ± 1	24 ± 1	25 ± 1	26 ± 1	27 ± 1	28 ± 1	29 ± 1	30 ± 1
5,0-6,0	Var. 1445	Var. 1483	Var. 1521	Var. 1559	Var. 1597	Var. 1635	Var. 1673	Var. 1711
5,1-5,9	Var. 1446	Var. 1484	Var. 1522	Var. 1560	Var. 1598	Var. 1636	Var. 1674	Var. 1712
5,2-5,8	Var. 1447	Var. 1485	Var. 1523	Var. 1561	Var. 1599	Var. 1637	Var. 1675	Var. 1713
5,3-5,7	Var. 1448	Var. 1486	Var. 1524	Var. 1562	Var. 1600	Var. 1638	Var. 1676	Var. 1714
5,4-5,6	Var. 1449	Var. 1487	Var. 1525	Var. 1563	Var. 1601	Var. 1639	Var. 1677	Var. 1715
5,0 ± 0,2	Var. 1450	Var. 1488	Var. 1526	Var. 1564	Var. 1602	Var. 1640	Var. 1678	Var. 1716
5,1 ± 0,2	Var. 1451	Var. 1489	Var. 1527	Var. 1565	Var. 1603	Var. 1641	Var. 1679	Var. 1717
5,2 ± 0,2	Var. 1452	Var. 1490	Var. 1528	Var. 1566	Var. 1604	Var. 1642	Var. 1680	Var. 1718
5,3 ± 0,2	Var. 1453	Var. 1491	Var. 1529	Var. 1567	Var. 1605	Var. 1643	Var. 1681	Var. 1719
5,4 ± 0,2	Var. 1454	Var. 1492	Var. 1530	Var. 1568	Var. 1606	Var. 1644	Var. 1682	Var. 1720
5,5 ± 0,2	Var. 1455	Var. 1493	Var. 1531	Var. 1569	Var. 1607	Var. 1645	Var. 1683	Var. 1721
5,6 ± 0,2	Var. 1456	Var. 1494	Var. 1532	Var. 1570	Var. 1608	Var. 1646	Var. 1684	Var. 1722
5,7 ± 0,2	Var. 1457	Var. 1495	Var. 1533	Var. 1571	Var. 1609	Var. 1647	Var. 1685	Var. 1723
5,8 ± 0,2	Var. 1458	Var. 1496	Var. 1534	Var. 1572	Var. 1610	Var. 1648	Var. 1686	Var. 1724
5,9 ± 0,2	Var. 1459	Var. 1497	Var. 1535	Var. 1573	Var. 1611	Var. 1649	Var. 1687	Var. 1725
6,0 ± 0,2	Var. 1460	Var. 1498	Var. 1536	Var. 1574	Var. 1612	Var. 1650	Var. 1688	Var. 1726
5,0 ± 0,1	Var. 1461	Var. 1499	Var. 1537	Var. 1575	Var. 1613	Var. 1651	Var. 1689	Var. 1727
5,1 ± 0,1	Var. 1462	Var. 1500	Var. 1538	Var. 1576	Var. 1614	Var. 1652	Var. 1690	Var. 1728
5,2 ± 0,1	Var. 1463	Var. 1501	Var. 1539	Var. 1577	Var. 1615	Var. 1653	Var. 1691	Var. 1729
5,3 ± 0,1	Var. 1464	Var. 1502	Var. 1540	Var. 1578	Var. 1616	Var. 1654	Var. 1692	Var. 1730
5,4 ± 0,1	Var. 1465	Var. 1503	Var. 1541	Var. 1579	Var. 1617	Var. 1655	Var. 1693	Var. 1731
5,5 ± 0,1	Var. 1466	Var. 1504	Var. 1542	Var. 1580	Var. 1618	Var. 1656	Var. 1694	Var. 1732
5,6 ± 0,1	Var. 1467	Var. 1505	Var. 1543	Var. 1581	Var. 1619	Var. 1657	Var. 1695	Var. 1733
5,7 ± 0,1	Var. 1468	Var. 1506	Var. 1544	Var. 1582	Var. 1620	Var. 1658	Var. 1696	Var. 1734
5,8 ± 0,1	Var. 1469	Var. 1507	Var. 1545	Var. 1583	Var. 1621	Var. 1659	Var. 1697	Var. 1735
5,9 ± 0,1	Var. 1470	Var. 1508	Var. 1546	Var. 1584	Var. 1622	Var. 1660	Var. 1698	Var. 1736
6,0 ± 0,1	Var. 1471	Var. 1509	Var. 1547	Var. 1585	Var. 1623	Var. 1661	Var. 1699	Var. 1737
5	Var. 1472	Var. 1510	Var. 1548	Var. 1586	Var. 1624	Var. 1662	Var. 1700	Var. 1738
5,1	Var. 1473	Var. 1511	Var. 1549	Var. 1587	Var. 1625	Var. 1663	Var. 1701	Var. 1739
5,2	Var. 1474	Var. 1512	Var. 1550	Var. 1588	Var. 1626	Var. 1664	Var. 1702	Var. 1740
5,3	Var. 1475	Var. 1513	Var. 1551	Var. 1589	Var. 1627	Var. 1665	Var. 1703	Var. 1741
5,4	Var. 1476	Var. 1514	Var. 1552	Var. 1590	Var. 1628	Var. 1666	Var. 1704	Var. 1742
5,5	Var. 1477	Var. 1515	Var. 1553	Var. 1591	Var. 1629	Var. 1667	Var. 1705	Var. 1743
5,6	Var. 1478	Var. 1516	Var. 1554	Var. 1592	Var. 1630	Var. 1668	Var. 1706	Var. 1744
5,7	Var. 1479	Var. 1517	Var. 1555	Var. 1593	Var. 1631	Var. 1669	Var. 1707	Var. 1745
5,8	Var. 1480	Var. 1518	Var. 1556	Var. 1594	Var. 1632	Var. 1670	Var. 1708	Var. 1746
5,9	Var. 1481	Var. 1519	Var. 1557	Var. 1595	Var. 1633	Var. 1671	Var. 1709	Var. 1747
6	Var. 1482	Var. 1520	Var. 1558	Var. 1596	Var. 1634	Var. 1672	Var. 1710	Var. 1748

**Tabela 7.** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	20	21	22	23	24	25	26	27
5,0-6,0	Var. 1749	Var. 1787	Var. 1825	Var. 1863	Var. 1901	Var. 1939	Var. 1977	Var. 2015
5,1-5,9	Var. 1750	Var. 1788	Var. 1826	Var. 1864	Var. 1902	Var. 1940	Var. 1978	Var. 2016

Concentração final de Etanol [% (v/v)]								
pH	20	21	22	23	24	25	26	27
5,2-5,8	Var. 1751	Var. 1789	Var. 1827	Var. 1865	Var. 1903	Var. 1941	Var. 1979	Var. 2017
5,3-5,7	Var. 1752	Var. 1790	Var. 1828	Var. 1866	Var. 1904	Var. 1942	Var. 1980	Var. 2018
5,4-5,6	Var. 1753	Var. 1791	Var. 1829	Var. 1867	Var. 1905	Var. 1943	Var. 1981	Var. 2019
5,0 ± 0,2	Var. 1754	Var. 1792	Var. 1830	Var. 1868	Var. 1906	Var. 1944	Var. 1982	Var. 2020
5,1 ± 0,2	Var. 1755	Var. 1793	Var. 1831	Var. 1869	Var. 1907	Var. 1945	Var. 1983	Var. 2021
5,2 ± 0,2	Var. 1756	Var. 1794	Var. 1832	Var. 1870	Var. 1908	Var. 1946	Var. 1984	Var. 2022
5,3 ± 0,2	Var. 1757	Var. 1795	Var. 1833	Var. 1871	Var. 1909	Var. 1947	Var. 1985	Var. 2023
5,4 ± 0,2	Var. 1758	Var. 1796	Var. 1834	Var. 1872	Var. 1910	Var. 1948	Var. 1986	Var. 2024
5,5 ± 0,2	Var. 1759	Var. 1797	Var. 1835	Var. 1873	Var. 1911	Var. 1949	Var. 1987	Var. 2025
5,6 ± 0,2	Var. 1760	Var. 1798	Var. 1836	Var. 1874	Var. 1912	Var. 1950	Var. 1988	Var. 2026
5,7 ± 0,2	Var. 1761	Var. 1799	Var. 1837	Var. 1875	Var. 1913	Var. 1951	Var. 1989	Var. 2027
5,8 ± 0,2	Var. 1762	Var. 1800	Var. 1838	Var. 1876	Var. 1914	Var. 1952	Var. 1990	Var. 2028
5,9 ± 0,2	Var. 1763	Var. 1801	Var. 1839	Var. 1877	Var. 1915	Var. 1953	Var. 1991	Var. 2029
6,0 ± 0,2	Var. 1764	Var. 1802	Var. 1840	Var. 1878	Var. 1916	Var. 1954	Var. 1992	Var. 2030
5,0 ± 0,1	Var. 1765	Var. 1803	Var. 1841	Var. 1879	Var. 1917	Var. 1955	Var. 1993	Var. 2031
5,1 ± 0,1	Var. 1766	Var. 1804	Var. 1842	Var. 1880	Var. 1918	Var. 1956	Var. 1994	Var. 2032
5,2 ± 0,1	Var. 1767	Var. 1805	Var. 1843	Var. 1881	Var. 1919	Var. 1957	Var. 1995	Var. 2033
5,3 ± 0,1	Var. 1768	Var. 1806	Var. 1844	Var. 1882	Var. 1920	Var. 1958	Var. 1996	Var. 2034
5,4 ± 0,1	Var. 1769	Var. 1807	Var. 1845	Var. 1883	Var. 1921	Var. 1959	Var. 1997	Var. 2035
5,5 ± 0,1	Var. 1770	Var. 1808	Var. 1846	Var. 1884	Var. 1922	Var. 1960	Var. 1998	Var. 2036
5,6 ± 0,1	Var. 1771	Var. 1809	Var. 1847	Var. 1885	Var. 1923	Var. 1961	Var. 1999	Var. 2037
5,7 ± 0,1	Var. 1772	Var. 1810	Var. 1848	Var. 1886	Var. 1924	Var. 1962	Var. 2000	Var. 2038
5,8 ± 0,1	Var. 1773	Var. 1811	Var. 1849	Var. 1887	Var. 1925	Var. 1963	Var. 2001	Var. 2039
5,9 ± 0,1	Var. 1774	Var. 1812	Var. 1850	Var. 1888	Var. 1926	Var. 1964	Var. 2002	Var. 2040
6,0 ± 0,1	Var. 1775	Var. 1813	Var. 1851	Var. 1889	Var. 1927	Var. 1965	Var. 2003	Var. 2041
5	Var. 1776	Var. 1814	Var. 1852	Var. 1890	Var. 1928	Var. 1966	Var. 2004	Var. 2042
5,1	Var. 1777	Var. 1815	Var. 1853	Var. 1891	Var. 1929	Var. 1967	Var. 2005	Var. 2043
5,2	Var. 1778	Var. 1816	Var. 1854	Var. 1892	Var. 1930	Var. 1968	Var. 2006	Var. 2044
5,3	Var. 1779	Var. 1817	Var. 1855	Var. 1893	Var. 1931	Var. 1969	Var. 2007	Var. 2045
5,4	Var. 1780	Var. 1818	Var. 1856	Var. 1894	Var. 1932	Var. 1970	Var. 2008	Var. 2046
5,5	Var. 1781	Var. 1819	Var. 1857	Var. 1895	Var. 1933	Var. 1971	Var. 2009	Var. 2047
5,6	Var. 1782	Var. 1820	Var. 1858	Var. 1896	Var. 1934	Var. 1972	Var. 2010	Var. 2048
5,7	Var. 1783	Var. 1821	Var. 1859	Var. 1897	Var. 1935	Var. 1973	Var. 2011	Var. 2049
5,8	Var. 1784	Var. 1822	Var. 1860	Var. 1898	Var. 1936	Var. 1974	Var. 2012	Var. 2050
5,9	Var. 1785	Var. 1823	Var. 1861	Var. 1899	Var. 1937	Var. 1975	Var. 2013	Var. 2051
6	Var. 1786	Var. 1824	Var. 1862	Var. 1900	Var. 1938	Var. 1976	Var. 2014	Var. 2052

**Tabela 8.** Combinações de pH e da concentração final de etanol útil para baixo pH, precipitação elevada de álcool de um conjunto Cohn.

Concentração final de Etanol [% (v/v)]			
pH	28	29	30
5,0-6,0	Var. 2053	Var. 2091	Var. 2129
5,1-5,9	Var. 2054	Var. 2092	Var. 2130
5,2-5,8	Var. 2055	Var. 2093	Var. 2131
5,3-5,7	Var. 2056	Var. 2094	Var. 2132
5,4-5,6	Var. 2057	Var. 2095	Var. 2133
5,0 ± 0,2	Var. 2058	Var. 2096	Var. 2134
5,1 ± 0,2	Var. 2059	Var. 2097	Var. 2135

Concentração final de Etanol [% (v/v)]			
pH	28	29	30
5,2 ± 0,2	Var. 2060	Var. 2098	Var. 2136
5,3 ± 0,2	Var. 2061	Var. 2099	Var. 2137
5,4 ± 0,2	Var. 2062	Var. 2100	Var. 2138
5,5 ± 0,2	Var. 2063	Var. 2101	Var. 2139
5,6 ± 0,2	Var. 2064	Var. 2102	Var. 2140
5,7 ± 0,2	Var. 2065	Var. 2103	Var. 2141
5,8 ± 0,2	Var. 2066	Var. 2104	Var. 2142
5,9 ± 0,2	Var. 2067	Var. 2105	Var. 2143
6,0 ± 0,2	Var. 2068	Var. 2106	Var. 2144
5,0 ± 0,1	Var. 2069	Var. 2107	Var. 2145
5,1 ± 0,1	Var. 2070	Var. 2108	Var. 2146
5,2 ± 0,1	Var. 2071	Var. 2109	Var. 2147
5,3 ± 0,1	Var. 2072	Var. 2110	Var. 2148
5,4 ± 0,1	Var. 2073	Var. 2111	Var. 2149
5,5 ± 0,1	Var. 2074	Var. 2112	Var. 2150
5,6 ± 0,1	Var. 2075	Var. 2113	Var. 2151
5,7 ± 0,1	Var. 2076	Var. 2114	Var. 2152
5,8 ± 0,1	Var. 2077	Var. 2115	Var. 2153
5,9 ± 0,1	Var. 2078	Var. 2116	Var. 2154
6,0 ± 0,1	Var. 2079	Var. 2117	Var. 2155
5	Var. 2080	Var. 2118	Var. 2156
5,1	Var. 2081	Var. 2119	Var. 2157
5,2	Var. 2082	Var. 2120	Var. 2158
5,3	Var. 2083	Var. 2121	Var. 2159
5,4	Var. 2084	Var. 2122	Var. 2160
5,5	Var. 2085	Var. 2123	Var. 2161
5,6	Var. 2086	Var. 2124	Var. 2162
5,7	Var. 2087	Var. 2125	Var. 2163
5,8	Var. 2088	Var. 2126	Var. 2164
5,9	Var. 2089	Var. 2127	Var. 2165
6	Var. 2090	Var. 2128	Var. 2166

[00101] Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para o fracionamento de proteínas do sangue numa amostra de plasma, o método compreendendo os estágios de: A1PI e precipitantes imunoglobulinas em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol a um conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; em que o primeiro sobrenadante contém pelo menos 75% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v).

[00102] Em uma modalidade dos métodos aqui previstos, pelo menos, 90% do teor de imunoglobulina do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 95% do teor de imunoglobulina do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 99% do teor de imunoglobulina do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de imunoglobulina do conjunto de partida Cohn é precipitado a reação de precipitação inicial. Numa modalidade mais específica, o teor de imunoglobulina do conjunto de partida Cohn refere-se ao teor de IgG, IgA e IgM a partir do conjunto de Cohn. Numa modalidade específica, o teor de imunoglobulina do conjunto de partida Cohn refere-se ao teor de IgG a partir do conjunto de Cohn.

[00103] Em uma modalidade dos métodos aqui previstos, pelo menos, 80% do teor de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 90% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 95% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação.

[00104] Em uma modalidade dos métodos aqui previstos, pelo menos, 70% do teor de fator H para o conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 80% do teor de fator H para o conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 90% do teor de fator H para o conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de

precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 95% do teor de fator H para o conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de fator H para o conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação.

[00105] Em uma modalidade dos métodos aqui previstos, pelo menos, 70% do teor de inter-alfa-inibidor (IaIP) do conjunto de partida Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 80% do teor de IaIP do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 90% do teor de IaIP do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 95% do teor de IaIP do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do IaIP conteúdo do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação.

[00106] Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para o fracionamento de proteínas do sangue em uma associação de Cohn, o método compreendendo os estágios de: imunoglobulinas precipitam, A1PI, o Fator H, e IaIP num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol a um conjunto Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; em que o primeiro precipitado contém i.) pelo menos 95%, de preferência pelo menos 97%, mais preferencialmente pelo menos 99% do teor de IgG do

conjunto a partir de Cohn, ii.) pelo menos 90%, de preferência pelo menos 95%, mais de preferência pelo menos 97% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn, iii.) pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95% do teor de fator H para o conjunto a partir Cohn, e iv.) pelo menos 80%, de preferência pelo menos 90%, mais preferencialmente pelo menos 95% do teor de IaIP do conjunto a partir de Cohn, e ainda em que o primeiro sobrenadante contém pelo menos 70%, de preferência pelo menos 80%, mais preferencialmente pelo menos 90 % do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn. Numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol com um conjunto de plasma de partida (o conjunto de Cohn) para uma concentração final de entre 22% e 28% (v/v) a um pH entre 5,0 e 6,0. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de 25% (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de 5,5. Em ainda outras modalidades, a concentração final de etanol e o pH do primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

#### **IV. Preparação de Composições de imunoglobulina**

[00107] Geralmente, a preparação de imunoglobulina de acordo com a presente invenção pode ser preparada a partir de qualquer material de plasma de partida adequado, por exemplo, plasma ou recuperado de plasma de origem. Num exemplo típico, o sangue ou plasma é recolhido de dadores saudáveis. Normalmente, o sangue é recolhido a partir da mesma espécie de animal como o objeto para o qual a preparação de imunoglobulina será administrada (normalmente referido como "homólogas" imunoglobulinas). O plasma de origem recuperado ou pode ou pode não ser crio-precipitado para proporcionar um crio-sobrenadante. Para além disso, o plasma ou o crio-sobrenadante também podem ser tratados para remover um ou mais fator sanguíneo, por adsorção, a cromatografia de troca iônica, ou outro método de cromatografia. As imunoglobulinas são em seguida precipitadas a partir do plasma ou de material de crio-sobrenadante, referido como um "conjunto de Cohn," em baixo pH, elevadas condições de álcool para formar uma fração I-IV-1 precipitado.

[00108] As imunoglobulinas podem ser ainda mais enriquecidas da Fração I-IV-1 precipitado por procedimentos adequados, por exemplo, precipitação (fracionamento de álcool ou de polietileno-glicol de fracionamento), métodos cromatográficos (por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de imunoafinidade, etc), filtração (ultrafiltração/diafiltração, nanofiltração), ultracentrifugação, a preparação de eletroforese, e semelhantes. (Ver, por exemplo, Cohn *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundern *et al.*, Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet *et al.*, Vox Sang. 13:93-102 (1967); Patentes Nº US 5122373 e 5177194; PCT/US2010/036470 e PCT/US2011/038247; cujas divulgações são aqui incorporadas por referência na sua totalidade para todos os fins).

##### **A. Processamento a montante**



[00109] Entre outros aspectos, a presente invenção fornece métodos para o fracionamento de proteínas presentes no plasma reunido pela execução de um estágio de precipitação inicial que precipita a maior parte do teor de imunoglobulina e de alfa-1-antitripsina de plasma de partida. Para aumentar ainda mais a pureza das proteínas individuais de plasma (por exemplo, IgG, A1PI, o Fator H, IaIP, etc) encontrada no precipitado e sobrenadante do primeiro estágio de precipitação, estas composições podem ser adicionalmente enriquecidas por fracionamento (por exemplo, por precipitação com álcool, precipitação com PEG, salting out, etc), cromatografia, filtração, ou qualquer outro método. Embora a utilização destas várias técnicas para o enriquecimento de uma proteína derivada de plasma possa ser realizada em qualquer ordem, em uma modalidade particular, o primeiro precipitado e/ou do sobrenadante é fracionado em primeiro lugar (por exemplo, por precipitação com etanol) e, em seguida, enriquecido utilizando cromatográfica e/ou técnicas de filtração. No contexto da presente invenção, a reação de precipitação inicial e subsequente fracionamento são agregados, referido como "estágios de processamento a montante", enquanto que os estágios cromatográficos e de filtração são agregados, referido como "estágios de processamento a jusante".

### **1. Precipitação de Imunoglobulina em Massa**

[00110] Como aqui descrito, os inventores descobriram um método aperfeiçoado para o plasma humano de fracionamento, a fim de purificar as proteínas do sangue terapeuticamente benéficos, tais como imunoglobulinas, alfa-1-antitripsina (A1PI), o fator H, proteínas inter-alfa-(Inibidor IaIP), albumina, fibrinogênio, etc Este método incorpora um estágio inicial de purificação no qual a maior parte da imunoglobulina, A1PI, o fator H, IaIP, e teor em fibrinogênio do conjunto a partir de Cohn (isto é, o sangue, o plasma, e/ou pré-tratada de plasma) é precipitado e a maioria do teor de albumina a partir do conjunto de Cohn permanece no sobrenadante. De um modo

vantajoso, os inventores desenvolveram um método para separar as imunoglobulinas de A1PI, o fator H, e IaIP por extração das imunoglobulinas, mas não as outras proteínas, a partir do precipitado inicial. Em particular, os inventores verificaram que o tratamento de uma suspensão do precipitado inicial com dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ), melhora a retenção de A1PI, o fator H, e IaIP na fração insolúvel. Sem estar limitado pela teoria, os inventores acreditam que, sob certas condições, o fator H, A1PI e IaIP, que podem ser inicialmente extraídos a partir do precipitado, ligam-se ao dióxido de silício finamente dividido, o qual é subsequentemente removido com a porção insolúvel da suspensão. Separação do sobrenadante resultante (isto é, a fração solúvel da suspensão) fornece uma solução enriquecida contendo a maior parte do teor de imunoglobulina da Fração Cohn partida.

[00111] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida a partir de um conjunto de Cohn, o método compreendendo os estágios de: co-precipitação de imunoglobulinas e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn, numa primeira precipitação o estágio, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; e recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Em geral, entende-se qualquer substância química para a precipitação de imunoglobulinas e A1PI pode ser utilizado, incluindo, mas não limitadas a, precipitação com álcool (por exemplo, utilizando-se etanol ou metanol), precipitação utilizando polímeros solúveis em água (por exemplo, PEG ou dextrana), e para as trocas salinas (por exemplo, utilizando fosfato de amônio, sulfato de amônio, citrato de sódio, etc). Numa modalidade preferida, a precipitação é precipitação com álcool, precipitação, de preferência etanol. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00112] Numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol com o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% (v/v) a um pH entre 5,0 e 6,0. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de 25% (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de 5,5. Em ainda outras modalidades, a concentração final de etanol e o pH do primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00113] Os métodos aqui previstos proporcionam rendimentos significativamente mais elevados de recuperação de imunoglobulina no produto final enriquecido devido à precipitação de uma parte do conteúdo do conjunto de imunoglobulina a partir de Cohn inicial na reação de precipitação, em comparação com o estado da técnica dos processos de purificação que se baseiam nos estágios iniciais de baixo teor alcoólico de precipitação (ou seja, Fração I precipitação).

[00114] Deste modo, numa modalidade dos métodos aqui previstos,

pelo menos, 90% do teor de imunoglobulina do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 95% do teor de imunoglobulina do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 99% do teor de imunoglobulina do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de imunoglobulina do conjunto de partida Cohn é precipitado a reação de precipitação inicial. Numa modalidade específica, o teor de imunoglobulina do conjunto de partida Cohn refere-se ao teor de IgG a partir do conjunto de Cohn.

[00115] Tal como mostrado nos exemplos aqui previstos, a utilização de um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool (isto é, fração I-IV-1) resulta na precipitação a precipitação de pelo menos 99% do teor de IgG do conjunto a partir de Cohn. Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% do teor de IgG a partir de um conjunto de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperação de IgG a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição

de IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v).

[00116] Tal como evidenciado pelos dados apresentados na Tabela 15 e Tabela 31, maior do que 97% do teor de alfa-1-antitripsina (A1PI) de um conjunto Cohn também é precipitado por um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool. Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; e recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00117] Além disso, verificou-se que mais de 90% do teor de albumina de um conjunto de Cohn não é precipitado por um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool (Tabela 33), e pode, assim, ser recuperados a

partir do sobrenadante. Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; e recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecida. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

## **2. Extração e separação de imunoglobulinas**

[00118] Em comparação com uma Fração Cohn II + III precipitado ou Kistler-Nitschmann precipitar, o precipitado inicial formado pelos métodos aqui fornecidos contém níveis substancialmente mais elevados de proteínas que não imunoglobulina, incluindo A1PI e fibrinogênio. Por exemplo, como mostrado na Tabela 30, cerca de 100% do teor em fibrinogênio do conjunto a

partir de Cohn é co-precipitado com imunoglobulinas de um baixo pH inicial, precipitação reação de álcool elevado. Isto está em contraste com os esquemas de purificação de Cohn-Oncley e Kistler-Nitschmann, no qual a maior parte do fibrinogênio é removido num estágio de precipitação baixo álcool inicial (Fração I precipitação). Da mesma forma, como se mostra na Tabela 15 e Tabela 31, maior do que 97% do teor de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir do conjunto de Cohn é co-precipitado com imunoglobulinas de um baixo pH inicial, precipitação reação de álcool elevado. Em contraste, a maior parte dos A1PI não está co-precipitadas com as imunoglobulinas nos esquemas de purificação de Cohn-Oncley e Kistler-Nitschmann. Em vez disso, A1PI encontra-se na Fração II + III de sobrenadante ou sobrenadante A.

[00119] Por conseguinte, a fim de proporcionar composições farmacêuticas grau de imunoglobulina, os contaminantes tais como A1PI e o fibrinogênio presente no precipitado inicial necessidade de ser removido a partir da composição de imunoglobulina. Isto pode ser conseguido, por exemplo, por fracionamento do primeiro precipitado (por exemplo, por precipitação diferencial com álcool, polímeros hidrofílicos não-iônicos, ou salting-out), metodologias cromatográficas, ou metodologias de filtração.

[00120] Numa modalidade, o primeiro precipitado é suspenso em água para injeção (WFI) ou um tampão de força iônica baixa adequada para extrair as imunoglobulinas a partir do precipitado. Em certas modalidades, a suspensão é então tratada com dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ), e a porção solúvel da suspensão contendo as imunoglobulinas é separada da porção insolúvel da suspensão que contém a maior parte do A1PI e fibrinogênio.

[00121] Soluções adequadas para a extração do primeiro precipitado terão geralmente um pH entre 4,0 e 5,5. Em certas modalidades, a solução tenha um pH entre 4,5 e 5,0, em outras modalidades, a solução de extração, terá um pH de cerca de 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1,

5,2, 5,3, 5,4 ou 5,5. Numa modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,7 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,8 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,9 \pm 0,1$ . Em geral, estes requisitos podem ser satisfeitos de pH usando um agente tamponante selecionado a partir de, por exemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, suas misturas, e semelhantes. Concentrações de tampão adequados variam tipicamente entre 5 e 100 mM, ou de 10 a 50 mM, ou 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 mm de agente de tamponamento.

[00122] O tampão de extração terá de preferência uma condutividade de 0,5 mS/cm a 2,0 mS/cm. Por exemplo, em certas modalidades, a condutividade do tampão de extração vai ser de  $0,5 \pm 0,1$  mS/cm ou de  $0,6 \pm 0,1$ ,  $0,7 \pm 0,1$ ,  $0,8 \pm 0,1$ ,  $0,9 \pm 0,1$ ,  $1,0 \pm 0,1$ ,  $1,1 \pm 0,1$ ,  $1,2 \pm 0,1$ ,  $1,3 \pm 0,1$ ,  $1,4 \pm 0,1$ ,  $1,5 \pm 0,1$ ,  $1,6 \pm 0,1$ ,  $1,7 \pm 0,1$ ,  $1,8 \pm 0,1$ ,  $1,9 \pm 0,1$ , ou  $2,0 \pm 0,1$  mS/cm. Um versado na técnica saberá como gerar tampões de extração possuindo uma condutividade adequada. Em uma modalidade particular, o tampão de extração contém 5 mM de fosfato de sódio monobásico e acetato de 5 mM, a um pH de  $4,8 \pm 0,2$  e condutividade de 0,7-0,9 mS/cm.

[00123] Numa modalidade, o dióxido de silício finamente dividido é misturado com a fração I-IV-1 de suspensão antes da filtração. Numa modalidade, este estágio de pré-tratamento compreende a adição de partículas de dióxido de sílica finamente dividido (por exemplo, sílica, Aerosil®), seguido por um período de 40 a 80 minutos de incubação, durante o qual a suspensão é continuamente misturada. Em certas modalidades, o período de incubação será entre cerca de 50 minutos e cerca de 70 minutos, ou cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou mais minutos. Geralmente, o tratamento será realizado a temperatura entre 0°C e 10°C, ou entre 2°C e 8°C. Em certas modalidades, o tratamento pode ser realizado a cerca de 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, ou 10°C. Em uma modalidade



particular, o tratamento é realizado a temperatura entre 2°C e 10°C. Numa modalidade preferida, o tratamento é realizado entre 5°C e 10°C.

[00124] Numa modalidade, a sílica é adicionada a uma concentração de entre 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa outra modalidade, a sílica é adicionada a uma concentração de entre 30 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 80 g/kg Fração I-IV-1 precipitado. Em certas modalidades, a sílica pode ser adicionada a uma concentração de cerca de 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado, ou cerca de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa modalidade específica, a sílica (por exemplo, Aerosil 380 ou equivalente) é adicionado à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final de  $40 \pm 20$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. A mistura realiza-se a 2°C a 8°C durante pelo menos 50 a 70 minutos.

[00125] Em certas modalidades, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma composição de imunoglobulina para uma concentração de 0,01 g/g de proteína total de 10 g/g de proteína total. Numa outra modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma composição de imunoglobulina para uma concentração de 0,01 g/g de proteína total de 5 g/g de proteína total. Numa outra modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma composição de imunoglobulina para uma concentração de 0,02 g/g de proteína total de 4 g/g de proteína total. Numa modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma concentração final de pelo menos 0,1 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de, pelo menos, 0,2 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de pelo menos 0,25 g por grama de proteína total. Em outras modalidades específicas, a sílica é adicionada a uma concentração de pelo menos 1 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma

concentração de pelo menos 2 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de, pelo menos, 2,5 g por grama de proteína total. Em ainda outras modalidades específicas, o dióxido de silício finamente dividido é adicionado a uma concentração de pelo menos 0,01 g/g de proteína total ou, pelo menos, 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g ou mais por grama de proteína total.

[00126] Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade

preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00127] Além disso, verificou-se que mais de 90% do teor de albumina de um conjunto de Cohn não é precipitado por um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool (Tabela 33), e pode, assim, ser recuperados a partir do sobrenadante. Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, e ainda em que a partir de 80% de 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida.. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG presente na porção solúvel da suspensão é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda

enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade específica, as partes solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

### **3. Fracionamento**

[00128] Numa modalidade, as imunoglobulinas recuperadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão (suspensão da pasta de I-IV-1) são ainda mais enriquecida por fracionamento. Geralmente, pode ser usado qualquer método de fracionamento (por exemplo, o álcool ou a precipitação do polímero, as trocas salinas, etc). Numa modalidade preferida, as imunoglobulinas são ainda mais enriquecidas por fracionamento da porção solúvel da primeira suspensão, por precipitação com etanol. Numa modalidade, as imunoglobulinas são enriquecidas por meio da adição de etanol para a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final e pH adequado para precipitar as imunoglobulinas, enquanto, pelo menos, um contaminante não é precipitado. Numa outra modalidade, as imunoglobulinas são enriquecidas pela adição de etanol para a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final e pH adequado para precipitar pelo menos um contaminante, enquanto as imunoglobulinas não são precipitadas.

[00129] Fracionamento adicional do material recuperado do baixo pH inicial, precipitação elevada de álcool etapa é opcional. Em certas

modalidades, a composição de imunoglobulina recuperado do baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool pode ser adicionalmente enriquecido com um ou mais dos vários estágios de processamento a jusante aqui descritos. Em outras modalidades, a composição recuperada do baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool pode ser ainda processada por meio da utilização de uma ou mais etapas adicionais de precipitação. Em certas modalidades, um estágio de precipitação adicional de imunoglobulina pode ser utilizado para concentrar uma composição de imunoglobulina, preparar uma imunoglobulina para o armazenamento, e/ou preparar uma composição de imunoglobulina para o transporte.

[00130] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida a partir de um conjunto de Cohn, o método compreendendo os estágios de: co-precipitação de imunoglobulinas e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn, numa primeira precipitação o estágio, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; remoção de A1PI a partir da suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removido da primeira suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00131] Numa modalidade exemplar, o segundo estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol para a porção solúvel da segunda suspensão (por exemplo, um filtrado ou sobrenadante da suspensão formada após filtração ou centrifugação) a uma concentração final de entre 22% e 28% (v/v) a um pH entre 6,5 e 7,5. Numa modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de 25% (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de 7,0. Numa modalidade particular, o segundo estágio de precipitação é realizado utilizando uma concentração final de etanol de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ .

[00132] Numa modalidade preferida, a primeira fração solúvel ou de suspensão dos mesmos, é tratado com um detergente antes de se realizar o segundo estágio de precipitação. Numa modalidade, a primeira fração solúvel ou de suspensão do mesmo é ainda tratado com citrato antes de se realizar o segundo estágio de precipitação. Em uma modalidade particular, o polisorbato-80 é adicionada à primeira fração solúvel ou de suspensão do mesmo e a composição foi incubada durante pelo menos 30 minutos. Numa outra modalidade particular, citrato de sódio di-hidrato é posteriormente adicionada à primeira fração solúvel ou de suspensão do mesmo e a

composição foi incubada durante pelo menos 30 minutos adicionais. Numa modalidade, o polisorbato-80 é adicionada a uma concentração final de cerca de 0,2% (p/v). Numa modalidade, o citrato de sódio di-hidratado é então misturado na solução a uma concentração final de cerca de 8 g/L. Em uma modalidade particular, as incubações são realizadas a uma temperatura entre cerca de 2 e 8°C, com agitação contínua de.

[00133] Em uma modalidade particular, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% do teor de IgG a partir de um conjunto de plasma de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00134] Numa modalidade específica, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% do teor de IgG a partir de um conjunto de plasma de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela

adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação por mistura de etanol à primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00135] Numa modalidade, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; remoção de A1PI a partir da suspensão; recuperar a fração solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as



imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00136] Numa modalidade específica, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30 % a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; remoção de A1PI a partir da suspensão; recuperar a fração solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação por mistura de etanol à primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI

separada da primeira suspensão é enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00137] Numa outra modalidade, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Numa outra modalidade, a albumina presente no primeiro sobrenadante é enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3,

Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade preferida, entre 90% e 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00138] Numa outra modalidade, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Numa outra modalidade, a albumina presente no primeiro sobrenadante é enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a

partir de variações 1-2166, como listado na Tabela, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade preferida, entre 90% e 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00139] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final

de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, a partir de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00140] Numa modalidade específica, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$

(v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, a partir de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00141] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição

de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG presente na porção solúvel da suspensão é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00142] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão

contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG presente na porção solúvel da suspensão é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00143] Numa modalidade, as imunoglobulinas são recuperadas a partir do segundo precipitado por suspensão do precipitado com um tampão



de extração frio. Por exemplo, o segundo precipitado é suspenso em uma proporção de 1 parte de precipitado de 2-15 partes de água para injeção (WFI), ou tampão de baixa condutividade. Numa modalidade preferida, o segundo precipitado suspenso em uma proporção de 1 parte para precipitar 4-5 partes, preferivelmente 3,5 partes, WFI. Numa modalidade, a etapa de suspensão é realizada a uma temperatura entre 0°C e 8°C. Numa modalidade, o valor final de pH da solução é ajustado para 4,5-5,6, de preferência para  $5,2 \pm 0,2$ . Numa modalidade, este ajustamento do pH é realizado com ácido acético. Numa modalidade, a condutividade da suspensão é aumentada para entre 2,5 e 6,0 mS/cm, para aumentar a solubilidade das imunoglobulinas. Numa modalidade, a condutibilidade é aumentada pela adição de cloreto de sódio.

[00144] Soluções adequadas para a extração do segundo precipitado incluir WFI e buffers de baixa condutividade. Numa modalidade, um tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 10 mS/cm. Em outras modalidades, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade inferior a cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 mS/cm. Numa modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 6 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 4 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 2 mS/cm.

[00145] Numa modalidade, a porção solúvel da suspensão, contendo imunoglobulinas, é separada da porção insolúvel. Numa modalidade, isto é feito pela filtragem da suspensão com um filtro de profundidade com um tamanho nominal de poro de 0,1  $\mu$ m e 0,4  $\mu$ m. Numa modalidade, o tamanho nominal de poro do filtro de profundidade é de 0,2  $\mu$ m (por exemplo, o filtro Cuno VR06 ou equivalente). Numa modalidade, o filtro é lavado com WFI ou

um tampão adequado, após filtração para se recuperar imunoglobulina adicional e o pós-lavagem adicionado ao filtrado. Numa modalidade preferida, o pós-lavagem do filtro é realizada utilizando uma solução de cloreto de sódio com uma condutividade de entre cerca de 2,5 e cerca de 6,0 mS/cm. Numa outra modalidade, a segunda suspensão é centrifugada para recuperar a porção solúvel.

## **B. Processamento a Jusante**

[00146] Frações de imunoglobulina obtida após fracionamento usando um estágio de precipitação inicial que precipita imunoglobulinas e alfa-1-antitripsina (A1PI), mas não a albumina, pode ser ainda mais enriquecido de acordo com métodos bem conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação: cromatografia (por exemplo, de permuta aniônica cromatografia, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de hidroxiapatite (HAP), Proteína A cromatografia de afinidade, cromatografia de imunoafinidade, cromatografia de exclusão de tamanho, etc); filtração (por exemplo, a ultrafiltração e/ou diafiltração); e uma ou mais etapas de redução de vírus (por exemplo, nanofiltração, tratamento com solvente e detergente, irradiação UV, tratamento pelo calor, a baixa de pH de incubação, etc).

[00147] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida a partir de um conjunto de Cohn que inclui um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool e, pelo menos, um estágio de processamento a jusante (por exemplo, cromatografia). Em certas modalidades, o método compreende ainda um segundo estágio de precipitação, antes da, pelo menos, um estágio de processamento a jusante (por exemplo, uma etapa de precipitação PptG). A segunda precipitação é opcional, como uma suspensão de baixo pH inicial, precipitado elevado de álcool pode ser utilizado diretamente para a purificação a jusante.

[00148] Numa modalidade, as imunoglobulinas presentes em uma composição derivada de plasma preparado utilizando um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool são ainda mais enriquecidas por realizar pelo menos uma etapa de cromatografia. Numa modalidade, o estágio cromatográfico é selecionado a partir de cromatografia de permuta de ânions, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), cromatografia de hidroxiapatite (HAP), Proteína A cromatografia de afinidade, cromatografia de imuno-afinidade, e cromatografia por exclusão de tamanho. Em uma modalidade particular, as imunoglobulinas são enriquecidas realizando cromatografia de troca aniônica. Numa outra modalidade, as imunoglobulinas são enriquecidas realizando cromatografia de permuta catiônica. Numa modalidade específica, as imunoglobulinas são ainda mais enriquecidas por executar tanto a cromatografia de permuta catiônica e aniônica.

[00149] Numa modalidade particular, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, as imunoglobulinas de ligação para uma troca de cátions resina; eluição das imunoglobulinas a partir da troca de cátions para formar um eluato de permuta catiônica; fazer contatar o fluido de permuta de cátions com uma resina de troca aniônica; e recuperar

as imunoglobulinas que não se ligam à resina, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir da etapa de cromatografia de permuta aniônica é enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa outra modalidade, entre 80% e 100%, de preferência entre 90% e 100%, do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, o método compreende ainda, pelo menos, um estágio de redução de vírus/inativação. Numa modalidade preferida, o método compreende ainda, pelo menos, dois estágios de redução/inativação viral. Numa modalidade mais preferida, o método compreende ainda, pelo menos três etapas de redução/inativação viral. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00150] Numa modalidade particular, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro

suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; imunoglobulinas precipitadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado contendo imunoglobulinas e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; recuperar as imunoglobulinas a partir do segundo precipitado; ligação das imunoglobulinas a uma resina de permuta catiônica; eluição das imunoglobulinas a partir da troca de cátions para formar um eluato de permuta catiônica; fazer contatar o fluido de permuta de cátions com uma resina de troca aniônica; e recuperar as imunoglobulinas que não se ligam à resina, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir da etapa de cromatografia de permuta aniônica é enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa outra modalidade, entre 80% e 100%, de preferência entre 90% e 100%, do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, o método compreende ainda, pelo

menos, um estágio de redução de vírus/inativação. Numa modalidade preferida, o método compreende ainda, pelo menos, dois estágios de redução/inativação viral. Numa modalidade mais preferida, o método compreende ainda, pelo menos três etapas de redução/inativação viral. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00151] Numa modalidade particular, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: A1PI e precipitantes imunoglobulinas de um conjunto de Cohn em um pH baixo, de alta álcool etapa de precipitação; separar as imunoglobulinas precipitadas e A1PI; enriquecer a composição de imunoglobulina realizando cromatografia de permuta catiônica; e enriquecer ainda mais a composição de imunoglobulina através da realização de cromatografia de permuta aniônica. Numa modalidade, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade, o método compreende ainda, pelo menos, um estágio de redução de vírus/inativação. Numa modalidade preferida, o método compreende ainda, pelo menos, dois estágios de redução/inativação viral. Numa modalidade mais preferida, o método compreende ainda, pelo menos três etapas de redução/inativação viral. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00152] Numa outra modalidade particular, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: A1PI e precipitantes imunoglobulinas de um conjunto de Cohn em um pH baixo, de alta álcool etapa de precipitação; separar as imunoglobulinas precipitadas e A1PI; precipitar as imunoglobulinas separadas em um segundo estágio de

precipitação; enriquecer a composição de imunoglobulina realizando cromatografia de permuta catiônica; e enriquecer ainda mais a composição de imunoglobulina através da realização de cromatografia de permuta aniônica. Numa modalidade, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade, o método compreende ainda, pelo menos, um estágio de redução de vírus/inativação. Numa modalidade preferida, o método compreende ainda, pelo menos, dois estágios de redução/inativação viral. Numa modalidade mais preferida, o método compreende ainda, pelo menos três etapas de redução/inativação viral. Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

[00153] Numa outra modalidade particular, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição de imunoglobulina enriquecida, compreendendo o método os estágios de: A1PI e precipitantes imunoglobulinas de um conjunto de Cohn em um pH baixo, de alta álcool etapa de precipitação; separar as imunoglobulinas precipitadas e A1PI; precipitar as imunoglobulinas separadas em um segundo estágio de precipitação; tratar a composição de imunoglobulina com um solvente e detergente para inativar vírus; enriquecer a composição de imunoglobulina realizando cromatografia de permuta catiônica; enriquecer ainda mais a composição de imunoglobulina através da realização de cromatografia de troca aniônica; e nanofiltrando a composição de imunoglobulina para remover vírus. Numa modalidade, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6 , e Tabela 7. Numa modalidade, o método compreende ainda a composição de imunoglobulina concentração por

ultrafiltração/diafiltração a uma concentração final de proteína de cerca de 5 g/L a 25 g/l. Numa modalidade particular, a concentração final da composição de imunoglobulina enriquecida é  $5 \pm 1\%$  (p/v). Numa outra modalidade particular, a concentração final da composição de imunoglobulina enriquecida é de  $10 \pm 1\%$  (p/v). Numa outra modalidade particular, a concentração final da composição de imunoglobulina enriquecida é de  $15 \pm 1\%$  (p/v). Numa outra modalidade particular, a concentração final da composição de imunoglobulina enriquecida é  $20 \pm 2\%$  (p/v). Numa outra modalidade particular, a concentração final da composição de imunoglobulina enriquecida é  $25 \pm 2\%$  (p/v). Numa modalidade, a composição de imunoglobulina enriquecida é uma composição de IgG.

### **C. Enriquecimento Exemplar de IgG de Precipitado da Fração I-IV-1**

#### **1. Extração Precipitado da Fração I-IV-1 O**

[00154] A fim de solubilizar o teor de IgG de precipitado da Fração I-IV-1, um tampão de extração a frio é utilizado para re-suspender o precipitado II + III fracionamento numa proporção típica de precipitado de 1 parte para 15 partes de tampão de extração. Outras razões de re-suspensão adequado podem ser utilizadas, por exemplo, de 1: 8 a 1:30, ou 1:10 - 1:20, ou 1:12 - 1:18, ou 1:13-1:17, ou 1:14-1:16. Em certas modalidades, a proporção de re-suspensão pode ser de 1: 8, 1: 9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1: 30, ou mais elevada.

[00155] Soluções adequadas para a extração do primeiro precipitado terão geralmente um pH entre 4,0 e 5,5. Em certas modalidades, a solução tenha um pH entre 4,5 e 5,0, em outras modalidades, a solução de extração, terá um pH de cerca de 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 ou 5,5. Numa modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,7 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,8 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração



é de  $4,9 \pm 0,1$ . Em geral, estes requisitos podem ser satisfeitos de pH usando um agente tamponante selecionado a partir de, por exemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, suas misturas, e semelhantes. Concentrações de tampão adequados variam tipicamente entre 5 e 100 mM, ou de 10 a 50 mM, ou 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 mm de agente de tamponamento.

[00156] O tampão de extração terá de preferência uma condutividade de 0,5 mS/cm a 2,0 mS/cm. Por exemplo, em certas modalidades, a condutividade do tampão de extração vai ser de  $0,5 \pm 0,1$  mS/cm, ou de cerca de  $0,6 \pm 0,1$ ,  $0,7 \pm 0,1$ ,  $0,8 \pm 0,1$ ,  $0,9 \pm 0,1$ ,  $1,0 \pm 0,1$ ,  $1,1 \pm 0,1$ ,  $1,2 \pm 0,1$ ,  $1,3 \pm 0,1$ ,  $1,4 \pm 0,1$ ,  $1,5 \pm 0,1$ ,  $1,6 \pm 0,1$ ,  $1,7 \pm 0,1$ ,  $1,8 \pm 0,1$ ,  $1,9 \pm 0,1$ , ou  $2,0 \pm 0,1$  mS/cm. Um versado na técnica saberá como gerar tampões de extração possuindo uma condutividade adequada.

[00157] Numa modalidade exemplar, a Fração I-IV-1 precipitado é extraído com um tampão de pasta de proporção de 1:15 utilizando um tampão de extração contendo 5 mM de fosfato de sódio monobásico e acetato de 5 mM, a pH de que é ajustado para  $4,8 \pm 0,2$  com ácido acético. Numa modalidade, o pH da solução é mantido a um pH de  $4,8 \pm 0,3$  para a duração do processo de extração. Numa modalidade específica, o pH da solução é mantido a um pH de  $4,8 \pm 0,2$  para a duração do processo de extração.

[00158] Em geral, a extração é realizada a uma temperatura entre 0°C e 10°C, ou entre 2°C e 8°C. Em certas modalidades, a extração pode ser realizada a  $0^\circ\text{C} \pm 1$ ,  $1 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $2 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $3 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , de  $6 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $7 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $8 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $9 \pm 1^\circ\text{C}$  ou  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ . Em uma modalidade particular, a extração é efetuada entre 2°C e 10°C. Tipicamente, o processo de extração irá prosseguir durante entre 60 e 300 minutos, ou de entre 120 e 240 minutos, ou de entre 150 e 210 minutos, enquanto a suspensão é agitada continuamente. Em certas modalidades, o processo de extração irá prosseguir durante cerca de 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210,

220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 minutos, ou mais. Numa modalidade preferida, o processo de extração irá prosseguir durante pelo menos 160 minutos com agitação contínua.

## **2. Tratamento de Dióxido de Silício (SiO<sub>2</sub>)**

[00159] Em comparação com Cohn-Oncley e Kistler-Nitschmann purificações, os precipitados contendo imunoglobulina iniciais formados pelos métodos aqui fornecidos contêm níveis significativamente mais elevados de proteínas que não imunoglobulina, incluindo A1PI, o fibrinogênio, o fator H, e IaIP. Sabe-se que o Fator H e IaIP pode ser ligado por e subsequentemente eluído de dióxido de silício finamente dividido (ver, WO 2011/011753 e PCT/US2011/045099, cujas divulgações são ambos expressamente incorporados por referência na sua totalidade para todos fins). De um modo vantajoso, verificou-se que a inclusão de um estágio de tratamento de SiO<sub>2</sub>, após extração de precipitado da Fração I-IV-1 e antes da filtração da Fração auxiliares de suspensão, da separação de A1PI, o fibrinogênio, o fator H, e IaIP I-IV-1 para o filtro insolúvel formado durante a filtração da fração I-IV-1 de suspensão.

[00160] Deste modo, numa modalidade, o dióxido de silício finamente dividido é misturado com a fração I-IV-1 de suspensão antes da filtração. Numa modalidade, este estágio de pré-tratamento compreende a adição de partículas de dióxido de sílica finamente dividido (por exemplo, sílica, Aerosil), seguido por um período de 40 a 80 minutos de incubação, durante o qual a suspensão é continuamente misturada. Em certas modalidades, o período de incubação será entre cerca de 50 minutos e cerca de 70 minutos, ou cerca de 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ou mais minutos. Geralmente, o tratamento será realizado a temperatura entre 0°C e 10°C, ou entre 2°C e 8°C. Em certas modalidades, o tratamento pode ser realizado a cerca de 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, ou 10°C. Em uma modalidade particular, o tratamento é realizado a temperatura entre 2°C e

10°C. Numa modalidade preferida, o tratamento é realizado entre 5°C e 10°C.

[00161] Em certas modalidades, a sílica é adicionada a uma concentração de entre 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 100 g/kg de precipitado da Fração I-IV-1. Em certas modalidades, a sílica pode ser adicionada a uma concentração de cerca de 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado, ou cerca de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa modalidade específica, a sílica (por exemplo, Aerosil 380 ou equivalente) é adicionado à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. A mistura realiza-se a 2°C a 8°C durante pelo menos 50 a 70 minutos.

[00162] Em certas modalidades, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma composição de IgG a uma concentração de 0,01 g/g de proteína total de 10 g/g de proteína total. Numa outra modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma composição de IgG a uma concentração de 0,01 g/g de proteína total de 5 g/g de proteína total. Numa outra modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma composição de IgG a uma concentração de 0,02 g/g de proteína total de 4 g/g de proteína total. Numa modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma concentração final de pelo menos 0,1 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de, pelo menos, 0,2 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de pelo menos 0,25 g por grama de proteína total. Em outras modalidades específicas, a sílica é adicionada a uma concentração de pelo menos 1 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de pelo menos 2 g por grama de proteína total. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada a uma concentração de, pelo menos, 2,5 g por grama de proteína total. Em ainda outras modalidades específicas, o dióxido de silício finamente dividido é adicionado a uma concentração de pelo menos 0,01 g/g de proteína total ou,

pelo menos, 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g ou mais por grama de proteína total.

### **3. Filtração de Suspensão da Fração I-IV-1**

[00163] De modo a separar a porção solúvel da fração I-IV-1 a partir de imunoglobulinas de suspensão contendo a porção insolúvel contendo fibrinogênio, A1PI, o Fator H, e IaIP, a suspensão é filtrada, tipicamente por meio da filtração de profundidade. Filtros de profundidade que pode ser empregue nos métodos aqui previstos incluem, metálico, vidro, cerâmica, orgânicos (tais como terra de diatomáceas) filtros de profundidade, e outros semelhantes. Exemplos de filtros adequados incluem, sem limitação, Cuno 50SA, Cuno 90SA, e filtros Cuno VR06 (3M). Em alternativa, o estágio de separação pode ser realizado por centrifugação, em vez de filtração.

[00164] Em certas modalidades, um auxiliar de filtração, por exemplo Celpure C300 (Minerais Avançados) ou de Hyflo Super-Cel (World Minerais), é adicionado à suspensão depois do tratamento de dióxido de sílica, para facilitar a filtração de profundidade. Auxiliar de filtração é adicionado a uma concentração final de 0,1 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1 a 1,0 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1, ou de 0,2 kg/kg Fração I-IV-1 a 0,8 kg precipitado/kg de precipitado da Fração I-IV-1, ou a partir de 0,3 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1 a 0,7 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1. Em outras modalidades, um auxiliar de filtração pode ser adicionado a uma concentração final de 0,1 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1 a 0,7 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1, ou a partir de 0,2 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1 a 0,6 kg/kg de precipitado da fração I-IV-1, ou de cerca de 0,3 kg/kg de precipitado da fração I-IV-1 a cerca de 0,05 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1. Em certas modalidades, o auxiliar de filtração será adicionado a uma concentração final de cerca de 0,01 Kg/Kg de

precipitado da Fração I-IV-1, ou cerca de 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, ou 1,0 kg/kg de precipitado da Fração I-IV-1.

[00165] A fim de minimizar a perda de imunoglobulinas durante a filtração, o filtro formado deve ser lavado com pelo menos um volume morto, de preferência, pelo menos, dois volumes mortos, mais preferencialmente, pelo menos três volumes mortos, de tampão de suspensão ou um tampão semelhante ao mesmo, o qual não é suficiente para solubilizar as proteínas não imunoglobulinas presentes no bolo de filtração. Numa modalidade, o bolo de filtração e filtro são lavados de pós com pelo menos 3,0 volumes mortos de tampão. Numa outra modalidade, o bolo de filtração e filtro são pós lavados com, pelo menos, 3,6 volumes mortos de tampão. Numa outra modalidade, o bolo de filtração e filtro são pós lavados com, pelo menos, 50% do volume de suspensão foi filtrada, utilizando um tampão adequado. Numa outra modalidade, o bolo de filtração e filtro são pós lavados com, pelo menos, 75% do volume de suspensão foi filtrada, utilizando um tampão adequado. Numa outra modalidade, o bolo de filtração e filtro são pós lavados com, pelo menos, 100% do volume de suspensão foi filtrada, utilizando um tampão adequado. Normalmente, não mais do que 200% do volume de suspensão filtrada deve ser usado para lavar o filtro e filtro.

[00166] Numa modalidade específica, o tampão de lavagem é o tampão de dissolução que contém de 90 a 150 mL de ácido acético glacial por 1000 L. Em uma modalidade, o pH do tampão de extração de pós-lavagem se situa entre cerca de 4,6 e cerca de 5,3. Numa modalidade preferida, o pH do tampão de lavagem pós-se entre cerca de 4,7 e cerca de 5,2. Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de lavagem pós-se entre cerca de 4,8 e cerca de 5,1. Em ainda outra modalidade preferida, o pH do tampão de lavagem pós-se entre cerca de 4,9 e cerca de 5,0.

#### **4. Tratamento Detergente**

[00167] Para remover os contaminantes adicionais a partir da fração I-IV-1 filtrado, a amostra é em seguida submetida a um tratamento com detergente. Os métodos para o tratamento de detergente de frações de plasma derivadas são bem conhecidos na técnica. Geralmente, qualquer padrão de tratamento de detergente não-iônico pode ser utilizado em conjunto com os métodos aqui fornecidos. Por exemplo, um protocolo exemplar para um tratamento com detergente é fornecido abaixo.

[00168] Polisorbato-80 é adicionada a Fração I-IV-1 filtrado, a uma concentração final de cerca de 0,2% (p/v) com agitação, e a amostra é incubada durante pelo menos 30 minutos a uma temperatura entre cerca de 2 e 8°C. Citrato de sódio di-hidratado é então misturado na solução a uma concentração final de cerca de 8 g/L e a amostra é incubada durante um período adicional de 30 minutos, com o contínuo de agitação a uma temperatura entre cerca de 2 e 8°C.

[00169] Em certas modalidades, qualquer detergente não iônico adequado pode ser utilizado. Exemplos de detergentes não-iônicos adequados incluem, sem limitação, octilglucósido, Digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (ou seja, polissorbato-20), Tween-80 (ou seja, o polisorbato-80), um poli-alquilo (óxido de etileno), um detergente Brij, um alquilfenol de poli (óxido de etileno), um poloxâmico, octilglucósido, maltosido decil, e semelhantes.

[00170] Numa modalidade, uma melhoria no processo é realizada através da adição dos reagentes detergentes (por exemplo, polissorbato 80 e citrato de sódio di-hidratado) por adição difusa. A adição destes reagentes difusa minimiza as flutuações locais da concentração do álcool e do pH, em comparação com adição a um ponto de entrada único. Numa modalidade, a adição difusa compreende a pulverização, em vez disso fluente. Numa outra modalidade, a adição difusa compreende a adição de um reagente a partir de múltiplas portas. Numa modalidade, a adição difusa compreende a adição de

um reagente a partir de uma porta de difusor. Em certas modalidades, pelo menos, uma porta utilizada para introduzir um reagente para o sistema está localizada em ou perto de um impulsor, ou outro elemento dispersivo. Em outras modalidades, os reagentes de detergente podem ser adicionados como sólidos à Fração II + III de modificação filtrado enquanto a amostra está a ser misturada para assegurar a distribuição rápida dos aditivos. Em certos enquadramentos, é preferível adicionar os reagentes sólidos por aspersão dos sólidos através de uma área de superfície deslocalizada do filtrado tal que sobreconcentração local não ocorrer, tal como na adição fluente.

### **5. Segundo Evento de Precipitação - Precipitação G**

[00171] A fim de remover as impurezas residuais, uma segunda precipitação é realizada a um pH de 6,5 a 7,5 utilizando 25% de álcool. Resumidamente, a fração I-IV-1 de extração é ajustada para um pH de 6,5 a 7,5, preferencialmente 6,8-7,2, mais preferencialmente 6,9-7,1, mais preferencialmente 7,0, com uma solução de modificador de pH adequado (por exemplo, hidróxido de sódio ou ácido acético). Álcool frio é então adicionado à solução para uma concentração final de cerca de 25% (v/v) e a mistura é incubada com agitação a entre cerca de -6°C a cerca de -10°C durante pelo menos 1 hora para formar uma segunda precipitar (ou seja, precipitar G). Em uma modalidade, a mistura é incubada por pelo menos 2 horas, ou, pelo menos, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou mais horas. Numa modalidade preferida, a mistura é incubada durante, pelo menos, 2 horas. Numa modalidade mais preferida, a mistura é incubada durante, pelo menos, 4 horas. Numa modalidade ainda mais preferida, a mistura é incubada durante, pelo menos, 8 horas.

[00172] Em certas modalidades, uma percentagem mais elevada de IgG pode ser precipitado a partir da extração I-IV-1, ajustando o pH da solução, durante e/ou após a adição de álcool para a reação de precipitação. Da mesma forma, devido às flutuações no pH da solução durante o processo de

precipitação, o pH da mistura de reação pode ser monitorado e/ou ajustado ao longo da totalidade do período de incubação. Numa outra modalidade, a melhoria no rendimento de IgG é obtida pela adição do álcool a precipitação e/ou a solução usada para ajustar o pH da mistura por adição difusa do agente de modificação do álcool ou de pH. A adição destes reagentes difusa minimiza as flutuações locais da concentração do álcool e do pH, em comparação com adição a um ponto de entrada único. Numa modalidade, a adição difusa compreende a pulverização, em vez disso fluente. Numa outra modalidade, a adição difusa compreende a adição de um reagente a partir de múltiplas portas. Numa modalidade, a adição difusa compreende a adição de um reagente a partir de uma porta de difusor. Em certas modalidades, pelo menos, uma porta utilizada para introduzir um reagente para o sistema está localizada em ou perto de um impulsor, ou outro elemento dispersivo.

## **6. Suspensão e Filtração de precipitado G (PPT G)**

[00173] A fim de solubilizar o teor de IgG do precipitado G, um tampão de extração a frio é utilizado para re-suspender a PptG. Em resumo, o G precipitado é dissolvido numa proporção de 1 parte de precipitado a 2-5 partes de água para injeção (WFI), ou tampão de baixa condutividade. Numa modalidade preferida, o precipitado é dissolvido G numa proporção de 1 parte de precipitado 1-15 partes, de preferência 3,5 partes, WFI. A etapa de suspensão é tipicamente realizada a uma temperatura entre 0°C e 8°C para se obter um valor AU<sub>280-320</sub> de 40 a 95 O pH final da solução, a qual é agitada durante pelo menos 2 horas, em seguida, é ajustada para 4,5-5,6, de preferência para 5,2 ± 0,2. Numa modalidade, este ajustamento do pH é realizado com ácido acético. Para aumentar a solubilidade de IgG, a condutividade da suspensão é aumentada para entre 2,5 e 6,0 mS/cm. Numa modalidade, a condutibilidade é aumentada pela adição de cloreto de sódio.

[00174] Soluções adequadas para a extração de precipitado G incluem WFI e buffers de baixa condutividade. Numa modalidade, um tampão de



baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 10 mS/cm. Em outras modalidades, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade inferior a cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 mS/cm. Numa modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 6 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 4 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 2 mS/cm.

[00175] A solução suspensa PptG é então filtrada com um filtro de profundidade apropriada tendo um tamanho nominal de poro de entre 0,1 µm e 0,4 µm, a fim de remover quaisquer partículas não dissolvidas. Numa modalidade, o tamanho nominal de poro do filtro de profundidade é de cerca de 0,2 µm (por exemplo, o filtro Cuno VR06 ou equivalente). Numa outra modalidade, a solução é centrifugada suspenso PptG para recuperar um sobrenadante clarificado. O filtro é lavado com WFI ou um tampão adequado, após filtração para se recuperar IgG adicional e o pós-lavagem adicionado ao filtrado. Numa modalidade preferida, o pós-lavagem do filtro é realizada utilizando uma solução de cloreto de sódio com uma condutividade de entre cerca de 2,5 e cerca de 6,0 mS/cm.

## **7. Tratamento com solvente e detergente (S/D)**

[00176] A fim de inativar vários contaminantes virais presentes em produtos derivados do plasma, o filtrado é clarificado PptG próxima submetido a um detergente solvente (S/D) de tratamento. Os métodos para o tratamento de detergente de frações de plasma derivadas são bem conhecidos na especialidade (para uma revisão ver, Pelletier JP et al, Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42). Geralmente, qualquer padrão de tratamento S/D pode ser utilizado em conjunto com os métodos aqui fornecidos. Por exemplo, um protocolo exemplar para um tratamento S/D é fornecida abaixo.

[00177] Triton X-100, Tween-20, e tri (n-butil) fosfato (TNBP) são adicionados ao filtrado PptG clarificada em concentrações finais de cerca de 1,0%, 0,3% e 0,3%, respectivamente. A mistura é então agitada a uma temperatura entre 18°C e 25°C durante pelo menos uma hora.

[00178] Numa modalidade, os reagentes de S/D (por exemplo, Triton X-100, Tween 20, TNBP e) são adicionados por adição difusa. Numa modalidade específica, os reagentes S/D são adicionados por pulverização em vez de através da adição fluente. Numa outra modalidade, os reagentes de detergente são adicionados como sólidos à filtrado PptG clarificada, a qual está a ser misturada para assegurar a distribuição rápida dos componentes do S/D. Em certos enquadramentos, é preferível adicionar os reagentes sólidos por aspersão dos sólidos através de uma área de superfície deslocalizada do filtrado tal que sobreconcentração local não ocorrer, tal como na adição fluente.

## **8. Cromatografia de Troca Iônica**

[00179] A fim de purificar adicionalmente e concentrar IgG, de permuta catiônica e/ou cromatografia de troca aniônica pode ser empregue. Os métodos para a purificação e concentração de IgG utilizando cromatografia de permuta iônica são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, a patente US No. 5.886.154 descreve um método no qual uma Fração II + III precipitado é extraído a um pH baixo (entre cerca de 3,8 e 4,5), seguindo-se a precipitação da IgG usando ácido caprílico, e finalmente aplicação de dois estágios de cromatografia de troca de ânions. A Patente US N° 6.069.236 descreve um esquema de purificação cromatográfica de IgG, que não dependem de precipitação de álcool. Publicação PCT N° WO 2005/073252 descreve um método de purificação que envolve a extração de IgG de um Fração II + III de precipitado, o tratamento com ácido caprílico, tratamento com PEG, e um único estágio de cromatografia de troca aniônica. A Patente US N° 7.186.410 descreve um método de purificação que envolve a

extração de IgG de um Fração I + II + III ou fração II precipitado seguido por um único estágio de permuta aniônica realizada a um pH alcalino. A Patente US No. 7.553.938 descreve um método que envolve a extração de uma fração I + II + III ou fração II + III de precipitado, o tratamento caprilato, e um ou dois estágios de cromatografia de troca aniônica. A Patente US N° 6.093.324 descreve um método de purificação que compreende a utilização de uma resina de troca aniônica macroporosa operada a um pH entre cerca de 6,0 e cerca de 6,6. A Patente US N° 6.835.379 descreve um método de purificação que se baseia em cromatografia de permuta catiônica na ausência de álcool fracionamento. As descrições das publicações anteriores são aqui incorporadas por referência na sua totalidade para todos os fins

[00180] Numa modalidade, a S/D tratada PptG filtrado pode ser submetida a cromatografia de permuta catiônica tanto e cromatografia de permuta aniônica. Por exemplo, numa modalidade, a S/D tratada PptG filtrado é contatado por uma resina de permuta catiônica sob condições adequadas para a IgG liga-se à resina. Os reagentes S/D pode então ser lavado para longe da IgG adsorvido, a qual é subsequentemente eluída da resina com um tampão de eluição adequado. Desta forma, o estágio de cromatografia de permuta de cátions pode ser utilizado para remover os reagentes de S/D a partir da preparação, concentrar a solução contendo IgG, e/ou remoção de impurezas a partir da composição.

[00181] Numa modalidade, a IgG é eluída a partir da resina de permuta catiônica utilizando um tampão de eluição com um pH entre cerca de 8,0 e 9,0. Em certas modalidades, o tampão de eluição de pH pode ter um pH entre cerca de 8,2 e cerca de 8,8, ou entre cerca de 8,4 e cerca de 8,6, ou um pH de cerca de 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, ou 9,0. Numa modalidade preferida, o pH do tampão de eluição é de cerca de  $8,5 \pm 0,1$ .

[00182] Da mesma forma, a cromatografia de troca aniônica pode ser usada para reduzir as impurezas na composição de IgG. Numa modalidade, a

cromatografia de permuta de ânions é realizada em condições de solução, em que uma ou mais impurezas se ligam à resina de permuta aniônica, mas IgG não. Numa modalidade específica, a cromatografia de permuta de ânions é realizada em condições ligeiramente ácidas, isto é, a um pH entre 5,0 e 7,0, de preferência entre 5,5 e 6,5, a uma força iônica baixa adequada para a ligação de contaminantes, mas não IgG para a resina de troca aniônica.

[00183] Numa modalidade específica, o eluato da coluna de permuta catiônica pode ser ajustado para um pH mais baixo, por exemplo, entre cerca de 5,5 e cerca de 6,5, e dilui-se com um tampão apropriado de tal modo que a condutividade da solução é reduzida. Em certas modalidades, o pH do eluato de permuta catiônica pode ser ajustado para um pH entre cerca de 5,7 e cerca de 6,7, ou entre cerca de 5,9 e cerca de 6,5, ou um pH de cerca de 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, ou 6,7. Numa modalidade preferida, o pH do produto de eluição é ajustado até um pH de cerca de  $6,4 \pm 0,1$ . O eluato é em seguida carregado numa coluna de troca aniônica, a qual se liga a vários contaminantes encontrados na preparação. O fluxo através da coluna, que contém a fração de IgG, é recolhido durante o carregamento da coluna e a lavagem. Em certas modalidades, as taxas de estágios cromatográficos de íons da presente invenção podem ser realizadas em modo de coluna, o modo de lote, ou por uma combinação dos dois. Numa modalidade, a solução utilizada para ajustar o pH da composição de IgG antes da cromatografia de permuta de ânions é adicionada por adição difusa. Numa modalidade específica, a solução é adicionada por pulverização, em vez de através da adição fluente.

## **9. Nanofiltração**

[00184] A fim de reduzir a carga viral de uma composição de IgG aqui proporcionada, a composição pode ser nanofiltrado usando um dispositivo de nanofiltração adequado. Em certas modalidades, o dispositivo de nanofiltração terão uma dimensão média de poro entre cerca de 15 nm e cerca

de 200 nm. Exemplos de nanofiltros adequados para este uso incluem, sem limitação, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, 75N e (Planova). Numa modalidade específica, o nanofiltro pode ter um tamanho de poro médio de entre cerca de 15 nm e cerca de 72 nm, ou entre cerca de 19 nm e cerca de 35 nm, ou de cerca de 15 nm, 19 nm, 35 nm, ou 72 nm. Numa modalidade preferida, o nanofiltro terão um tamanho médio de poro de cerca de 35 nm, tal como um filtro Planova 35N de Asahi ou seu equivalente. Numa modalidade particular, a composição de IgG recuperada a partir da etapa de permuta de ânions é nanofiltrado usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro entre 30 nm e 40 nm, de preferência de  $35 \pm 2$  nm. Numa outra modalidade preferida, o nanofiltro terão um tamanho médio de poro de cerca de 19 ou 20 nm, tal como um filtro Planova 20N de Asahi ( $19 \pm 2$  nm) ou um seu equivalente. Numa modalidade particular, a composição de IgG recuperada a partir da etapa de permuta de ânions é nanofiltrado usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro entre os 15 nm e 25 nm, de preferência de  $19 \pm 2$  nm.

#### **10. Ultra/Diafiltração (UF/DF)**

[00185] A ultrafiltração/diafiltração pode ser realizada para concentrar a composição de IgG em qualquer etapa durante o processo de purificação. Numa modalidade, o nanofiltrado é concentrado por UF/DF. Numa modalidade, o nanofiltrado pode ser concentrado por ultrafiltração até uma concentração de proteína de entre cerca de 2% e cerca de 10% (p/v). Em certas modalidades, a ultrafiltração é levada a cabo em uma tela de canal aberto e a membrana de ultrafiltração tem um peso molecular nominal de corte (NMWCO) de menos do que cerca de 100 kDa, ou inferior a cerca de 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, ou menos kDa. Numa modalidade preferida, a membrana de ultrafiltração tem um NMWCO de não mais do que 50 kDa.

[00186] Numa modalidade, uma membrana de canal aberto é usada com um especificamente concebido de pós-lavagem e formulação perto do

fim do processo de produção, para tornar as composições de IgG resultantes cerca de duas vezes mais elevada na concentração de proteína (200 mg/ml) em comparação com o estado da técnica IVIGs (por exemplo, GAMMAGARD® LIQUID, 10% IgG) sem afetar a estabilidade de produção e armazenamento. Com a maior parte da ultrafiltração comerciais disponíveis membranas de uma concentração de 200 mg/mL de IgG não pode ser alcançado sem grandes perdas de proteína. Estas membranas são bloqueadas cedo e, portanto, adequado de pós-lavagem é difícil de conseguir. Portanto, as configurações de canal aberto de membrana têm que ser utilizadas. Mesmo com membranas de canal aberto, um procedimento de pós-lavagem especificamente concebido tem que ser usada para obter a concentração necessária, sem perda significativa da proteína (perda inferior a 2%). Ainda mais surpreendente é o facto de que a maior concentração de proteína de 200 mg/mL não reduz a capacidade de inativação de vírus de uma etapa de armazenamento de baixo pH.

[00187] Após a conclusão do estágio de ultrafiltração, o concentrado pode ser ainda mais concentrado por meio de diafiltração contra uma solução adequada para a administração intravenosa ou intramuscular. Em certas modalidades, a solução de diafiltração pode compreender um agente de estabilização e/ou de tamponamento. Numa modalidade preferida, o agente de estabilização e de tamponamento é glicina, numa concentração apropriada, por exemplo, entre cerca de 0,20 M e cerca de 0,30 M ou entre cerca de 0,22 M e cerca de 0,28 M ou entre cerca de 0,24 M e cerca de 0,26 M, ou pelo uma concentração de  $0,20 \pm 0,01$  M,  $0,21 \pm 0,01$  M,  $0,22 \pm 0,01$  M,  $0,23 \pm 0,01$  M,  $0,24 \pm 0,01$  M,  $0,25 \pm 0,01$  M,  $0,26 \pm 0,01$  M,  $0,27 \pm 0,01$  M,  $0,28 \pm 0,01$  M,  $0,29 \pm 0,01$  M, ou  $0,3 \pm 0,01$  M. Numa modalidade preferida, o tampão de diafiltração contém  $0,25 \pm 0,01$  M de glicina.

[00188] Normalmente, o volume mínimo para troca diafiltrado é pelo menos cerca de três vezes o volume de concentrado de origem ou, pelo

menos, cerca de 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou mais vezes o volume concentrado original. A solução de IgG pode ser concentrada até uma concentração final de proteína compreendida entre cerca de 5% e cerca de 25% (p/v), ou entre cerca de 6% e cerca de 18% (p/v), ou entre cerca de 7% e cerca de 16% (p/v), ou entre cerca de 8% e cerca de 14% (p/v), ou entre cerca de 9% e cerca de 12%, ou a uma concentração final de cerca de 5% ou 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% ou mais elevada. Numa modalidade, uma concentração final de proteína de pelo menos cerca de 23% é alcançada sem a adição da fração de pós-lavagem para a solução concentrada. Numa outra modalidade, uma concentração final de proteína de pelo menos cerca de 24% é alcançada sem a adição da fração de pós-lavagem para a solução concentrada. Numa outra modalidade, uma concentração final de proteína de pelo menos cerca de 24% é alcançada sem a adição da fração de pós-lavagem para a solução concentrada. Numa modalidade, o pH da solução será 4,6-5,1 após diafiltração.

[00189] Numa modalidade exemplar, o pH da composição de IgG é ajustada para cerca de 4,5 antes da ultrafiltração. A solução é concentrada até uma concentração de proteína de  $5 \pm 2\%$  p/v por meio de ultrafiltração. A membrana de UF tem um peso molecular nominal de corte (NMWCO) de 50.000 Daltons ou menos (por exemplo, Millipore Pellicon Poliéter sulfona de membrana). O concentrado é então diafiltrado contra dez volumes de solução de 0,25 M de glicina, pH  $4,5 \pm 0,2$ . Durante toda a operação de ultra-diafiltração a solução é mantida a uma temperatura de entre cerca de 2°C a cerca de 8°C. Após diafiltração, a solução é concentrada até uma concentração de proteína de pelo menos 11% (p/v).

## **11. Formulação**

[00190] Após a conclusão do estágio de diafiltração, a concentração de proteína da solução é ajustado com o tampão de diafiltração até uma concentração final de entre cerca de 5% e cerca de 20% (p/v), ou entre cerca

de 6% e cerca de 18% (p/v), ou entre cerca de 7% e cerca de 16% (p/v), ou entre cerca de 8% e cerca de 14% (p/v), ou entre cerca de 9% e cerca de 12%, ou a uma concentração final de cerca de 5% ou 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, ou 25%. Numa modalidade, a concentração final de proteína da solução está entre cerca de 9% e cerca de 11%, mais preferivelmente cerca de 10%.

[00191] A solução a granel é ainda formulada esterilizada por filtração através de um filtro de membrana com um tamanho absoluto de poro de não mais do que cerca de 0,22 micrón, por exemplo, cerca de 0,2 micrón. Em seguida, a solução é assepticamente dispensada em recipientes finais para o fecho, com amostras colhidas para análise.

[00192] Numa modalidade, a composição de IgG é ainda ajustado para uma concentração de  $10,2 \pm 0,2\%$  (p/v) com tampão de diafiltração. Numa outra modalidade, a composição de IgG é ajustada para uma concentração de  $15 \pm 1\%$  (p/v). Numa outra modalidade, a composição de IgG é ajustada para uma concentração de  $20 \pm 1\%$  (p/v). Numa outra modalidade, a composição de IgG é ajustada para uma concentração de  $25 \pm 1\%$  (p/v). O pH é ajustado para cerca de 4,4 a cerca de 4,9, se necessário. Finalmente, a solução é esterilizada por filtração e incubadas durante três semanas, ou cerca de 30°C.

#### **D. Imunoglobulina G (IgG)**

[00193] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para a preparação de um G (IgG) de imunoglobulina composição enriquecida a partir de um conjunto de Cohn, o método compreendendo os estágios de: co-precipitação de IgG e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn, num primeiro estágio de precipitação, de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; e recuperar a fração solúvel da primeira suspensão contendo IgG, formando assim uma composição de IgG enriquecido. Em geral, entende-se



qualquer substância química para a precipitação de imunoglobulinas e A1PI pode ser utilizado, incluindo, mas não limitadas a, precipitação com álcool (por exemplo, utilizando-se etanol ou metanol), precipitação utilizando polímeros solúveis em água (por exemplo, PEG ou dextrana), e para as trocas salinas (por exemplo, utilizando fosfato de amônio, sulfato de amônio, citrato de sódio, etc). Numa modalidade preferida, a precipitação é precipitação com álcool, precipitação, de preferência etanol.

[00194] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de um G (IgG) de imunoglobulina composição enriquecida por precipitação de IgG a partir do crio-sobrenadante em um pH baixo, de alta álcool etapa de precipitação. Numa modalidade específica, o método compreende os estágios de: a precipitação de IgG a partir de crio-sobrenadante um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol ao crio-sobrenadante para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0 a 6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperação de IgG a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida.

[00195] Numa modalidade, o método compreende os estágios de: a precipitação de IgG a partir de crio-sobrenadante um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol ao crio-sobrenadante para uma concentração final de pH e selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7 para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperação de IgG a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição

enriquecida em IgG. Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida.

[00196] Numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol com o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% (v/v) a um pH entre 5,0 e 6,0. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de 25% (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de 5,5. Em ainda outras modalidades, a concentração final de etanol e o pH do primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00197] Os métodos aqui previstos proporcionam rendimentos significativamente mais elevados de recuperação de IgG no produto final enriquecido devido à precipitação de uma parte do conteúdo do conjunto de imunoglobulina a partir de Cohn inicial na reação de precipitação, em comparação com o estado da técnica dos processos de purificação que se baseiam nos estágios iniciais de baixo teor alcoólico de precipitação (ou seja, Fração I precipitação).

[00198] Deste modo, numa modalidade dos métodos aqui previstos, pelo menos, 90% do teor de IgG do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 95% do teor de IgG do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 99% do teor de IgG do conjunto a partir de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de IgG a partir do conjunto de Cohn é precipitado a reação de precipitação inicial.

[00199] Tal como mostrado nos exemplos aqui previstos, a utilização de um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool (isto é, fração I-IV-1) resulta na precipitação a precipitação de pelo menos 99% do teor de IgG do conjunto a partir de Cohn. Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% do teor de IgG a partir de um conjunto de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperação de IgG a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição de imunoglobulina enriquecida. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00200] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para

a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; e recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação.

[00201] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; e recuperar a fração solúvel da primeira suspensão, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição

enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00202] A fim de proporcionar composições de IgG de grau farmacêutico, os contaminantes tais como A1PI e fibrinogênio presente no precipitado inicial necessidade de ser removido a partir da composição de imunoglobulina. Isto pode ser conseguido, por exemplo, por fracionamento do primeiro precipitado (por exemplo, por precipitação diferencial com álcool, polímeros hidrofílicos não-iônicos, ou salting-out), metodologias cromatográficas, ou metodologias de filtração.

[00203] Numa modalidade, o primeiro precipitado é suspenso em água para injeção (WFI) ou um tampão de força iônica baixa adequada para extrair o precipitado a partir de IgG, a suspensão é então tratada com dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ), e a porção solúvel da suspensão contendo IgG é separada da porção insolúvel da suspensão que contém a maior parte do A1PI e fibrinogênio.

[00204] Soluções adequadas para a extração do primeiro precipitado terão geralmente um pH entre 4,0 e 5,5. Em certas modalidades, a solução tenha um pH entre 4,5 e 5,0, em outras modalidades, a solução de extração, terá um pH de cerca de 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 ou 5,5. Numa modalidade preferida, o pH do tampão de extração

é de  $4,7 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,8 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,9 \pm 0,1$ . Em geral, estes requisitos podem ser satisfeitos de pH usando um agente tamponante selecionado a partir de, por exemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, suas misturas, e semelhantes. Concentrações de tampão adequados variam tipicamente entre 5 e 100 mM, ou de 10 a 50 mM, ou 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 mm de agente de tamponamento.

[00205] O tampão de extração terá de preferência uma condutividade de 0,5 mS/cm a 2,0 mS/cm. Por exemplo, em certas modalidades, a condutividade do tampão de extração vai ser de  $0,5 \pm 0,1$  mS/cm ou de  $0,6 \pm 0,1$ ,  $0,7 \pm 0,1$ ,  $0,8 \pm 0,1$ ,  $0,9 \pm 0,1$ ,  $1,0 \pm 0,1$ ,  $1,1 \pm 0,1$ ,  $1,2 \pm 0,1$ ,  $1,3 \pm 0,1$ ,  $1,4 \pm 0,1$ ,  $1,5 \pm 0,1$ ,  $1,6 \pm 0,1$ ,  $1,7 \pm 0,1$ ,  $1,8 \pm 0,1$ ,  $1,9 \pm 0,1$ , ou  $2,0 \pm 0,1$  mS/cm. Um versado na técnica saberá como gerar tampões de extração possuindo uma condutividade adequada. Em uma modalidade particular, o tampão de extração contém 5 mM de fosfato de sódio monobásico e acetato de 5 mM, a um pH de  $4,8 \pm 0,2$  e condutividade de 0,7-0,9 mS/cm.

[00206] Numa modalidade, a sílica é adicionada antes da separação (por exemplo, filtração ou centrifugação) a uma concentração de entre 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa outra modalidade, a sílica é adicionada a uma concentração de entre 30 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 80 g/kg Fração I-IV-1 precipitado. Em certas modalidades, a sílica pode ser adicionada a uma concentração de cerca de 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado, ou cerca de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa modalidade específica, a sílica (por exemplo, Aerosil 380 ou equivalente) é adicionado à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final de  $40 \pm 20$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final

de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. A mistura realiza-se a 2°C a 8°C durante pelo menos 50 a 70 minutos.

[00207] Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém IgG e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade, SiO<sub>2</sub> é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado.

[00208] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e

o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém IgG e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, e ainda em que a partir de 80% de 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG presente na porção solúvel da suspensão é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade específica, as partes solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado.



[00209]        Numa modalidade, a IgG recuperada a partir da porção solúvel da primeira suspensão é ainda enriquecida por fracionamento. Geralmente, pode ser usado qualquer método de fracionamento (por exemplo, o álcool ou a precipitação do polímero, as trocas salinas, etc). Numa modalidade preferida, a IgG é ainda enriquecida por fracionamento da porção solúvel da primeira suspensão, por precipitação com etanol. Numa modalidade, a IgG é enriquecida pela adição de etanol para a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final e pH adequado para precipitar o IgG, enquanto que, pelo menos, um contaminante não é precipitado. Numa outra modalidade, a IgG é enriquecida pela adição de etanol para a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final e pH adequado para precipitar pelo menos um contaminante, enquanto que a IgG não é precipitada.

[00210]        Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG a partir de um conjunto de Cohn, o método compreendendo os estágios de: co-precipitação de IgG e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn, numa primeira precipitação o estágio, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; remoção de A1PI a partir da suspensão; precipitando a IgG a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removido da primeira suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na

Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00211] Numa modalidade exemplar, o segundo estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol para a porção solúvel da segunda suspensão (por exemplo, um filtrado ou sobrenadante da suspensão formada após filtração ou centrifugação) a uma concentração final de entre 22% e 28% (v/v) a um pH entre 6,5 e 7,5. Numa modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é adicionado a uma concentração final de 25% (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de  $7,0 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o segundo estágio de precipitação é realizado a um pH de 7,0. Numa modalidade particular, o segundo estágio de precipitação é realizado utilizando uma concentração final de etanol de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ .

[00212] Em uma modalidade particular, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% do teor de IgG a partir de um conjunto de plasma de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da primeira suspensão de um segundo

estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00213] Numa modalidade específica, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% do teor de IgG a partir de um conjunto de plasma de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação por mistura de etanol à primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00214] Numa modalidade, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; remoção de A1PI a partir da suspensão; recuperar a fração solúvel da primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação.

[00215] Numa modalidade específica, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30 % a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; remoção de A1PI a partir da suspensão; recuperar a fração solúvel da primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da primeira

suspensão de um segundo estágio de precipitação por mistura de etanol à primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação.

[00216] Numa outra modalidade, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa

modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Numa outra modalidade, a albumina presente no primeiro sobrenadante é enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade preferida, entre 90% e 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante.

[00217] Numa outra modalidade, o método compreende os estágios de: precipitação a partir de 99% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; removendo a A1PI a partir da suspensão; recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$

(v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa modalidade, A1PI separada da primeira suspensão é enriquecido. Numa outra modalidade, a albumina presente no primeiro sobrenadante é enriquecida. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, entre 99% e 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade preferida, entre 90% e 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante.

[00218] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém IgG e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma

concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, a partir de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado.

[00219] Numa modalidade específica, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém IgG e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, recuperar a porção solúvel da primeira suspensão; precipitando a IgG a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado,



formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade preferida, a partir de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado.

[00220] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém IgG e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP; precipitando a IgG a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação, de modo a formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas

séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado.

[00221] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida em IgG, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de IgG e o conteúdo a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel

da suspensão contém IgG e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP; precipitando a IgG a partir da porção solúvel da primeira suspensão de um segundo estágio de precipitação com etanol por mistura com a porção solúvel da primeira suspensão com uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v) a um pH de  $7,0 \pm 0,3$ , para formar um segundo precipitado compreendendo IgG e um segundo sobrenadante que compreende pelo menos um contaminante; e recuperação de IgG a partir do segundo precipitado, em que a partir de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição enriquecida em IgG. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, a IgG recuperada a partir do segundo precipitado é ainda enriquecida. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de IgG do conjunto Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e pH utilizados no primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Na Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado.

[00222]        Numa modalidade, a IgG é recuperada a partir do segundo precipitado por suspensão do precipitado com um tampão de extração frio.

Por exemplo, o segundo precipitado é suspenso em uma proporção de 1 parte de precipitado a 2-5 partes de água para injeção (WFI), ou tampão de baixa condutividade. Numa modalidade preferida, o segundo precipitado suspenso em uma proporção de 1 parte para precipitar 4-5 partes, preferivelmente 3,5 partes, WFI. Numa modalidade, a etapa de suspensão é realizada a uma temperatura entre 0°C e 8°C. Numa modalidade, o valor final de pH da solução é ajustado para 4,8-5,6, de preferência para  $5,2 \pm 0,2$ . Numa modalidade, este ajustamento do pH é realizado com ácido acético. Numa modalidade, a condutividade da suspensão é aumentada para entre 2,5 e 6,0 mS/cm, para aumentar a solubilidade de IgG. Numa modalidade, a condutibilidade é aumentada pela adição de cloreto de sódio.

[00223] Soluções adequadas para a extração do segundo precipitado incluir WFI e buffers de baixa condutividade. Numa modalidade, um tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 10 mS/cm. Em outras modalidades, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade inferior a cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 mS/cm. Numa modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 6 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 4 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 2 mS/cm.

[00224] Numa modalidade, a porção solúvel da primeira suspensão, contendo IgG, é separada da porção insolúvel. Numa modalidade, isto é feito pela filtração da suspensão com um filtro de profundidade com um tamanho nominal de poro de 0,1  $\mu$ m e 0,4  $\mu$ m. Numa modalidade, o tamanho nominal de poro do filtro de profundidade é de 0,2  $\mu$ m (por exemplo, o filtro Cuno VR06 ou equivalente). Numa modalidade, o filtro é lavado com WFI ou um tampão adequado, após filtração para se recuperar IgG adicional e o pós-

lavagem adicionado ao filtrado. Numa modalidade preferida, o pós-lavagem do filtro é realizada utilizando uma solução de cloreto de sódio com uma condutividade de entre cerca de 2,5 e cerca de 6,0 mS/cm. Numa outra modalidade, a segunda suspensão é centrifugada para recuperar a porção solúvel.

[00225] Em um aspecto da presente invenção, os meios previstos para a preparação de uma composição de IgG enriquecido ainda compreender purificação pelo menos um fator adicional de sangue a partir do mesmo conjunto de Cohn. Numa modalidade, os métodos compreendem ainda, pelo menos, dois de purificação de proteínas sanguíneas adicionais a partir do mesmo conjunto de Cohn. Numa outra modalidade, os métodos compreendem ainda, pelo menos, três de purificação de proteínas de sangue adicionais do mesmo conjunto Cohn. Em ainda outras modalidades, os métodos de purificação ainda compreender pelo menos quatro, cinco, seis, ou mais proteínas sanguíneas adicionais a partir do mesmo conjunto de Cohn. Exemplos de proteínas do sangue, que pode ser co-purificada a partir do mesmo conjunto de Cohn como IgG incluem, sem limitação, a albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), o fator H, proteínas de inter-alfa-inibidor (IaIP), complexos de protrombina, o Fator VII (FVII), o Fator VIII (FVIII), de antitrombina III (AT III), fibrinogênio butirilcolinesterase, e outros.

[00226] Numa modalidade, a alfa-1-antitripsina (A1PI) é ainda purificada a partir do mesmo conjunto de Cohn como IgG. Numa modalidade específica, A1PI é purificado a partir da fração insolúvel da primeira suspensão.

[00227] Numa outra modalidade, o fibrinogênio é ainda purificado a partir do mesmo conjunto de Cohn como IgG. Numa modalidade específica, o fibrinogênio é purificado a partir da fração insolúvel da primeira suspensão. Noutra modalidade específica, tanto A1PI e fibrinogênio são purificadas a partir da fração insolúvel da primeira suspensão.

[00228] Numa outra modalidade, o Fator H é ainda purificada a partir do mesmo conjunto de Cohn como IgG. Numa modalidade específica, o fator H é purificado a partir da fração insolúvel da primeira suspensão. Noutra modalidade específica, tanto A1PI e Fator H são purificadas a partir da fração insolúvel da primeira suspensão

[00229] Noutra modalidade, as proteínas inter-alfa-inibidor (IaIP) são ainda purificados a partir do mesmo conjunto de Cohn como IgG. Numa modalidade específica, IaIP é purificado a partir da fração insolúvel da primeira suspensão. Noutra modalidade específica, tanto A1PI e IaIP são purificadas a partir da fração insolúvel da primeira suspensão.

[00230] Numa outra modalidade, a albumina é ainda purificada a partir do mesmo conjunto de Cohn como IgG. Numa modalidade específica, a albumina é purificada a partir do primeiro sobrenadante formado. Numa modalidade específica, a albumina é purificada a partir do primeiro sobrenadante formado, enquanto pelo menos um fator adicional de sangue é purificado a partir da porção insolúvel da primeira suspensão formada.

[00231] Numa modalidade, as imunoglobulinas recuperadas a partir de um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool são enriquecidas por um fracionamento a jusante de acordo com Kistler-Nitschmann ou Deutsch et al. Por exemplo, uma composição de imunoglobulina recuperado pode ser submetido a um estágio semelhante a uma precipitação Kistler-Nitschmann B ou Deutsch et al.  $\beta$ -globulina precipitação. As condições utilizadas nestes estágios resultar na precipitação de  $\alpha$ - e  $\beta$ -globulina, imunoglobulina G, enquanto permanece no sobrenadante.

[00232] Por conseguinte, num aspecto, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição G (IgG) de imunoglobulina enriquecida que compreende os estágios de (i) a co-precipitação de imunoglobulinas e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn em um baixo pH inicial, precipitação elevada de álcool; (ii) recuperar as

imunoglobulinas a partir do precipitado; (iii) pelo menos um precipitante não-globulina gama de proteínas a partir da composição de imunoglobulina recuperado a partir do primeiro precipitado; e (iv) recuperar o sobrenadante do segundo estágio de precipitação. Em certas modalidades, estes métodos podem compreender ainda o estágio adicional de precipitação (por exemplo, uma precipitação de precipitados G), um estágio de ânions e/ou de troca catiônica, um ou mais estágios de ultrafiltração/diafiltração, e um ou estágios de redução ou inativação mais virais (por exemplo, tratamento S/D, a nanofiltração, a incubação a pH baixo, etc).

## **V. Preparação de Composições alfa-1-antitripsina (A1PI)**

[00233] Os métodos modernos de fabricação de proteínas de sangue de plasma doados são derivados do trabalho mais cedo feito na década de 1940 e 1950. Uma vez que este trabalho foi focado principalmente na purificação de albumina e gama imunoglobulinas (IgG) os esquemas de fracionamento desenvolvidos não foram otimizados para a recuperação de proteínas do sangue adicionais, que estão se tornando cada vez mais importante terapeuticamente. Por exemplo, o uso de um pH inicial elevado, baixa precipitação com álcool de plasma (por exemplo, precipitação Fração I) resulta na perda parcial do Fator H, IaIP, e para algumas imunoglobulinas medida na Fração I precipitar. Além disso, a separação de imunoglobulinas e A1PI obtidos por subsequentes estágios de precipitação (por exemplo, Fração II + III, de precipitação ou de precipitação A) é incompleta, com imunoglobulinas perdido no sobrenadante devido a precipitação incompleta e A1PI perdido no precipitado devido à precipitação parcial. Assim, são necessários métodos de fracionamento atualizados que oferecem rendimentos mais elevados de várias proteínas do sangue.

[00234] A presente invenção prevê métodos que satisfazem estes requisitos, através da utilização de um estágio de precipitação inicial que fraciona imunoglobulinas, A1PI e outras proteínas do sangue em um

precipitado inicial e albumina num sobrenadante inicial. Numa modalidade preferida, esta precipitação inicial é realizada sob pH baixo, as condições de elevado álcool.

[00235] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para a fabricação de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de bancos de plasma usando um estágio inicial que precipita a maior parte da imunoglobulina e o teor de um conjunto A1PI Cohn. Numa modalidade particular, este estágio inicial é um pH baixo, de alta álcool etapa de precipitação. Tal como mostrado nos exemplos aqui previstos, maior do que 95% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado sob estas condições. Além disso, a presente invenção fornece métodos para a separação eficiente e imunoglobulinas A1PI nesta precipitação inicial.

[00236] Em um aspecto, a presente invenção prevê um método para a preparação de um alfa-1-antitripsina enriquecido (A1PI) a partir de uma composição de conjunto de Cohn, o método compreendendo os estágios de: co-precipitantes imunoglobulinas e A1PI de um conjunto de Cohn, numa primeira precipitação o estágio, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; solubilização de imunoglobulinas presentes no primeiro precipitado, para formar uma primeira suspensão que tem uma porção solúvel que compreende imunoglobulinas e uma porção insolúvel compreendendo A1PI; que separa as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão; e recuperação a partir de A1PI a porção insolúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Em geral, entende-se qualquer substância química para a precipitação de imunoglobulinas e A1PI pode ser utilizado, incluindo, mas não limitadas a, precipitação com álcool (por exemplo, utilizando-se etanol ou metanol), precipitação utilizando polímeros solúveis em água (por exemplo, PEG ou dextrana), e para as trocas salinas (por exemplo, utilizando fosfato de amônio, sulfato de amônio, citrato de sódio, etc). Numa modalidade preferida, a



precipitação é precipitação com álcool, precipitação, de preferência etanol.

[00237] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição enriquecida de A1PI pela precipitação de A1PI a partir do crio-sobrenadante em um pH baixo, de alta álcool etapa de precipitação. Numa modalidade específica, o método compreende os estágios de: precipitar A1PI a partir de crio-sobrenadante um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol ao crio-sobrenadante para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0 a 6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperando A1PI a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, A1PI recuperado a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecido.

[00238] Numa modalidade, o método compreende os estágios de: A1PI precipitado a partir de um conjunto de Cohn em um primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de pH e selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7 para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperando A1PI a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Numa modalidade, A1PI recuperado a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecido.

[00239] Numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado por mistura de etanol com o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 22% e 28% (v/v) a um pH entre 5,0 e 6,0. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de

Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 2\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 1\%$  (v/v). Numa outra modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25\%$  (v/v). Do mesmo modo, numa modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,5$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de  $5,5 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade, o primeiro estágio de precipitação é realizado a um pH de 5,5. Em ainda outras modalidades, a concentração final de etanol e o pH do primeiro estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00240] Os métodos aqui previstos proporcionam rendimentos significativamente mais elevados de recuperação A1PI no produto final enriquecido devido à precipitação de uma parte do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn inicial na reação de precipitação, em comparação com o estado da técnica dos processos de purificação que se baseiam nos estágios iniciais de baixo teor alcoólico de precipitação (ou seja, Fração I precipitação).

[00241] Deste modo, numa modalidade dos métodos aqui previstos, pelo menos, 80% do teor de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade preferida, pelo menos 90% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais preferida, pelo menos 95% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Numa modalidade mais

preferida, pelo menos 97% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação. Em certas modalidades, pelo menos, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou mais do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn é precipitado na reação inicial de precipitação.

[00242] Tal como mostrado nos exemplos aqui previstos, a utilização de um baixo pH inicial, estágio de precipitação elevado de álcool (isto é, fração I-IV-1) resulta na precipitação a precipitação de pelo menos 95% do teor de A1PI a partir do conjunto de Cohn. Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição A1PI enriquecido, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% do teor de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto de Cohn a uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; separando o primeiro precipitado do primeiro sobrenadante; e recuperando A1PI a partir do primeiro precipitado, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, A1PI recuperado a partir do primeiro precipitado é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00243] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição A1PI enriquecido, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de teor de imunoglobulina e a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um

primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; solubilização de imunoglobulinas presentes no primeiro precipitado, para formar uma primeira suspensão que tem uma porção solúvel que compreende imunoglobulinas e uma porção insolúvel compreendendo A1PI; que separa as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão; e recuperação a partir de A1PI a porção insolúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Numa modalidade, as imunoglobulinas recuperadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão são ainda mais enriquecidas. Numa outra modalidade, A1PI removido a partir da fração insolúvel da primeira suspensão é enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de imunoglobulina do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação.

[00244] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição A1PI enriquecido, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de teor de imunoglobulina e a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; solubilização de imunoglobulinas presentes no primeiro precipitado, para formar uma primeira suspensão que tem uma porção solúvel que compreende imunoglobulinas e uma porção insolúvel compreendendo A1PI; que separa as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão; e recuperação a partir de A1PI a porção insolúvel da primeira suspensão, em que de 80% a 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no sobrenadante da primeira, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Numa modalidade, o etanol é

misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, as imunoglobulinas recuperadas a partir da porção solúvel da primeira suspensão são ainda mais enriquecidas. Numa outra modalidade, A1PI removido a partir da porção insolúvel da primeira suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de imunoglobulina do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7.

[00245] Numa modalidade, o primeiro precipitado é suspenso em água para injeção (WFI) ou um tampão de força iônica baixa adequada para extrair o precipitado a partir de imunoglobulinas, a suspensão é então tratada com dióxido de silício finamente dividido ( $\text{SiO}_2$ ), e a porção solúvel da suspensão contendo as imunoglobulinas é separada da porção insolúvel da suspensão que contém a maior parte do teor de A1PI.

[00246] Soluções adequadas para a extração de imunoglobulinas a partir do primeiro precipitado terão geralmente um pH entre 4,0 e 5,5. Em certas modalidades, a solução tenha um pH entre 4,5 e 5,0, em outras modalidades, a solução de extração, terá um pH de cerca de 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 ou 5,5. Numa modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,7 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,8 \pm 0,1$ . Numa outra modalidade preferida, o pH do tampão de extração é de  $4,9 \pm 0,1$ . Em geral, estes requisitos podem ser satisfeitos de pH usando um agente tamponante selecionado a partir de, por exemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, suas misturas, e semelhantes. Concentrações de tampão adequados variam tipicamente entre 5 e 100 mM, ou de 10 a 50 mM, ou 5, 10,

15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ou 100 mm de agente de tamponamento.

[00247] O tampão de extração terá de preferência uma condutividade de 0,5 mS/cm a 2,0 mS/cm. Por exemplo, em certas modalidades, a condutividade do tampão de extração vai ser de  $0,5 \pm 0,1$  mS/cm ou de  $0,6 \pm 0,1$ ,  $0,7 \pm 0,1$ ,  $0,8 \pm 0,1$ ,  $0,9 \pm 0,1$ ,  $1,0 \pm 0,1$ ,  $1,1 \pm 0,1$ ,  $1,2 \pm 0,1$ ,  $1,3 \pm 0,1$ ,  $1,4 \pm 0,1$ ,  $1,5 \pm 0,1$ ,  $1,6 \pm 0,1$ ,  $1,7 \pm 0,1$ ,  $1,8 \pm 0,1$ ,  $1,9 \pm 0,1$ , ou  $2,0 \pm 0,1$  mS/cm. Um versado na técnica saberá como gerar tampões de extração possuindo uma condutividade adequada. Em uma modalidade particular, o tampão de extração contém 5 mM de fosfato de sódio monobásico e acetato de 5 mM, a um pH de  $4,8 \pm 0,2$  e condutividade de 0,7-0,9 mS/cm.

[00248] Numa modalidade, a sílica é adicionada antes da separação (por exemplo, filtração ou centrifugação) a uma concentração de entre 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa outra modalidade, a sílica é adicionada a uma concentração de entre 30 g/kg de fração I-IV-1 precipitado e 80 g/kg Fração I-IV-1 precipitado. Em certas modalidades, a sílica pode ser adicionada a uma concentração de cerca de 20 g/kg de fração I-IV-1 precipitado, ou cerca de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, ou 100 g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa modalidade específica, a sílica (por exemplo, Aerosil 380 ou equivalente) é adicionado à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final de  $40 \pm 20$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. Numa outra modalidade específica, a sílica é adicionada à fração I-IV-1 de suspensão para uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de fração I-IV-1 precipitado. A mistura realiza-se a 2°C a 8°C durante pelo menos 50 a 70 minutos.

[00249] Deste modo, numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição A1PI enriquecido, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de teor de imunoglobulina e a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro

estágio de precipitação pela adição de etanol para o conjunto Cohn para uma concentração final de entre 20% e 30% a um pH 5,0-6,0 de modo a formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI; e recuperação a partir de A1PI a porção insolúvel da primeira suspensão, formando assim uma composição A1PI enriquecido. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, as imunoglobulinas recuperadas a partir do primeiro precipitado são mais enriquecidas. Numa outra modalidade, A1PI removida a partir da suspensão é ainda enriquecido. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de imunoglobulina do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Numa modalidade específica, as porções solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de precipitado da fração I-IV-1.

[00250] Numa modalidade, a presente invenção prevê um método para a preparação de uma composição A1PI enriquecido, o método compreendendo os estágios de: precipitação a partir de 95% a 100% de teor de imunoglobulina e a partir de um conjunto de A1PI Cohn num primeiro estágio de precipitação pela adição de etanol para a Cohn conjunto para uma concentração final de entre 20% a 30% a um pH de 5,0-6,0, para formar um primeiro e um primeiro precipitado sobrenadante; suspendendo o primeiro

precipitado para formar uma primeira suspensão; tratar o primeiro suspensão com dióxido de silício finamente dividido; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão, em que a porção solúvel da suspensão contém imunoglobulinas e a porção insolúvel da suspensão contém A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP, e ainda em que a partir de 80% de 100% do teor de proteínas séricas o conjunto Cohn está presente no primeiro sobrenadante. Numa modalidade, o etanol é misturado com o conjunto de Cohn a uma concentração final de  $25 \pm 3\%$  (v/v). Numa modalidade, as imunoglobulinas presentes na porção solúvel da suspensão são ainda mais enriquecidas. Numa outra modalidade, presente A1PI na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o fibrinogênio presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, o Fator H presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Numa outra modalidade, IaIP presente na porção insolúvel da suspensão é ainda enriquecido. Em ainda outra modalidade, a albumina encontrada no primeiro sobrenadante é enriquecida. Numa modalidade preferida, de 99% a 100% do teor de imunoglobulina do conjunto de Cohn é precipitado no primeiro estágio de precipitação. Em certas modalidades, a concentração final de etanol e o pH utilizado no pH baixo, alto álcool estágio de precipitação é selecionado a partir de variações 1-2166, como listado na Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4, Tabela 5, Tabela 6, e Tabela 7. Numa modalidade específica, as partes solúveis e insolúveis da primeira suspensão são separados por filtração. Numa modalidade,  $\text{SiO}_2$  é adicionado a uma concentração final de  $40 \pm 10$  g/kg de precipitado da fração I-IV-1.

[00251] Numa modalidade, a porção solúvel da primeira suspensão, contendo IgG, é separada da porção insolúvel, contendo A1PI, filtrando a suspensão com um filtro de profundidade com um tamanho nominal de poro de 0,1 um e 0,4 um. Numa modalidade, o tamanho nominal de poro do filtro de profundidade é de 0,2 um (por exemplo, o filtro Cuno VR06 ou



equivalente). Numa modalidade, o filtro é lavado com WFI ou um tampão adequado, após filtração para se recuperar IgG adicional e o pós-lavagem adicionado ao filtrado. Numa outra modalidade, a primeira suspensão é centrifugada para separar as partes solúveis e insolúveis.

[00252] Numa modalidade, A1PI é recuperado a partir da porção insolúvel separada por suspensão a porção insolúvel em um tampão de extração de A1PI. Por exemplo, numa modalidade, a porção insolúvel é separada suspenso em uma proporção de 1 parte de material insolúvel para 2-15 partes de água para injeção (WFI), ou tampão de baixa condutividade, de modo a formar uma segunda suspensão. Numa outra modalidade, a porção insolúvel é separada suspenso em uma proporção de 1 parte de material insolúvel para 2-10 partes de água para injeção (WFI), ou tampão de baixa condutividade. Numa outra modalidade, a porção insolúvel é separada suspenso em uma proporção de 1 parte de material insolúvel para 3-7 partes de água para injeção (WFI), ou tampão de baixa condutividade. Em ainda outras modalidades, a porção insolúvel é separada suspenso em uma proporção de 1 parte de material insolúvel para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, ou mais partes de água para injeção (WFI) ou tampão baixa condutividade. Numa modalidade, a extração é agitada durante pelo menos 2 horas. Numa outra modalidade, a extração é agitada durante pelo menos 4 horas. Numa outra modalidade, a extração é agitada durante pelo menos 8 horas. Numa outra modalidade, a extração é agitada durante 6 a 12 horas. Numa modalidade, a extração é realizada a partir de 10°C a 25°C. Numa outra modalidade, a extração é realizada a  $17 \pm 5^\circ\text{C}$ . Numa outra modalidade, a extração é realizada a  $17 \pm 4^\circ\text{C}$ . Numa outra modalidade, a extração é realizada a  $17 \pm 3^\circ\text{C}$ . Numa outra modalidade, a extração é realizada a  $17^\circ\text{C} \pm 2$ . Numa outra modalidade, a extração é realizada a  $17^\circ\text{C} \pm 1$ . Numa modalidade, a porção solúvel contendo A1PI é separada da porção insolúvel por meio de filtração, por exemplo, filtração profunda. Numa outra

modalidade, a porção solúvel contendo A1PI é separada da porção insolúvel por centrifugação.

[00253] Soluções adequadas para a extração de A1PI incluem WFI e buffers de baixa condutividade. Numa modalidade, um tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 10 mS/cm. Em outras modalidades, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade inferior a cerca de 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 mS/cm. Numa modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 6 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 4 mS/cm. Numa outra modalidade preferida, o tampão de baixa condutividade tem uma condutividade de menos do que cerca de 2 mS/cm. Numa modalidade, o tampão de WFI ou condutividade baixa tem um pH entre 8,0 e 9,5. Em uma modalidade particular, o pH do tampão de extração A1PI é  $8,8 \pm 0,5$ . Numa modalidade específica, o pH do tampão de extração A1PI é  $8,8 \pm 0,4$ . Numa modalidade específica, o pH do tampão de extração A1PI é  $8,8 \pm 0,3$ . Numa modalidade específica, o pH do tampão de extração A1PI é  $8,8 \pm 0,2$ . Numa modalidade específica, o pH do tampão de extração A1PI é  $8,8 \pm 0,1$ . Em ainda outras modalidades, o pH do tampão de extração A1PI é  $8,0 \pm 0,2$ ,  $8,1 \pm 0,2$ ,  $8,2 \pm 0,2$ ,  $8,3 \pm 0,2$ ,  $8,4 \pm 0,2$ ,  $8,5 \pm 0,2$ ,  $8,6 \pm 0,2$ ,  $8,7 \pm 0,2$ ,  $8,8 \pm 0,2$ ,  $8,9 \pm 0,2$ ,  $9,0 \pm 0,2$ ,  $9,1 \pm 0,2$ ,  $9,2 \pm 0,2$ ,  $9,3 \pm 0,2$ ,  $9,4 \pm 0,2$ , ou de  $9,5 \pm 0,2$ .

[00254] Numa modalidade, a porção insolúvel separada da primeira suspensão é suspenso em WFI ou um tampão de força iônica baixa, o que não é adequado para a extração de A1PI para formar uma suspensão de intermediário, antes da extração utilizando um tampão de A1PI. Nesta modalidade, o método compreende a suspensão a porção insolúvel em WFI ou um tampão de força iônica baixa a um pH de não mais do que 7,0; que separa as porções solúveis e insolúveis da suspensão intermédia; e

recuperando A1PI na porção insolúvel da suspensão intermédia. Numa modalidade, a suspensão intermediária é formada por suspensão do material insolúvel em uma proporção de 1 parte de material insolúvel para 2-15 partes WFI ou tampão. Numa modalidade, o WFI ou tampão de baixa força iônica tem um pH de 4,5 a 6,5. Numa outra modalidade, o tampão de baixa força iônica tem um pH de  $5,5 \pm 0,4$ . Numa outra modalidade, o tampão de baixa força iônica tem um pH de  $5,5 \pm 0,3$ . Numa outra modalidade, o tampão de baixa força iônica tem um pH de  $5,5 \pm 0,2$ . Numa outra modalidade, o tampão de baixa força iônica tem um pH de  $5,5 \pm 0,1$ . Em ainda outras modalidades, o tampão de baixa força iônica tem um pH de  $4,5 \pm 0,2$ ,  $4,6 \pm 0,2$ ,  $4,7 \pm 0,2$ ,  $4,8 \pm 0,2$ ,  $4,9 \pm 0,2$ ,  $5,0 \pm 0,2$ ,  $5,1 \pm 0,2$ ,  $5,2 \pm 0,2$ ,  $5,3 \pm 0,2$ ,  $5,4 \pm 0,2$ ,  $5,5 \pm 0,2$ ,  $5,6 \pm 0,2$ ,  $5,7 \pm 0,2$ ,  $5,8 \pm 0,2$ ,  $5,9 \pm 0,2$ ,  $6,0 \pm 0,2$ ,  $6,1 \pm 0,2$ ,  $6,2 \pm 0,2$ ,  $6,3 \pm 0,2$ ,  $6,4 \pm 0,2$ , ou de  $6,5 \pm 0,2$ . Numa modalidade, a porção solúvel é separado da porção insolúvel contendo A1PI por filtração, por exemplo, filtração profunda. Numa outra modalidade, a porção solúvel é separado da porção insolúvel contendo A1PI por centrifugação.

[00255] Numa modalidade, A1PI extraído da porção insolúvel da primeira suspensão é enriquecido de acordo com métodos bem conhecidos na técnica, incluindo, sem limitação: cromatografia (por exemplo, cromatografia de permuta de ânions, cromatografia de troca catiônica, cromatografia de interação hidrofóbica (HIC), hidroxiapatita cromatografia (HAP), Proteína A cromatografia de afinidade, cromatografia de imunoafinidade, cromatografia de exclusão de tamanho, etc); filtração (por exemplo, a ultrafiltração e/ou diafiltração); e uma ou mais etapas de redução de vírus (por exemplo, nanofiltração, tratamento com solvente e detergente, irradiação UV, tratamento pelo calor, a baixa de pH de incubação, etc).

[00256] Numa modalidade, A1PI extraído da porção insolúvel da primeira suspensão é ainda enriquecido por fracionamento. Geralmente, pode ser usado qualquer método de fracionamento (por exemplo, o álcool ou a

precipitação do polímero, as trocas salinas, etc). Numa modalidade preferida, a composição é enriquecida pelo A1PI precipitado a partir da solução extraída clarificado utilizando um cátion bivalente, de preferência o zinco. Numa modalidade, o cloreto de zinco é adicionado à solução para uma concentração final de 1 mM para 15 mM. Numa modalidade específica, o cloreto de zinco é adicionado à solução para uma concentração final de 1 mM a 4 mM. Numa modalidade mais específica, o cloreto de zinco é adicionado à solução para uma concentração final de 2,0 mM a 3,0 mM.

[00257] Em certas modalidades, A1PI é enriquecido de acordo com métodos de purificação conhecidos na técnica, por exemplo, aqueles descritos no documento WO 1995/35306, WO 1998/00154, e Patentes US N° 5981715; 7.807.435; e 7.879.800, cujas divulgações são aqui expressamente incorporadas por referência na sua totalidade para todos os fins.

## **VI. Composições Farmacêuticas**

[00258] Em um aspecto, a presente invenção prevê composições de proteínas derivadas do plasma que são preparados de acordo com qualquer dos métodos aqui descritos. Em certas modalidades, estas composições serão formuladas para administração farmacêutica (isto é, composições farmacêuticas).

[00259] Numa modalidade, a presente invenção prevê uma composição de proteína derivada de plasma preparado por um método compreendendo os estágios de: co-precipitação de imunoglobulinas e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn, em uma primeira etapa de precipitação, de modo a formar um primeiro precipitado e um primeiro sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; solubilização de imunoglobulinas a partir da primeira suspensão de modo a formar uma porção solúvel da suspensão que compreende imunoglobulinas e uma porção insolúvel da suspensão que compreende A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP; e separar a porção solúvel da suspensão a partir

da porção insolúvel da suspensão. Em certas modalidades, a composição compreende uma proteína derivada do plasma, é selecionado a partir de uma imunoglobulina (Ig), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, o Fator H, uma proteína do sistema de complemento, e uma inter-alfa inibidor de tripsina de proteína (IαI).

[00260] Em geral, entende-se qualquer substância química para a precipitação de imunoglobulinas e A1PI pode ser utilizado, incluindo, mas não limitadas a, precipitação com álcool (por exemplo, utilizando-se etanol ou metanol), precipitação utilizando polímeros solúveis em água (por exemplo, PEG ou dextrana), e para as trocas salinas (por exemplo, utilizando fosfato de amônio, sulfato de amônio, citrato de sódio, etc). Numa modalidade preferida, a precipitação é precipitação com álcool, precipitação, de preferência etanol.

[00261] Numa modalidade, a composição é formulada para a administração farmacêutica. Numa modalidade específica, a composição é formulada para administração intravenosa. Numa outra modalidade específica, a composição é formulada para administração por via intramuscular. Numa outra modalidade, a composição é formulada para administração por via subcutânea. Em ainda outra modalidade, a composição é formulada para a administração intraocular.

[00262] Numa modalidade, as composições farmacêuticas aqui fornecidas são preparadas por formulação de uma composição de proteína derivada de plasma isolado utilizando um método aqui previsto. Geralmente, a composição formulada será foram submetidos a, pelo menos uma, de preferência, pelo menos duas, mais preferencialmente pelo menos três, de inativação ou remoção estágios virais. Exemplos de etapas de inativação ou remoção virais que podem ser utilizados com os métodos aqui previstos, incluem o tratamento com detergente solvente (Horowitz et al., Blood Coagul fibrinogenolysis 1994 (5 Suppl 3):: S21-S28 e Kreil et al, Transfusion 2003 (43): 1023-1028, as quais são aqui expressamente incorporadas por referência

na sua totalidade para todos os fins), nanofiltração (Hamamoto et al, Vox Sang 1989 (56) 230-236 e Yuasa et al, J Gen. Virol 1991 (72 (8 pt)): 2021-2024, as quais são aqui expressamente incorporadas por referência na sua totalidade para todos os fins), e baixo pH de incubação a temperaturas elevadas (Kempf et al., Transfusion 1991 (31). 423-427 e Louie et al, Biologicals 1994 (22): 13-19). Em certas modalidades, a composição compreende uma proteína derivada do plasma, é selecionada a partir de uma imunoglobulina (Ig), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, o Fator H, uma proteína do sistema de complemento, e uma inter-alfa inibidor de tripsina de proteína (I $\alpha$ I).

[00263] Numa modalidade, as composições farmacêuticas aqui fornecidas irá compreender um ou mais agentes de tamponamento do pH ou agentes de estabilização adequados para administração intravenosa, subcutânea, intramuscular, e/ou administração intraocular. Exemplos de agentes de tamponamento adequados para a formulação de uma composição de proteína derivada de plasma aqui previstos incluem glicina, citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartarato, benzoato, lactato, histidina ou outros aminoácidos, gluconato, malato, succinato, formato, propionato não limitativos, carbonato, ou qualquer combinação dos mesmos ajustada para um pH adequado. Geralmente, o agente de tamponamento será suficiente para manter um pH adequado para a formulação durante um período prolongado de tempo. Numa modalidade preferida, o agente tampão é glicina. Em certas modalidades, a composição compreende uma proteína derivada do plasma, é selecionado a partir de uma imunoglobulina (Ig), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, o Fator H, uma proteína do sistema de complemento, e uma inter-alfa inibidor de tripsina de proteína (I $\alpha$ I).

[00264] Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas aqui fornecidas podem, opcionalmente, compreendem ainda um agente para ajustar a osmolaridade da composição. Exemplos não limitativos de agentes de

osmolaridade incluem manitol, sorbitol, glicerol, sacarose, glucose, dextrose, levulose, frutose, lactose, polietileno-glicóis, fosfatos, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cálcio de gluconoglucoheptonato, dimetil sulfona e semelhantes.

[00265] Tipicamente, as formulações aqui proporcionadas terá osmolaridades que são comparáveis a osmolaridade fisiológica, aproximadamente 285-295 mOsmol/kg (Lacy et al, Drug Information Manual - Lexi-Comp 1999: 1,254 Em certas modalidades, a osmolaridade da formulação irá ser entre cerca de 200 mOsmol/kg e cerca de 350 mOsmol/kg, de preferência entre cerca de 240 e cerca de 300 mOsmol/kg. Em modalidades particulares, a osmolaridade da formulação será de cerca de 200 mOsmol/kg, ou de 210 mOsmol/kg, 220 mOsmol/kg, 230 mOsmol/kg, 240 mOsmol/kg, 245 mOsmol/kg, 250 mOsmol/kg, 255 mOsmol/kg, 260 mOsmol/kg, 265 mOsmol/kg, 270 mOsmol/kg, 275 mOsmol/kg, 280 mOsmol/kg, 285 mOsmol/kg, 290 mOsmol/kg, 295 mOsmol/kg, 300 mOsmol/kg, 310 mOsmol/kg, 320 mOsmol/kg, 330 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, ou 350 mOsmol/kg.

[00266] As formulações de derivados de plasma aqui previstos são geralmente estáveis na forma líquida durante um período de tempo prolongado. Em certas modalidades, as formulações são estáveis por pelo menos cerca de 3 meses à temperatura ambiente, ou, pelo menos, cerca de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, ou 24 meses em temperatura ambiente. A formulação também irá geralmente ser estável 6 ou, pelo menos, cerca de 18 meses, sob condições de refrigeração (tipicamente entre cerca de 2°C e cerca de 8°C), ou por, pelo menos, cerca de 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, ou 45 meses, sob condições de refrigeração.

## **VII. Método de Tratamento**

[00267] Em um aspecto, a presente invenção fornece métodos para o tratamento de uma doença ou desordem associada com uma deficiência de

proteína do sangue ou disfunção em um sujeito com necessidade do mesmo por administração de uma dose terapeuticamente eficaz de uma proteína derivada de plasma preparada de acordo com um método aqui previsto. Em certas modalidades, a composição compreende uma proteína derivada do plasma, é selecionado a partir de uma imunoglobulina (Ig), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, o Fator H, uma proteína do sistema de complemento, e uma inter-alfa inibidor de tripsina de proteína (IαI).

[00268] Em um aspecto, a presente invenção prevê a utilização de uma composição de proteína derivada de plasma preparada de acordo com um processo aqui fornecidos para a fabricação de um medicamento para uso no tratamento de uma condição associada com uma deficiência de proteína do sangue ou disfunção. Em certas modalidades, a proteína é derivada de plasma selecionado a partir de uma imunoglobulina (Ig), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, o Fator H, uma proteína do sistema de complemento, e um inibidor de inter-alfa-tripsina proteína (IαI).

[00269] Numa modalidade, a composição de proteína derivada de plasma é preparado através de um método compreendendo os estágios de: co-precipitação de imunoglobulinas e de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um conjunto de Cohn, em uma primeira etapa de precipitação, de modo a formar um primeiro e precipitado um primeiro sobrenadante; suspendendo o primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão; solubilização de imunoglobulinas a partir da primeira suspensão de modo a formar uma porção solúvel da suspensão que compreende imunoglobulinas e uma porção insolúvel da suspensão que compreende A1PI, fibrinogênio, fator H, e IaIP; e separar a porção solúvel da suspensão a partir da porção insolúvel da suspensão. Em certas modalidades, a composição compreende uma proteína derivada do plasma, é selecionado a partir de uma imunoglobulina (Ig), albumina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterase, o Fator H, uma proteína do sistema de complemento, e uma inter-alfa inibidor de tripsina de



proteína (IαI).

### **VIII. Exemplos**

#### *Exemplo 1 - C91 NG2*

[00270] A imunoglobulina G (IgG) composições são fabricados comercialmente por fracionamento do plasma por meio de uma série de reações de precipitação. Em uma metodologia comum, as impurezas são precipitadas a partir de um crio-sobrenadante contendo imunoglobulina num primeiro estágio de precipitação de álcool. Imunoglobulinas IgG são, então, precipitados a partir do sobrenadante resultante e depois ainda enriquecido. Numa tentativa de aumentar o rendimento de IgG recuperada a partir de plasma humano durante o fracionamento de álcool, os valores de pH 5,5-7,0 e as concentrações de etanol, de 20% a 25% foram testados em reações de precipitação de IgG.

[00271] Resumidamente, o sobrenadante Fração I, um intermediário usado na fabricação comercial de derivados de plasma de Imunoglobulina G (IgG), a alfa-1-antitripsina (A1PI), e produtos de albumina, foi formada pela mistura de etanol a uma concentração final de 8% (v/v) para crio-sobrenadante em pH  $7,2 \pm 0,2$ , incubação da mistura a 0°C, e separa-se o precipitado formado (Fração I) a partir do sobrenadante (Fração I sobrenadante). O sobrenadante Fração I resultante foi, em seguida, dividido em alíquotas em 600 amostras de g. O pH das amostras individuais foi ajustado para 5,5-7,0 e de etanol foi adicionada a uma concentração final de entre 20% e 25%, como mostrado na Tabela 9.

[00272] Como relatado na Tabela 9, condições semelhantes às utilizadas para preparar uma fração tradicional Cohn II + III precipitado (etanol a 25%, pH 6,8) e a Fração II + III modificado precipitado utilizado na fabricação de GAMMAGARD LIQUID® (Baxter International; Deerfield, IL) resultar numa perda de 2,9% e 6,7% do total de IgG no sobrenadante, devido à precipitação incompleta. No entanto, verificou-se que através da redução do

pH da reação para 6,0 ou inferior e com uma concentração final de etanol de pelo menos 22,5%, a perda de IgG é significativamente reduzida. Por exemplo, a utilização de 22,5% de álcool, a pH 5,5 resultou numa perda de apenas 0,4% do total de IgG no sobrenadante. Do mesmo modo, o uso de 25% de álcool, a pH 6,0 ou 5,5 resultou na perda de apenas 0,5% e 0,1% do total de IgG no sobrenadante. Como relatado na Tabela 10, o que equivale a um aumento de mais de 300 mg de IgG/L de plasma e 125 mg de IgG/L de plasma no precipitado em comparação com o tradicional, e modificado Fração II + III de precipitados, respectivamente.

**Tabela 9.** Produção de proteínas no sobrenadante da precipitação, expressa como uma percentagem do teor de proteína do material de partida (Fração I sobrenadante).

EtOH (%)	pH	Proteína biureto	IgG ELISA	IgA ELISA	IgM ELISA	fibrinogênio ELISA	Transferrina ELISA	a1-antitripsina ELISA	Albumina neph
20	5,5	60,8	1,1	3,5	0,2	0,2	73,9	6,1	93,1
20	6	68,0	2,9	12,8	0,5	0,2	94,3	38,9	92,4
20	6,5	70,0	4,1	20,6	1,0	0,7	100,2	63,2	97,4
20	7	73,0	6,7	45,8	1,9	4,6	98,4	76,9	96,5
22,5	5,5	56,7	0,4	1,2	0,1	0,2	47,5	1,1	90,6
22,5	6	64,6	1,1	4,8	0,4	0,4	78,2	21,7	98,0
22,5	6,5	68,0	1,8	9,0	0,6	0,4	85,9	27,3	96,6
22,5	7	70,3	3,0	19,4	1,2	0,9	97,3	27,1	96,5
25	5,5	45,6	0,1	0,6	0,0	0,2	8,6	0,8	76,8
25	6	60,2	0,5	1,4	0,3	0,3	59,2	7,6	92,9
25	6,5	66,9	2,2	5,7	1,6	1,7	86,0	18,3	95,6
25	7	67,8	2,9	8,5	2,3	1,7	95,1	18,9	96,5

**Tabela 10.** Produção de proteínas no sobrenadante da precipitação, expresso em g/L de plasma.

EtOH (%)	pH	proteína biureto	IgG ELISA	IgA ELISA	IgM ELISA	fibrinogênio ELISA	Transferrina ELISA	a1-antitripsina ELISA	albumina neph
20	5,5	26,457	0,061	0,045	0,001	0,000	1,327	0,071	29,402
20	6	29,603	0,157	0,162	0,002	0,001	1,692	0,459	29,174
20	6,5	30,445	0,223	0,261	0,004	0,002	1,799	0,745	30,737
20	7	31,792	0,368	0,579	0,008	0,012	1,765	0,907	30,460
22,5	5,5	24,673	0,021	0,015	0,000	0,000	0,852	0,013	28,591
22,5	6	28,095	0,062	0,061	0,002	0,001	1,403	0,255	30,946
22,5	6,5	29,577	0,097	0,114	0,002	0,001	1,542	0,322	30,488
22,5	7	30,609	0,165	0,246	0,005	0,001	1,747	0,320	30,455
25	5,5	19,833	0,004	0,007	0,000	0,000	0,155	0,009	24,263

EtOH (%)	pH	proteína biureto	IgG ELISA	IgA ELISA	IgM ELISA	fibrinogênio ELISA	Transferrina ELISA	a1-antitripsina ELISA	albumina neph
25	6	26,212	0,025	0,018	0,001	0,001	1,062	0,089	29,325
25	6,5	29,097	0,119	0,072	0,006	0,004	1,795	0,215	30,198
25	7	29,512	0,157	0,107	0,009	0,004	1,706	0,223	30,458

### *Exemplo 2 - NG2 C96*

[00273] Uma comparação experimental de esquemas de purificação de IgG realizados com e sem uma precipitação inicial de 8% de etanol foi realizado para determinar se um aumento adicional da recuperação de IgG pode ser obtido usando um pH baixo (5,5), teor elevado de etanol (25%) de precipitação, tal como delineado no Exemplo 1.

[00274] Resumidamente, 100 kg de crio-sobrenadante foi processado com (NG2C96/1) ou sem (NG2C96/2) um estágio de precipitação inicial (Fração I), realizada utilizando 8% (v/v) de etanol a concentração final a pH 7,4 e 0°C. O pH do crio-sobrenadante (NG2C96/1) ou fração I sobrenadante (NG2C96/2) foi ajustada para pH  $5,5 \pm 0,1$  e o etanol foi adicionada a uma concentração final de 25% (v/v). As misturas em que, em seguida, incubadas a  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5 horas para permitir a precipitação de proteínas. Os precipitados resultantes (precipitado (I) + II + III) e os sobrenadantes (sobrenadante (I) + II + III) foram separados por centrifugação. Devido ao tamanho das reações de precipitação, duas centrifugações foram necessárias para cada reação. Os precipitados resultantes de cada centrifugação foram processados separadamente.

[00275] Os precipitados foram suspensos em tampão contendo fosfato de monossódio a 5 mM, acetato de sódio 5 mM, e 600 mg/L de ácido acético glacial numa razão de 1 parte precipitado por 15 partes de tampão, o pH foi ajustado para  $4,8 \pm 0,2$ , e agitou-se a extrair proteínas durante 2 horas a entre 4°C e 8°C. Após a incubação de extração, 40 g de sílica ( $\text{SiO}_2$ )/kg de precipitado (I) + II + III foi misturado nas reações e agitou-se durante 50 minutos a entre 4°C e 8°C. 400 g de filtro de auxílio Cellpure/kg precipitado (I) + II + III foi então misturada e as reações foram filtradas através de

membranas de Cuno 50SA para remover o material insolúvel, formando um (I) + II + III de filtrado e um bolo de filtração. O bolo de filtração foi lavado com tampão contendo 5 mM de fosfato monossódico, acetato de sódio 5 mM, e 150 mg/L de ácido acético glacial, o filtrado do que foi adicionada à (I) + II + III filtrado.

[00276] Polissorbato 80 foi adicionado aos filtrados para uma concentração final de 0,2% (p/p), e as soluções foram incubadas durante 30 minutos. Citrato de sódio di-hidratado foi então adicionado às soluções a uma concentração final de 0,8% (p/p) e a solução foi incubada durante 30 minutos adicionais. Após a segunda incubação, o pH da solução foi ajustado para 7,0 usando hidróxido de sódio e etanol foram misturados para uma concentração final de 25%. A temperatura foi reduzida para entre 0°C e -10°C para permitir a precipitação. O precipitado (PptG) e sobrenadante (PptG sobrenadante) foram separadas por centrifugação.

[00277] Determinaram-se os teores de imunoglobulinas IgG, IgA, e IgM de cada sub-estágio das reações de purificação. Como mostrado na Tabela 11, a remoção da primeira etapa de precipitação da fração I resultou num rendimento significativamente maior de IgG na composição final (comparar PptG dissolvido NG2C96/2 (sem precipitação Fração I) para NG2C96/1 (com precipitação Fração I). Da mesma forma, a IgA (Tabela 12) e IgM (Tabela 13) o conteúdo da fração PptG dissolvido formado sem a primeira etapa de precipitação da fração I.

[00278] Notavelmente, a Etapa de precipitação da fração I é utilizado, em parte, para remover o fibrinogênio a partir de composições contendo imunoglobulina. Embora o teor em fibrinogênio final da fração PptG dissolvido formado sem a primeira etapa de precipitação da fração I é aproximadamente 6 vezes maior do que o conteúdo da fração PptG formada com a primeira etapa de precipitação da fração I, o esquema de fracionamento remove mais de 99% do teor de fibrinogênio presente no material de partida

de crio-sobrenadante (Tabela 14).

**Tabela 11.** Teor de IgG, expresso em g/L de plasma das várias frações formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo, reação elevada de precipitação de álcool com e sem uma etapa de precipitação da fração I com 8% de etanol inicial.

	IgG			
	g/L de plasma			
	NG2C96/1	NG2C96/1B	NG2C96/2	NG2C96/2B
	precipitação II + III		precipitação I + II + III	
plasma	5,36		5,36	
sobrenadante I	5,32		-	
Ppt I dissolvido sobrenadante	0,11		-	
sobrenadante (I) + II + III	0,004		0,007	
(I) + II + III suspensão	4,37	4,72	5,07	4,40
(I) + II + III filtrado	4,55	5,33	5,36	4,77
filtro sobrenadante dissolvido	0,10	0,18	0,08	0,10
PptG sobrenadante	0,08	0,06	0,09	0,05
PptG dissolvido	4,03	-	5,03	-

**Tabela 12.** Teor de IgA, expressa em g/L a partir de plasma das várias frações formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo, reação elevada de precipitação de álcool com e sem uma etapa de precipitação da fração I com 8% de etanol inicial.

	IgA			
	g/L de plasma			
	NG2C96/1	NG2C96/1B	NG2C96/2	NG2C96/2B
	precipitação II + III		precipitação I + II + III	
plasma	1,20		1,20	
sobrenadante I	1,14		-	
Ppt I dissolvido sobrenadante	-		-	
sobrenadante (I) + II + III	0,001		0,002	
(I) + II + III suspensão	0,92	1,37	1,08	1,21
(I) + II + III filtrado	0,80	1,02	1,01	0,96
filtro sobrenadante dissolvido	-	-	-	-
PptG sobrenadante	-	-	-	-
PptG dissolvido	0,66	-	0,79	-

**Tabela 13.** Teor de IgM, expressa em g/L a partir de plasma das várias frações formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo, reação elevada de precipitação de álcool com e sem uma etapa de precipitação da fração I com 8% de etanol inicial.

IgM			
g/L de plasma			

	NG2C96/1	NG2C96/1B	NG2C96/2	NG2C96/2B
	precipitação II + III		precipitação I + II + III	
plasma	0,41		0,41	
sobrenadante I	0,39		-	
Ppt I dissolvido sobrenadante	-		-	
sobrenadante (I) + II + III	0,0001		0,0004	
(I) + II + III suspensão	0,38	0,45	0,40	0,41
(I) + II + III filtrado	0,22	0,24	0,29	0,28
filtro sobrenadante dissolvido	-	-	-	-
PptG sobrenadante	-	-	-	-
PptG dissolvido	0,19	-	0,29	-

**Tabela 14.** Teor em fibrinogênio, expresso em g/L a partir de plasma das várias frações formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo, reação elevada de precipitação de álcool com e sem uma etapa de precipitação da fração I com 8% de etanol inicial.

	Fibrinogênio			
	g/L de plasma			
	NG2C96/1	NG2C96/1B	NG2C96/2	NG2C96/2B
	precipitação II + III		precipitação I + II + III	
plasma	1,45		1,45	
sobrenadante I	0,28		-	
Ppt I dissolvido sobrenadante	-		-	
sobrenadante (I) + II + III	0,0001		0,0004	
(I) + II + III suspensão	0,25	0,34	1,27	1,34
(I) + II + III filtrado	0,002	0,005	0,017	0,018
filtro sobrenadante dissolvido	-	-	-	-
PptG sobrenadante	-	-	-	-
PptG dissolvido	0,0021	-	0,013	-

### Exemplo 3 - NG2 C99

[00279] Para explorar ainda mais o uso de um pH baixo, precipitação elevada de álcool no lugar de estágios de fração de álcool Cohn-Oncley e Kistler-Nitschmann tradicionais a montante (ou seja, Cohn Fração I e II; Cohn Fração I e II + III, ou Kistler Nitschmann 8 a 10% de etanol, precipitado A, precipitado B) os precipitados NG2C96/2 e NG2C96/2B PptG foram combinados e ainda enriquecidos para IgG.

[00280] Resumidamente, o combinado NG2C96/2 e precipitados NG2C96/2B PptG foram suspensas em água para injeção (WFI), ajustado a pH  $4,75 \pm 0,75$  com ácido acético e uma condutividade de  $4,5 \pm 1,5$  mS/cm, com cloreto de sódio. Um auxiliar de filtração foi adicionado e a suspensão

foi filtrada através de membranas Cuno VR06 para formar um filtrado clarificado PptG (VR06). O filtrado clarificado foi então tratada com solventes e detergentes (de tratamento S/D) de acordo com os procedimentos padrão.

[00281] O filtrado foi tratado S/D foi carregado numa coluna de CM-Sepharose equilibrada com tampão contendo 10 mM de acetato de sódio (pH 5,0) e o fluxo de passagem (CM D/N) foi recolhido. A coluna foi então lavada com tampão contendo 10 mM de acetato de sódio (pH 5,5) e a lavagem (W CM) foi recolhido. As imunoglobulinas foram eluído da coluna utilizando um tampão de eluição contendo 55 mM de fosfato monossódico e TRIS a 10 mM (pH 8,5). O eluato foi recolhido em três frações: Fração 1 (CM E-VL), incluindo a primeira porção do produto de eluição com uma OD<sub>280</sub> de menos de 100 mAU; Fração 2 (CM E), incluindo o pico de eluato com uma OD<sub>280</sub> superior a 100 mAU sobre o bordo de ataque do pico de eluição e uma OD<sub>280</sub> superior a 400 mAU na borda do retardamento do pico de eluição; e Fração 3 (CM E-NL), incluindo a parte do fluido no lado do retardamento do pico com uma OD<sub>280</sub> de menos de 400 mAU.

[00282] O pH e a condutividade da Fração 2 eluato foi ajustado para 6,4 e 2,3 mS/cm, utilizando ácido acético glacial e água para injeção (WFI), respectivamente. A fração 2 eluato foi em seguida carregado numa resina de troca aniônica de fluxo rápido ANX Sepharose equilibrada com tampão contendo 15 mM de fosfato monossódico (pH 6,4) a uma concentração de carga de 100 mg de proteína/ml de resina. O fluxo através de permuta de ânions, que contém a maioria da IgG foi recolhido (ANX D/N). Ligação à resina de permuta aniônica A proteína foi eluída da coluna com uma solução contendo cloreto de sódio a 2 M (ANX 2M de NaCl).

[00283] A glicina foi adicionada ao fluxo através da fração de troca aniônica e a amostra foi de ultra e diafiltrado (UF/DF), utilizando um Mini-2 Pellicon<sup>®</sup> (Millipore) contra uma solução contendo 0,25 M de glicina (pH 5,2)

até uma concentração de proteína de 5% era conseguida. A solução de imunoglobulina foi adicionalmente concentrada para uma concentração final de proteína de 10% e o pH foi ajustado para 4,5 (dia-concentrado). A solução de imunoglobulina a 10% foi em seguida esterilizada por filtração usando um Millipak 20 (Millipore), para formar a composição final de imunoglobulina (recipiente final).

[00284] O perfil bioquímico para cada sub-estágio da reação de purificação foi determinado (Tabela 15 e Tabela 16). Como se mostra nos dados, a composição final continha apenas níveis baixos de proteínas não IgG, dentro de parâmetros aceitáveis para administração farmacêutica.

**Tabela 15.** Caracterização bioquímica das várias frações formadas durante o fracionamento de plasma usando um pH baixo, reação de precipitação de álcool elevada sem uma etapa de precipitação de Fração I de 8% de etanol inicial.

	Proteína		IgG	IgA	IgM	$\alpha$ 1 antitripsina
	g/L Cohn Conjunto		g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto
	Biuret	UV				
Conjunto Cohn	47,38		5,36	1,20	0,41	1,01
sobrenadante I + II + III	19,79		<0,0073	0,002	0,0004	0,004
I + II + III suspensão	25,83		4,62	1,17	0,41	0,33
I + II + III filtrado	18,24		4,97	0,98	0,28	
filtro sobrenadante dissolvido	4,52		0,09			0,61
PptG sobrenadante	11,00		0,06			
PptG dissolvido	7,46		5,46	1,01	0,32	0,01
VR 06	7,47		5,20	0,95	0,31	
VR 06 diluído	7,23		5,20	0,99	0,31	
CM D/N	0,66		<0,04/0,026			
CM W	0,11	0,09	<0,13/0,0066			
CM E-VL	0,001	0,001	<0,0031/<0,00001			
CM E	6,16	5,38	4,85	0,60	0,042	
CM E-NL	0,08	0,04	0,011/0,014			
CM NaCl 2M	0,19	0,11	0,05/0,04	0,014	0,02	
CM E diluído		5,33	4,61			
ANX D/N		4,45	4,52	0,0014	0,00007	
ANX NaCl 2M	1,34		0,40/0,28	0,59	0,044	
dia-concentrado		4,16	2,55			
pós lavagem 1		0,59				
pós lavagem 2		0,05				



	Proteína		IgG	IgA	IgM	$\alpha$ 1 antitripsina
	g/L Cohn Conjunto		g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto
	Biuret	UV				
pós lavagem 3		0,01				
dia-concentrado diluído		3,81				
recipiente final		3,86	3,94	0,0012	0,00004	

**Tabela 16.** Outra caracterização bioquímica das várias frações formadas durante o fracionamento de plasma usando um pH baixo, reação de precipitação de álcool elevada sem uma etapa de precipitação de Fração I de 8% de etanol inicial.

	$\alpha$ 2 macroglobulina	Fibrinogênio	Transferrina	Albumina	Complemento C3
	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto	g/L Cohn Conjunto
Conjunto Cohn		1,45	2,17		0,80
sobrenadante I + II + III		0,0004	2,44		<0,001
I + II + III suspensão		1,32	1,99	6,40	0,55
I + II + III filtrado		0,02	1,95	6,82	0,05
filtro sobrenadante dissolvido					
PptG sobrenadante					
PptG dissolvido	0,46	0,02	0,02		0,04
VR 06		0,01	0,02		0,03
VR 06 diluído					
CM D/N	0,17				
CM W					
CM E-VL					
CM E	0,22	0,011	0,024		0,020
CM E-NL					
CM NaCl 2M					
CM E diluído					
ANX D/N	<0,00002	<0,00006	0,003		<0,00004
ANX NaCl 2M					
dia-concentrado					
pós lavagem 1					
pós lavagem 2					
pós lavagem 3					
dia-concentrado diluído					
recipiente final	0,000001	0,00001	0,0028		0,00003

#### *Exemplo 4 - NG2 C100*

[00285] Para validar o uso de um pH baixo, a precipitação de álcool elevado sem um estágio inicial baixa precipitação com álcool para remover o fibrinogênio, 200 kg de crio-sobrenadante foi fracionado e enriquecida, tal

como descrito para a amostra NG2C96/2 nos Exemplos 2 e 3, com um par de alterações no processo. Em primeiro lugar, o baixo pH, estágio de precipitação elevado de álcool (precipitação I-IV1) foi realizada utilizando etanol a 25% a pH 5,1, em vez de 5,5. Em segundo lugar, o precipitado I-IV1 suspenso foi tratada com 33 g de sílica ( $\text{SiO}_2$ )/kg precipitado I-IV1, em vez de 40 g de  $\text{SiO}_2$ /kg precipitado. Em terceiro lugar, o eluato de permuta catiônica CM foi carregada na resina de troca aniônica ANX a uma concentração de 150 mg de proteína de resina mL ANX, resina /, em vez de 100 mg/mL ANX. Finalmente, o Cuno VR06 filtrada fluxo de troca aniônica através foi passado através de uma 35N PLANOVA® (Asahi Kasei Medical Co., Ltd.; Tóquio, Japão) para realizar um estágio de nanofiltração antes ultra-/diafiltração.

[00286] O teor de IgG de cada estágio da purificação foi determinada e os resultados são fornecidos na Tabela 17. Em comparação com o rendimento médio de IgG específica para o processo de fabricação GAMMAGARD LIQUID® (3,7 g de IgG/L de plasma de origem), o método de purificação utilizado neste exemplo resulta em um rendimento significativamente mais elevado de 4,4 g de plasma de origem de IgG/l. Isso representa um aumento de quase 20% no rendimento IgG. Caracterização bioquímica da composição final de IgG é relatado na Tabela 10 Como se pode ver na tabela, a composição final de IgG tem mais do que 99% de pureza e o teor de monômero de IgG/dímero é maior do que 99,8%. O recipiente final contém apenas vestígios de impurezas, cujos níveis estão dentro de padrões regulatórios.

**Tabela 17.** Teor de IgG das frações formadas durante o enriquecimento de crio-sobrenadante usando um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevada de álcool.

		IgG				
		mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
-I-IV 1 precipitação	Conjunto Cohn	5,52	1.113,94	100,00	11.43	5,52
	I-IV1 antes da adição de EtOH					
	I-IV1 após adição de EtOH					
	I-IV1 sobrenadante	<0,00121	<0,029	<0,026	<0,013	<0,0014

		IgG				
		mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
	I-IV1 sobrenadante de centrifugação 1	<0,00121	<0,029	<0,026	<0,013	<0,0014
	I-IV1 sobrenadante de centrifugação 2	<0,00121	<0,029	<0,026	<0,013	<0,0014
	I-IV1 precipitado					
I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado					
	I-IV1 suspensão	2.69	975,30	87.55	13.43	4.83
	Cuno filtrado	1.69	1.186,24	106,49	21.41	5,88
filtro	REZ 1	0.09	18.23	1,64	1,78	0.090
	REZ 2	0,02	2.31	0,21	1,04	0,011
PptG- precipitação	PptG precipitação					
	PptG sobrenadante	0,02	14.02	1.26	0,35	0,069
	PptG usado					
Extração PptG, clarificações.	PptG suspensão	47.4	1.152,39	103,45	69.55	5,71
	VR06 (PptG)	22.8	1.074,82	96.49	66.31	5.33
	VR06 diluído	13.80	1.126,98	101,17	80.00	5,58
SD e CM Sepharose FF	SD					
	Carga CM					
	D/N	0.140	18.38	1.65	7,93	0.091
	D/N	0,228	29.84	2.68	12.88	0,15
	W	0.005	1.96	0,18	16.45	0.010
	W	<0,068	<27.91	<2,51	<234,48	<0,14
	E-VL	<0,0712	<0,59	<0,05	<334,63	<0,00
	E	23,2	1.026,43	92.14	86.02	5,09
	E-NL	0,661	4.55	0.41	89,26	0.023
	NaCl 2M	0,114	5,82	0,52	43.92	0,029
	NaCl 2M	0,139	7,08	0,64	53.46	0.035
ANX SEPH 4FF baixo sub	E diluído	9,005	1.113,29	99,94	92.64	5,52
	Carga ANX					
	D/N	6.35	903,11	81.07	94,49	4,48
	NaCl 2M	3	78.99	7,09	26.31	0,39
VR06	VR06 (ANX)	6.185	972,42	87.30	101,23	4,82
Asahi	ASAHI filtrado	5.27	907,55	81.47	94.95	4,50
UF/DF	Diaconcentrate	102,5	910,38	81.73	100,89	4,51
	pós lavagem 1	8,255	51.70	4,64	102,78	0,26
	pós lavagem 2					
	pós lavagem 3					
	Diaconcentrate (final)	96,1	871,30	78.22	96.56	4,32
FC	recipiente final (calculado)	100	888,18	79.73		4.40

**Tabela 18.** Caracterização bioquímica da composição final de IgG enriquecido a partir de 200 L de crio-sobrenadante usando um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevada de álcool.

Teste	Unidade	Resultado
Proteína Total - Kjeldahl	mg/ml	109,8
Proteína Total - Kjeldahl	mg/ml	108.5213
Pureza (CAE)	Albumina%	0
	$\alpha/\beta$ % globulina	0
	$\gamma$ -globulina%	100
	denat.Proteína%	0
Distribuição de tamanho	Monômero [%]	93,2085

molecular	Dímero [%]	6,6806
	Polímero [%]	0,0828
	Fragmentos [%]	0,0281
IgG neph	mg/ml	100
IgA (ELISA)	mg/ml	0,03
IgM (ELISA)	mg/dl	0
IgE (ELISA)	UI/ml	66,2
Albumina (ELISA)	mg/ml	0,00184
Fibrinogênio (ELISA)	ug/ml	<0,17
Plasminogênio (ELISA)	ug/ml	0,26
C3 complemento	mg/dl	<19,4

Teste	Grupo Subclasse	O resultado (mg/ml)
IgG subclasse distribuição	IgG1	54,7158
	IgG2	29,22
	IgG3	7,2029
	IgG4	2,3634

Teste	Unidade	Resultado
Função IgG Fc (FACS)		108 ± 15
IgG Fc HemaggL Função	%	103
Identidade Proteína		positivo
Atividade amidolítica (PL-1)	nmol/ml	87,3
Anticomple. Atividade	%	42
PKA	% Do lote ref 3	1.59
PKA	UI/ml	1.2
NAPPT	mg	0,773
Fator Xla	mU/ml	24.9
	pM	771,6
Aparência		satisfatória
ph		5.643
Silício	ig/l	664
Alumínio	ig/l	<25
Glycine	M	0,074
A osmolaridade	mOsmol/kg	90
Pyrogen	UE/EUA	sab/sat.
Densidade	g/cm3	1,0301

## SD Reagentes

Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	0.50
Polissorbato 80	ppm	<26
Tri (n-butil) fosfato	ppm	<0,2

Teste	Unidade	Resultado
Anticorpos		
Difteria	IU/mL	8,0
Difteria	IU/mL	9
Sarampo	IU/mL	39.63
Antigênio HBs (ELISA)		negativo
HBs (ELISA)	mUI/mL	5775
Poliomielite	Quociente gg 176	0,90
HAV (ELISA)	UI/mL	13.8
Parvo B19 (ELISA)	UI/mL	426

Haemophilus Influenzae	Titer	1: 6400
Anti D Anticorpos		satisfatória
Anti A & ANTIB Hemaglutininas	Anti A	16
	Anti B	8

*Exemplo 5 - P02910NG2*

[00287] Para comparar o efeito da passagem do eluato de permuta catiônica CM através de uma coluna de permuta aniônica ANX em concentrações de carga de 100 g de resina mL ANX proteína/ml de resina ANX e 150 g de proteína /, 200 L de crio-sobrenadante foi fracionado por meio de uma primeira baixa pH (5,4), elevado de álcool (25%) estágio de precipitação e processado para formar um precipitado PptG como descrito para a amostra NG2C96/2 nos Exemplos 2 e 3 O teor de IgG, IgA, e IgM de as frações a montante se formaram foram determinados e são relatado na Tabela 19, Tabela 20, e Tabela 21, respectivamente.

[00288] O precipitado PptG resultante foi dividida em duas amostras de 1,8 kg, que foram enriquecidas para o recipiente final, como descrito para a amostra NG2C96/2 nos Exemplos 2 e 3, excepto que uma amostra foi passada através da resina de troca aniônica ANX a uma concentração de carga de 100 mg de proteína/ml de resina ANX (P03010NG2) e o outro foi passada através da resina de troca aniônica ANX a uma concentração de carga de resina de 150 mg de proteína/mL ANX (P03110NG2).

[00289] O teor de IgG de cada etapa de enriquecimento a jusante das purificações foi determinada e os resultados são fornecidos na Tabela 22 e Tabela 23. Em comparação com o rendimento de IgG média para o processo de fabricação GAMMAGARD LIQUID<sup>®</sup> (3,7 g de IgG/L de plasma de origem), a métodos de purificação usados neste exemplo resulta em rendimentos significativamente mais elevados de 4,3 g de plasma de origem de IgG/l. Isso representa um aumento de 16% no rendimento de IgG. Caracterizações bioquímicas das composições finais de IgG são apresentados na Tabela 16 e Tabela 17 Como pode ser visto nas tabelas, as composições

finais de IgG têm mais do que 99% de pureza e o monômero de IgG/teor de dímero são maiores do que 99,8%. O recipiente final contém apenas vestígios de impurezas, cujos níveis estão dentro de padrões regulatórios.

**Tabela 19.** Teor de IgG das frações a montante formadas durante o fracionamento de plasma, utilizando um pH inicial baixo (5,4), reação de precipitação elevada de álcool (25% de etanol).

		peso kg	calc. peso kg	IgG nefelometria IPC/ELISA				
				mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
	Cohn Conjunto	204,60	204,60	5,26	1,076,20	100,00	10,72	5,26
-I-IV 1 precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	206,46	206,81					
	I-IV1 após adição de EtOH	266,56	267,14					
	I-IV1 sobrenadante	247,80	248,64	0,00517	1,29	0,12	0,03	0,01
	I-IV1 precipitado	17,10	17,16					
I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	11,21	17,16					
	I-IV1 suspensão	180,21	275,80	4,09	1,128,02	104,82	23,15	5,51
	Cuno filtrado	340,70	522,00	2,11	1,101,42	102,34	34,72	5,38
PptG-precipitação	PptG precipitação	2,59	3,96					
	PptG sobrenadante	442,20	677,32	0,0235	15,92	1,48	0,93	0,08

ELISA

**Tabela 20.** Teor de IgA das frações a montante formadas durante o fracionamento de plasma, utilizando um pH inicial baixo (5,4), reação de precipitação elevada de álcool (25% de etanol).

		peso kg	calc. peso kg	IgA ELISA				
				mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
	Cohn Conjunto	204,60	204,60	1,18	241,43	100,00	2,41	1,18
I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	206,46	206,81					
	I-IV1 após adição de EtOH	266,56	267,14					
	I-IV1 sobrenadante	247,80	248,64	0,00251	0,62	0,26	0,01	0,0031
	I-IV1 precipitado	17,10	17,16					
I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	11,21	17,16					
	I-IV1 suspensão	180,21	275,80	0,861	237,46	98,36	4,87	1,16
	Cuno filtrado	340,70	522,00	0,365	190,53	78,92	6,01	0,93
PptG-precipitação	PptG precipitação	2,59	3,96					
	PptG sobrenadante	442,20	677,32					

**Tabela 21.** IgM conteúdo das frações a montante formados durante fracionamento de plasma usando um pH inicial baixo (5,4), reação de precipitação elevada de álcool (25% de etanol).

[illegible]

				IgG						
Amostra		Peso (Kg)	Corr.Peso (kg) corr.	Proteína (G)	mg /ml	g	Rendimento (%)	Pureza (%)	g/l de plasma	Rendimento% Estágio
PptG Suspensão e Filtração										
Granel	16/1	0,53	3,97	415,03	101	400,71	86,09	96,55	4,30	102,64
EB	19/1	0,53	3,97	415,03	102	404,68	86,94	97,51	4,34	103,66

**Tabela 23.** Teor de IgG das frações a jusante formadas durante fracionamento de plasma usando um pH inicial baixo (5,4), reação de precipitação elevada de álcool (25% de etanol), e uma concentração de carga troca de ânion ANX de 150 mg/ml de resina ANX (P03110NG2).

					IgG					
Amostra		Peso (Kg)	Corr.Peso (kg) corr.	Proteína (G)	mg/ml	g	Rendimento (%)	Pureza (%)	g/l de plasma	Rendimento% Estágio
PptG Suspensão e Filtração										
PptG Susp.	10/2	8,36	8,36	644,59	56,7	465,47	100	72,2	4,99	
PptG Filtrat.	10/6	15,91	16,24	669,20	30	487,34	104,70	72,8	5,22	
PptG Filtrat verd.	10/7	32,50	33,43	658,56	13,7	458,05	98,41	69,6	4,91	100,00
CM Sepharose										
D	12/12 A	38,00	53,88	48,9	0,0037	5,05	1,08	10,3	0,054	1,10
W	12/12 B	127,60	180,91	0,54	<0,0712					0,00
VL	12/12 C	2,41	3,41	0,04	<0,0712					0,00
Eluate	12/12 D	13,40	19,00	580,49	23,5	452,17	97,14	77,9	4,88	95,72
NL	12/12 E	1,18	1,67	2,18	0,642	1,07	0,23	49,1	0,01	0,23
NaCl 2M	12/12 F	15,01	21,28	9,69	0,163	3,47	0,75	35,8	0,04	0,76
Sum							99,20		4,95	100,81
Diluído Eluate	12/13	4,3377	37,49	599,85	10,9	408,65	87,79	68,1	4,38	100,00
ANX-Sepharose										
D/N	13/6 A	11,18	51,03	416,92	8,79	448,56	96,37	107,6	4,81	109,76
NaCl 2M	13/6 B	2,37	10,83	144,25	3,11	33,68	7,24	23,3	0,36	8,24
Sum							103,60		5,17	118,01
UF/DF										
UF/DF Concentrate	15/14A	0,57	2,61	425,26	150	391,90	84,19	92,2	4,20	87,37
Pós-Wash 1	15/14B	0,55	2,51	13,46	5,87	14,76	3,17	109,7	0,16	3,29
Sum										100% de UF/DF
Granel	16/1	0,84	4,07	445,39	97	394,91	84,84	88,67	4,23	100,77
EB	19/1	0,84	4,07	445,39	99,1	403,45	85,68	90,59	4,32	102,95

**Tabela 24.** Caracterização bioquímica da composição final de IgG enriquecido a partir de crio-sobrenadante utilizando um pH inicial baixo (5,4), de reação de precipitação elevada de álcool (25% de etanol), e uma concentração de carga aniônica de troca ANX de 100 mg/ml de resina ANX (P03010NG2).

Teste	Unidade	Resultado
Proteína Total - Kjeldahl	mg/ml	109,9996
Pureza (CAE)	Albumina%	0



Teste	Unidade	Resultado
	$\alpha/\beta$ globulina%	0
	$\gamma$ -globulina%	100
	CENAT. Proteína%	0
Distribuição de tamanho molecular	Monômero [%]	94,8683
	Dímero [%]	4,9579
	Polímero [%]	0,0698
	Fragmentsos [%]	0,104
IgG neph	g/l	91,3
IgA (ELISA)	mg/ml	0,05
IgM (ELISA)	mg/dl	0
Fibrinogênio (ELISA)	ug/ml	<0,17
Plasminogênio (ELISA)	ug/ml	0,26
C3 complemento	mg/dl	<19,4
Teste	Grupo Subclasse	Resultado [Mg/ml]
IgG-subclasse distribuição	IgG1 (mg/ml)	47,897
	IgG2 (mg/ml)	25,8157
	IgG3 (mg/ml)	6,2317
	IgG4 (mg/ml)	2,0201
acTeste	Unidade	Resultado
IgGi Fc Função Hemaggl.	%	109
Atividade amidolítica (PL-1)	nmol /ml min	<10
Anticomple. Atividade	%	38
PKA	% Muito ref 3	1,399
	UI/ml	1
		1,486
		0,957
		<4
NAPTT	mg	> 10
Aparência		Satisfatório
pH		4,84
Fator XI	mUI/mL	<0,04
SN13a	mU/ml	<0,375
A osmolaridade	mOsmol/kg	266
Densidade	g/cm3	1,0346
Teste de produção de trombina		122,66
Fator do complemento I	ug/ml	69,1
Amidolítico perfil atividade	S-2288	<5
	S-2266	<5
	S-2222	<5
	S-2251	<5
	S-2302	<5
Reagentes SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	<0,1
Polissorbato 80	ppm	<26
Tri (n-butil) fosfato	ppm	0,1178
Teste	Unidade	Resultado
Anticorpos		
Anti D Anticorpos		Satisfatório

Teste	Unidade	Resultado
Anti A & ANTIB Hemaglutininas	Anti A	16
	Anti B	4

**Tabela 25.** Caracterização bioquímica da composição final de IgG enriquecida a partir de crio-sobrenadante utilizando um pH inicial baixo (5,4), de reação de precipitação elevada de álcool (25% de etanol), e uma concentração de carga aniônica de troca ANX de 150 mg/ml de resina ANX (P03110NG2).

Teste	Unidade	Resultado
Proteína Total - Kjeldahl	mg/ml	108,3393
Pureza (CAE)	Albumina%	0
	$\alpha/\beta$ globulina%	0
	$\gamma$ -globulina%	100
	denat. Proteína%	0
Distribuição de tamanho molecular	Monômero [%]	94,9047
	Dímero [%]	4,9122
	Polímero [%]	0,0762
	Fragmentos [%]	0,1068
IgG neph	g/l	95,7
IgA (ELISA)	mg/ml	0,08
IgM (ELISA)	mg/dl	0
Fibrinogênio (ELISA)	ug/ml	0,33
Plasminogênio (ELISA)	ug/ml	0,27
C3 complemento	mg/dl	<19,4
Teste	Subclassgroup	Resultado [Mg/ml]
IgG-subclasse distribuição	IgG1 (mg/ml)	54,0113
	IgG2 (mg/ml)	28,6462
	IgG3 (mg/ml)	6,0688
	IgG4 (mg/ml)	2,3599
Teste	Unidade	Resultado
IgG Fc Hemaggl Função.	%	91
Atividade amidolítica (PL-1)	NMCL/ml min	<10
Anticomple. Atividade	%	36
PKA	% Muito ref 3	2,261
	UI/ml	1,8
		1,864
		0,763
		<4
NAPTT	mg	> 10
Aparência		Satisfatório
pH		4,853
Fator XI	mU/ml	<0,04
SN13a	mU/ml	31,3
A osmolaridade	mOsmol/kg	266
Teste de produção de trombina		109,81
Densidade	g/cm3	1,0344

Teste	Unidade	Resultado
Fator do complemento I	ug/ml	147
Amidolítico profil atividade	S-2288	<5
	S-2266	<5
	S-2222	<5
	S-2251	<5
	S-2302	<5
Reagentes SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	<0,1
Polissorbato 80	ppm	<26
Tri (n-butil) fosfato	ppm	0,1414
Teste	Unidade	Resultado
Anticorpos		
Anti D Anticorpos		Satisfatório
Anti A & ANTIB Hemaglutininas	Anti A	16
	Anti B	4

### *Exemplo 6 - NG2C107B*

[00290] A viabilidade de extração de alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir da porção insolúvel de um pH baixo, de precipitação elevada de álcool usado na fabricação de imunoglobulinas IgG foi investigada. Resumidamente, duas amostras de 500 kg (# 1 e # 3) o filtro insolúvel formado durante a filtração da fração extraída I-IV-1 precipitado foram primeiro suspensas em 2,8 partes de água (p/p) em  $7 \pm 2^\circ\text{C}$  e o pH das amostras foi ajustado a  $5,5 \pm 0,1$ . As suspensões foram filtradas através de uma membrana CUNO 10CP, formando filtrados (1.Filtrat) e segundos filtros. Os segundos filtros foram então suspensos em 5 partes de água (p/p), a temperatura das suspensões foi ajustada para  $17 \pm 2^\circ\text{C}$ , o pH das amostras ajustado para  $8,8 \pm 0,2$ , e as amostras foram, em seguida, agitada durante 8 horas enquanto se mantém a temperatura e pH a extrair A1PI a partir do material insolúvel.

[00291] Após a incubação, 10 mmol de Tris e 150 mmol de cloreto de sódio por kg de suspensão foram adicionados às amostras e o pH foi ajustado para  $8,0 \pm 0,1$ . 176 g de PEG 3350 kg por suspensão foi adicionada às amostras, que foram incubadas a  $17 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 1 hora. As suspensões foram, em seguida, filtradas para remover o material insolúvel a partir do sobrenadante (2.Filtrat) contendo o A1PI extraída.

[00292] A1PI em bruto foi então precipitado a partir do segundo

filtrado por meio da adição de ambos os 0,35 g de cloreto de zinco/kg filtrado (2,5 mM ZnCl<sub>2</sub>; amostra # 1) ou 0,54 g/kg de cloreto de zinco/kg filtrado (4,0 mM ZnCl<sub>2</sub>; amostra # 3), ajustar o pH para  $7,5 \pm 0,2$ , e incubando as amostras em  $7 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 3 horas. O precipitado de cloreto de zinco foi recuperado por centrifugação (ZnCl<sub>2</sub> cento). A1PI foi extraído a partir do precipitado de cloreto de zinco com 50 mM de EDTA de sódio (Zn-EDTA-Conz).

[00293] O teor de A1PI ( a 1 A) e foi determinada a atividade de cada estágio no processo de enriquecimento e é apresentado na Tabela 26. Cerca de 400 mg de A1PI plasma/L fonte ativa foi recuperada no estágio de extração de EDTA. Notavelmente, quando A1PI foi extraída a  $38 \pm 2^\circ\text{C}$  e um pH de cerca de 9,2 a cerca de 600 mg de plasma A1PI/L fonte ativa foi recuperada.

**Tabela 26.** Teor de alfa-1-antitripsina de frações de jusante formados durante o fracionamento do plasma, utilizando um pH inicial baixo (5,4), alta de álcool (25% de etanol) a reação de precipitação e precipitação de zinco.

				A1A ELISA			A1A-Atividade OC				
		peso (G)	peso corr (g)	(Mg/mL)	mg	mg/L plasma	pureza (% de Biureto)	(Mg/mL)	mg	mg/L plasma	Atividade%vs ELISA
1	Filtro	500,50									
	Suspensão do bolo	1,900,40	1,900,40								
	Susp Cake.cento	32,71	1,209,85	0,0964	117	32,32	7,69	0,02	24	6,71	20,7
	1.Filtrado	3,291,90	3,380,85	<0,0175	<59	<16,40	<5,32	0,01	34	9,37	57,1
	Extr. n.pH	3,956,90	4,063,82								
	Extr. n.pH cento	42,61	3,385,99	0,636	2153	596,84	10,09	0,43	1456	403,52	67,6
	2.Filtrado	7,357,80	7,653,33	0,295	2258	625,73	15,96	0,2	1531	424,22	67,8
	ZnCl2 cento	7,487,40	7,841,42								
	ZnCl2 excl cento.conc	7,305,73	7,651,16	0,00646	49	13,70	1,13				
Zn-EDTA-conc	1,150,58	1,204,98	1,83	2205	611,15	23,41	1,13	1362	377,37	61,7	
3	Filtro	506,5									
	Suspensão do bolo	1,926,30	1,926,30								
	Susp Cake.cento	32,50	1,224,18	0,102	125	34,20	7,92	0,02	24	6,71	19,6
	1.Filtrado	3,448,10	3,539,99	<0,0175	<62	<16,97	<5,40	0,01	35	9,69	57,1
	Extr. n.pH	4,175,90	4,287,18								
	Extr. n.pH cento	43,03	3,611,54	0,589	2127	582,57	9,33	0,42	1517	415,41	71,3
	2.Filtrado	7,860,20	8,167,45	0,314	2565	702,35	17,97	0,15	1225	335,52	47,8
	ZnCl2 cento	8,112,00	8,483,06								
	ZnCl2 excl cento.conc	7,913,50	8,275,48	0,00319	26	7,23	0,59				
Zn-EDTA-Conz	1,485,86	1,553,83	1,38	2144	587,25	22,87	0,86	1336	365,96	62,3	

*Exemplo 7 - P03410NG2A e B*

[00294] O efeito do pH sobre a recuperação de IgG a partir de um pH

baixo, elevada precipitação de álcool de crio-sobrenadante foi investigada. Resumidamente, 100 L de crio-sobrenadante que tinham sido tratados para remover o Fator IX, o Fator VII, e antitrombina III (AT III), por adsorção, foi fracionado por precipitação com etanol a 25% a um pH de 5,4 ou (Amostra A; P03410NG2A) ou 5,6 (Amostra B; P03410NG2B). As amostras foram, então, processadas para formar um precipitado G (precipitado PptG) e sobrenadante (PptG sobrenadante), como descrito no Exemplo 2, excepto que 50 g de SiO<sub>2</sub>/kg precipitado I-IV-1 foi misturado com o precipitado I-IV-1 suspensão, em vez de 40 g/kg de precipitado.

[00295] O teor de IgG, IgA, e IgM de formadas as frações foram determinados e estão apresentados na Tabela 27, Tabela 28, e Tabela 29, respectivamente. Nomeadamente, cerca de 90% do teor de IgG do plasma de origem é recuperada na fração I-IV-1 CUNO filtrado quando a precipitação inicial é realizada a um pH de 5,4 (93,8%) ou pH 5,6 (88,8%). Da mesma forma, quase todo o teor de IgA e IgM de plasma de origem é recuperada na fração I-IV-1 de suspensão.

**Tabela 27.** Teor de IgG das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

					IgG nefelometria IPC/ELISA				
					mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	6.01	608,21	100,00	12.65	6.01
		Cohn Conjunto	101,82	101,20	5,96	603,15	100,00	12.55	5,96
	-I-IV 1 precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,82	102,28					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,62	132,21					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	0.00427	0,53	0.09	0,02	0,01
		I-IV1 precipitado	7.11	7.16					
	-I-IV 1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7.16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	4,47	515,52	84.76	24.20	5,09
		Cuno filtrado	222,10	225,45	2.53	570,39	93.78	40.77	5,64
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2.40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81	0,0276	8,08	1.33	1.29	0,08
B		Cohn Conjunto	100,80	100,80	6.01	605,81	100,00	12.65	6.01
	-I-IV 1 precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição	131,43	131,56					

		de EtOH							
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,0113	1,40	0,23	0,05	0,01
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
	-I-IV 1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	3,80	400,74	66,15	19,67	3,98
		Cuno filtrado	201,60	203,86	2,64	538,19	88,84	46,74	5,34
	PptG- precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60	0,0200	5,29	0,87	1,25	0,05

ELISA  
IgG neph PPD/PS

**Tabela 28.** Teor de IgA das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

				IgA ELISA					
			peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	1,1187	113,21	100,00	2,36	1,12
	-I-IV 1 precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	0,0027	0,34	0,06	0,01	0,003
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16					
	-I-IV 1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	1,03	118,79	19,53	5,58	1,17
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,41	93,09	15,31	6,65	0,92
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81					
B		Cohn Conjunto	100,80	100,80	1,1187	112,76	100,00	2,36	1,12
	-I-IV 1 precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,0073	0,90	0,15	0,03	0,009
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
	-I-IV 1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	1,03	108,62	17,93	5,33	1,08
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,47	95,00	15,68	8,25	0,94
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60					

**Tabela 29.** Teor de IgM das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

A				IgM ELISA					
			peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
		Cohn Conjunto	101,20	101,20	0,4381	44,34	100,00	0,92	0,44
	I-IV1- precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
I-IV1 após adição de EtOH		131,71	132,30						

		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	0,00014	0,02	0,00	0,00	0,0002
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	0,4042	46,62	7,66	2,19	0,46
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,1506	33,95	5,58	2,43	0,34
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81					
	B	Cohn Conjunto	100,80	100,80	0,4381	44,16	100,00	0,92	0,44
		I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53				
			I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56				
			I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,00029	0,04	0,01	0,0004
			I-IV1 precipitado	6,52	6,55				
		I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55				
			I-IV1 suspensão	104,49	105,46	0,4323	45,59	7,53	2,24
			Cuno filtrado	201,60	203,86	0,1360	27,73	4,58	2,41
		PptG-precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21				
			PptG sobrenadante	261,40	264,60				

[00296] Para caracterizar ainda mais o sistema de fracionamento, o teor de fibrinogênio (Tabela 30), A1PI (Tabela 31), alfa-2-macroglobulina (Tabela 32), albumina (Tabela 33), transferrina (Tabela 34), e C3 (Tabela 35) foram determinadas para várias frações a montante.

**Tabela 30.** Teor em fibrinogênio das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

				Fibrinogênio ELISA					
				peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)
A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	1,698	171,84	100,00	3,57	1,70
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	<0,0001	0,01	0,00	0,00	0,00
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	1,14	131,01	21,54	6,15	1,29
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,03	6,52	1,07	0,47	0,06
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81					
B		Cohn Conjunto	100,80	100,80	1,698	171,16	100,00	3,57	1,70
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,00087	0,11	0,02	0,00	0,00
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
	I-IV1 extração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					

	a.filtração	I-IV1 suspensão	104,49	105,46	1,58	166,52	27,49	8,17	1,65
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,02	4,65	0,77	0,40	0,05
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60					

**Tabela 31.** Teor de alfa-1-antitripsina de frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

				alfa 1 antitripsina ELISA					
		peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma	
A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	1,15	116,38	100,00	2,42	1,15
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	0,0097	1,21	0,20	0,05	0,01
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	0,257	29,64	4,87	1,39	0,29
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,0502	11,32	1,86	0,81	0,11
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81	0,0267	7,82	1,29	1,25	0,08
		Cohn Conjunto	100,80	100,80	1,15	115,92	100,00	2,42	1,15
B	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,0221	2,74	0,45	0,10	0,03
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	0,365	38,49	6,35	1,89	0,38
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,0597	12,17	2,01	1,06	0,12
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60	0,0300	7,94	1,31	1,88	0,08

**Tabela 32.** Teor de alfa-2-macroglobulina das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

				alfa 2 macroglobulina ELISA				
		peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
A	Cohn Conjunto	101,20	101,20	1,08	109,30	100,00	2,27	1,08
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37				
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30				
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	0,00041	0,05	0,01	0,002
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16				
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16				
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	0,945	108,99	17,92	5,12
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,533	120,17	19,76	8,59
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44				



		PptG sobrenadante	288,20	292,81	0,158	46,26	7,61	7,38	0,46
		Cohn Conjunto	100,80	100,80	1,08	108,86	100,00	2,27	1,08
B	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,00105	0,13	0,02	0,005	0,001
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	1,06	111,78	18,45	5,49	1,11
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,559	113,96	18,81	9,90	1,13
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60	0,142	37,57	6,20	8,88	0,37

**Tabela 33.** Teor de albumina das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

					Albumina ELISA				
					mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma
A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	25.1	2.540,12	100,00	52.84	25.10
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	18.5	2.298,33	377,88	92,24	22.71
		I-IV1 precipitado	7.11	7.16					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7.16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	2.33	268,72	44.18	12.61	2.66
		Cuno filtrado	222,10	225,45	1.19	268,29	44.11	19.18	2.65
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2.40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81	0.866	253,57	41.69	40.43	2.51
B		Cohn Conjunto	100,80	100,80	25.1	2.530,08	100,00	52.84	25.10
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	19.9	2.463,72	406,68	91.43	24.44
		I-IV1 precipitado	6,52	6.55					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	6.49	6.55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	1.57	165,57	27.33	8.13	1,64
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,693	141,28	23.32	12.27	1,40
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2.19	2.21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60	0,543	143,68	23.72	33.96	1,43

**Tabela 34.** A transferrina conteúdo das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

				Transferrina ELISA					
			peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)	g/l de plasma

A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	1,95	197,34	100,00	4,11	1,95
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	0,343	42,61	7,01	1,71	0,42
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16					
	I-IV1 uma extração. filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	1,38	159,16	26,17	7,47	1,57
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,655	147,67	24,28	10,56	1,46
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81	0,541	158,41	26,05	25,26	1,57
B		Cohn Conjunto	100,80	100,80	1,95	196,56	100,00	4,11	1,95
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	0,825	102,14	16,86	3,79	1,01
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
	I-IV1 uma extração. filtração	Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	1,13	119,17	19,67	5,85	1,18
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,527	107,44	17,73	9,33	1,07
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60	0,383	101,34	16,73	23,95	1,01

**Tabela 35.** Teor de componentes do complemento 3 (C3) das frações a montante formadas durante o fracionamento do plasma usando um pH baixo (A = 5,4, B = 5,6), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%).

				C3 ELISA					
				peso kg	calc. peso kg	mg/ml	g	%	pureza (%)
A		Cohn Conjunto	101,20	101,20	0,0648	6,56	100,00	0,14	0,06
	I-IV1-precipitação	I-IV1 antes da adição de EtOH	101,91	102,37					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,71	132,30					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	124,23	<0,00006	<0,007	<0,001	<0,0003	<0,0001
		I-IV1 precipitado	7,11	7,16					
	I-IV1 extração a.filtração	Precipitado I-IV1 usado	7,07	7,16					
		I-IV1 suspensão	113,87	115,33	0,673	77,62	12,76	3,64	0,77
		Cuno filtrado	222,10	225,45	0,0476	10,73	1,76	0,77	0,11
	PptG-precipitação	PptG precipitação	2,40	2,44					
		PptG sobrenadante	288,20	292,81					
	B		Cohn Conjunto	100,80	100,80	0,0648	6,53	100,00	0,14
I-IV1-precipitação		I-IV1 antes da adição de EtOH	101,43	101,53					
		I-IV1 após adição de EtOH	131,43	131,56					
		I-IV1 sobrenadante	123,40	123,81	<0,00006	<0,007	<0,001	<0,0003	<0,0001
		I-IV1 precipitado	6,52	6,55					
I-IV1 extração a.filtração		Precipitado I-IV1 usado	6,49	6,55					
		I-IV1 suspensão	104,49	105,46	0,570	60,11	9,92	2,95	0,60
		Cuno filtrado	201,60	203,86	0,0487	9,93	1,64	0,86	0,10
PptG-precipitação		PptG precipitação	2,19	2,21					
		PptG sobrenadante	261,40	264,60					

Exemplo 8 - P03510NG2 e P03610NG2

[00298] Os teores de IgG de cada etapa a jusante das purificações foram determinados e os resultados são fornecidos na Tabela 22 e Tabela 23. Em comparação com o rendimento médio de IgG específica para o processo de fabricação GAMMAGARD LIQUID (3,7 g de IgG/L de plasma de origem), a purificação métodos utilizados neste exemplo resulta em rendimentos significativamente maiores de 4,72 g de IgG e 4,67 g de IgG por plasma de origem L. Isto representa um aumento superior a 25% no rendimento de IgG. Caracterização bioquímica das composições de IgG finais são apresentados na Tabela 38 e Tabela 39. Como pode ser visto nas tabelas, as composições finais de IgG têm mais do que 99% de pureza e o teor de monômero/dímero IgG é superior a 99,8%. O recipiente final contém apenas vestígios de impurezas, cujos níveis estão dentro de padrões regulatórios.

**Tabela 36.** Teor de IgG das frações a montante formadas durante o fracionamento de plasma, utilizando um pH inicial baixo (5,4), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%) e concentração de carga de troca aniônica de 157 mg/ml de resina ANX (P03510NG2).

[illegible]

PptG Suspensão	10/2	9,63	9,63	683,69	46,4	446,62	100	65,3	5,37	
PptG filtrado	10/6	18,80	19,15	646,26	25	482,54	108,04	74,7	5,81	
PptG verd filtrado.	10/7	31,46	32,24	643,35	14,8	477,17	106,84	74,2	5,74	100,00
CM Sepharose										
D	12/12 A	36,40	47,57	73,2	0,188	8,942	2,002	12,212	0,108	1,87
W	12/12 B	109,60	143,22	3,72	<0,0712					0,00
VL	12/12 C	2,41	3,15	0,00	<0,0712					0,00
Euate	12/12 D	13,40	17,51	532,56	23,1	404,49	90,57	76,0	4,87	84,77
NL	12/12 E	1,41	1,84	2,36	0,544	0,999	0,22	42,3	0,012	0,21
NaCl 2M	12/12 F	14,81	19,35	10,44	0,196	3,79	0,85	36,3	0,046	0,79
Sum							93,64		5,03	87,65
Diluído Euate	12/13	4,3377	34,55	535,67	11,6	400,83	89,75	74,8	4,82	100,00
ANX- Sepharose										
D/N	13/6 A	15,60	41,90	373,70	9,73	407,64	91,27	109,1	4,91	101,70
NaCl 2M	13/6 B	3,76	10,10	120,56	3,32	33,54	7,51	27,8	0,40	8,37
Sum							98,78		5,31	110,07
VR06 filtrado	14/2	17,15	46,30	373,66						
Asahi 35 nm filtrado	14/5	18,82	50,84	371,10	8,19	416,35	93,22	112,2	5,01	103,87
UF/DF										
UF/DF Concentrate	15/14 A	1,02	2,74	391,05	133	364,39	81,59	93,2	4,39	89,39
Pós-Wash 1	15/14 B	0,74	2,00	6,94	3,53	7,08	1,58	102,0	0,09	1,74
Sum										100% de UF/DF
Granel	16/1	1,38	3,85	375,89	96,5	371,96	83,28	98,95	4,48	102,08
EB	19/1	1,21	3,81	378,80	103	392,60	87,90	103,64	4,72	107,74

**Tabela 37.** Teor de IgG das frações a montante formadas durante o fracionamento de plasma, utilizando um pH inicial baixo (5,4), estágio inicial de precipitação elevada de álcool (25%) e uma concentração de carga de troca aniônica de 106 mg/ml de resina ANX (P03610NG2).

		IgG								
Amostra		Peso (Kg)	Corr.Peso (kg) corr.	Proteína (G)	mg/ml	g	Rendimento (%)	Pureza (%)	g/l de plasma	Rendimento% Estágio
PptG Suspensão e Filtração										
PptG Suspensão	10/2	9,63	9,63	683,69	46,4	446,62	100	65,3	5,37	
PptG filtrado	10/6	18,80	19,15	646,26	25	482,54	108,04	74,7	5,81	
PptG verd filtrado.	10/7	31,46	32,24	643,35	14,8	477,17	106,84	74,2	5,74	100,00
CM Sepharose										
D	12/12 A	36,40	47,57	73,2	0,188	8,942	2,002	12,212	0,108	1,87
W	12/12 B	109,60	143,22	3,72	<0,0712					0,00
VL	12/12 C	2,41	3,15	0,00	<0,0712					0,00
Euate	12/12 D	13,40	17,51	532,56	23,1	404,49	90,57	76,0	4,87	84,77
NL	12/12 E	1,41	1,84	2,36	0,544	0,999	0,22	42,3	0,012	0,21
NaCl 2M	12/12 F	14,81	19,35	10,44	0,196	3,79	0,85	36,3	0,046	0,79

		IgG								
Amostra		Peso (Kg)	Corr.Peso (kg) corr.	Proteína (G)	mg/ml	g	Rendimento (%)	Pureza (%)	g/l de plasma	Rendimento% Estágio
Sum							93,64		5,03	87,65
Diluído Eluate	12/13	4,3377	34,55	535,67	11,6	400,83	89,75	74,8	4,82	100,00
ANX-Sephrose										
D/N	13/6 A	11,80	46,90	384,12	8,46	396,78	88,84	103,3	4,77	98,99
NaCl 2M	13/6 B	3,72	14,79	123,43	2,23	32,98	7,38	26,7	0,40	8,23
Sum							96,23		5,17	107,22
VR06 filtrado	14/2	12,88	51,53	381,83						
Asahi 35 nm filtrado	14/5	14,10	56,47	378,34	6,93	391,33	87,62	103,4	4,71	97,63
UF/DF										
UF/DF Concentrate	15/14A	0,69	2,77	385,58	125	346,49	77,58	89,9	4,17	87,33
Pós-Wash 1	15/14B	0,78	3,12	9,96	3,4	10,62	2,38	106,6	0,13	2,68
Sum										100% de UF/DF
Granel	16/1	0,89	3,73	376,90	93,8	350,10	78,39	92,89	4,21	101,04
EB	19/1	0,89	3,73	376,90	104	388,17	86,91	102,99	4,67	112,03

**Tabela 38.** Caracterização bioquímica da composição final de IgG enriquecida a partir de crio-sobrenadante utilizando um pH inicial baixo (5,4), estágio de precipitação inicial de álcool elevado (25%) e concentração de carga de troca aniônica de 157 mg/ml de resina ANX (P03510NG2).

Teste	Unidade	Resultado
Proteína Total - Kjeldahl	mg/ml	100,5061
Pureza (CAE)	Albumina%	0
	$\alpha/b$ % globulina	0
	$\gamma$ -globulina%	100
	denat. Proteína%	0
Distribuição de tamanho molecular	Monômero [%]	93,1042
	Dímero [%]	6,7664
	Polímero [%]	0,0499
	Fragmentos [%]	0,0795
IgG neph	g/l	92,4
IgA (ELISA)	mg/ml	0,07
IgM (ELISA)	mg/dl	<0,95
Fibrinogênio (ELISA)	ug/ml	<0,17
Plasminogênio (ELISA)	ug/ml	0,32
C3 complemento	mg/dl	<19,4
Teste	Subclassgroup	Resultado [Mg/ml]
IgG-subclasse distribuição	IgG1 (mg/ml)	54,4779
	IgG2 (mg/ml)	33,6428
	IgG3 (mg/ml)	6,3377
	IgG4 (mg/ml)	1,9745

Teste	Unidade	Resultado
Teste	Unidade	Resultado
IgG Fc Hemaggl Função.	%	84
Atividade amidolítica (PL-1)	nmol/ml min	14,8
		1,37
Anticomple. Atividade	%	35
PKA	% Muito ref 3	0,741
	UI/ml	0,6
		1,700
		2,036
		<4
NAPTT	mg	> 10
Aparência		Satisfatório
pH		4,7
Fator XI	mUI/mL	0,15
SN13a	mU/ml	21,9
Teste de produção de trombina		142,23
A osmolaridade	mOsmol/kg	259
Densidade	g/cm3	1,0326
Fator do complemento I	ug/ml	107
Amidolítico perfil atividade	S-2288	26,9
	S-2266	18,8
	S-2222	<5
	S-2251	<5
	S-2302	55,2
<b>Reagentes SD</b>		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	<0,1
Polissorbato 80	ppm	<26
Tri (n-butil) fosfato	ppm	<0,2
Teste	Unidade	Resultado
Anticorpos		
Anti D Anticorpos		Satisfatório
Anti A & ANTIB Hemaglutininas	Anti A	8
	Anti B	8

**Tabela 39.** Caracterização bioquímica da composição final de IgG enriquecida a partir de crio-sobrenadante utilizando um pH inicial baixo (5,4), estágio de precipitação inicial de álcool elevado (25%) e uma concentração de carga de troca aniônica de 106 mg/ml de resina ANX (P03610NG2).

Teste	Unidade	Resultado
Proteína Total - Kjeldahl	mg/ml	103,5231
Pureza (CAE)	Albumina%	0
	$\alpha/b$ % globulina	0
	$\gamma$ -globulina%	100
	denat. Proteína%	0
Distribuição de tamanho molecular	Monômero [%]	92,9679
	Dímero [%]	6,9018
	Polímero [%]	0,0526

Teste	Unidade	Resultado
	Fragmentos [%]	0,0778
IgG neph	g/l	95
IgA (ELISA)	mg/ml	0,07
IgM (ELISA)	mg/dl	<0,95
Fibrinogênio (ELISA)	ug/ml	0,20
Plasminogênio (ELISA)	ug/ml	0,29
C3 complemento	mg/dl	<19,4
Teste	Subclassgroup	Resultado [Mg/ml]
IgG-subclasse distribuição	IgG1 (mg/ml)	59,3788
	IgG2 (mg/ml)	34,8724
	IgG3 (mg/ml)	6,7758
	IgG4 (mg/ml)	2,1446
Teste	Unidade	Resultado
IgG Fc Hemaggl Função.	%	101
Atividade amidolítica (PL-1)	nmol/ml min	<10
		0,951
Anticomple. Atividade	%	39
PKA	% Muito ref 3	<1
	UI/ml	0
		<4
NAPTT	mg	> 10
Aparência		Satisfatório
pH		4,7
Fator XI	mUI/mL	0,06
SN13a	mU/ml	14,9
Teste de produção de trombina		123,96
A osmolaridade	mOsmol/kg	260
Densidade	g/cm3	1,0333
Fator do complemento I	ug/ml	80,0
Amidolítico perfil atividade	S-2288	20,3
	S-2266	17,2
	S-2222	<5
	S-2251	<5
	S-2302	38,9
Reagentes SD		
Octoxynol 9 (Triton X100)	ppm	<0,1
Polissorbato 80	ppm	<26
Tri (n-butil) fosfato	ppm	<0,2
Teste	Unidade	Resultado
Anticorpos		
Anti D Anticorpos		Satisfatório
Anti A & ANTIB Hemaglutininas	Anti A	16
	Anti B	8

*Exemplo 9 - Caracterização Adicional de produtos de fracionamento*

[00299] O rendimento de imunoglobulina G e pureza obtida utilizando os métodos de purificação que incluem um baixo pH inicial, precipitação de

álcool elevado foram comparados aos obtidos utilizando precipitação tradicional Cohn I e II + III precipitação intermediários.

[00300] O rendimento e a pureza de três purificações IgG de grande escala utilizando um baixo pH inicial, precipitação com álcool elevado - lote 3010, tal como descrito no Exemplo 5 ("P03010NG2"); lote 3610, tal como descrito no Exemplo 8 ("P03610NG2"); e um terceiro lote 1111, preparado de forma semelhante aos lotes 3010 e 3610, foi comparado com o rendimento médio para LIQUID GAMMAGARD (10% Infusão de Imunoglobulina (Humana), Baxter International) preparado em uma única unidade de produção em 2010 O processo de purificação LIQUID GAMMAGARD foi substancialmente semelhante aos processos utilizados para preparar lotes 3010, 3610 e 1111, com exceção de que o processo GAMMAGARD LIQUID prosseguiu através Cohn Fração I e Cohn Fração II + III intermediários, ao invés de um baixo pH inicial, precipitação elevada de álcool. A caracterização dos produtos G precipitado que se formou durante a preparação dos lotes experimentais e médios para GAMMAGARD LIQUID é mostrado na Tabela 40.

**Tabela 40.** Caracterização bioquímica do precipitado G (PPT G) intermediário formado durante a preparação de lotes experimentais de IgG 3010, 3610 e 1111, procedendo através de um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevada de álcool, com média de preparação GAMMAGARD LIQUID como uma única produção planta no ano de 2010, tramitava Cohn Fração I e II + III etapas de precipitação.

Número de lote		3010	3610	1111	GAMMAGARD LIQUID
IgG em Cohn Conjunto	g/L de plasma (PPD/PS-teste)	5,26	6,01	6,91	5,82 (médio)
Caracterização do G precipitado					
IgG	g/L de plasma (PPD/PS-teste)	4,99	5,81	6,14	82,9 (Méd)
IgG	% De Cohn Conjunto	94,9	96,6	88,9	82,9
C3	% De proteínas	0,4	1,8	1,5	0,1-0,6 (média = 0,2)
Fibrinogênio	% De proteínas	0,12	0,68	1,02	0,01 - 1,0 (média = 0,13)

[00301] Como pode ser visto na Tabela 40, a utilização de um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool resultou num aumento



significativo na recuperação de IgG no precipitado G estágio intermédio, em comparação com o método de purificação GAMMAGARD LIQUID processo através Fração Cohn I e II + III etapa de precipitações (recuperação IgG 88,9-96,6% para alta de álcool inicial, baixo etapa de precipitação pH versus 82,9% para Cohn Fração I e II + III etapas de precipitação).

[00302] Os intermediários G precipitados de IgG formados em lotes experimentais 3010, 3610, 1111 tem pureza um pouco menor do que a média de intermediário G precipitado de GAMMAGARD LIQUID, tal como evidenciado pelos níveis mais elevados de componentes do complemento 3 (C3) e fibrinogênio, embora o teor de fibrinogênio destes intermediários esteja ainda dentro da gama de valores observados para a fabricação de GAMMAGARD LIQUID. No entanto, quando os lotes experimentais foram adicionalmente processados como descrito acima, o produto final de IgG reunidas todas as características de fabricação testada, como mostrado na Tabela 41.

**Tabela 41.** Caracterização bioquímica das composições finais de IgG humanos reunidos para lotes experimentais 3010, 3610, e 1111, procedendo através de um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool.

Número do lote	Lote	3010	3610	1111
Proteína	g/L de plasma	4,45	4,54	4,82
IgA	%	0,05	0,07	0,04
IgM	mg/dL	<1,6	<1,6	<1,6
Fibrinogênio	ug/ml	<0,17	0,2	<0,17
C3	mg/mL	<0,194	<0,194	<0,194
Função Fc	%	109	101	78
HP-SEC	% monômeros e dímeros	99,8	99,4	99,8
CAE	% G-globulina	100	100	100
ACA	%	38	39	46
PKA	UI/mL	1	0	1
PL-1	nmol/ml min (QC)	<10	<10	<10
NAPTT	mg	> 10	> 10	> 10
TGA	% Do controle plasma normal com 5%	123	124	112
Específico F-XI	mU/mL	<0,04	0,06	<0,2

*Exemplo 10 - Caracterização da albumina Composições*

[00303] Para validar ainda que os novos processos de fabricação de imunoglobulina G aqui descrita (por exemplo, aqueles de prosseguir através de um baixo pH inicial, etapa de precipitação elevado de álcool) pode suportar a produção de proteína do plasma subprodutos, albumina foi purificada a partir de um valor de pH baixo, o sobrenadante alcoólico elevado.

[00304] Os métodos para purificação de albumina a partir de IV-4 sobrenadantes Fração Cohn IV-1 são bem conhecidos na técnica. Tipicamente, os sobrenadantes da Fração Cohn IV-1 e IV-4 são formadas por um processo que procede através de precipitações álcool estágios intermédios, tais como Fração Cohn I e Fração Cohn II + III precipitações. No presente Exemplo, a albumina foi preparada de acordo com métodos padrão, com exceção de que o sobrenadante de um baixo pH inicial, precipitação de álcool elevado foi utilizado no lugar de uma Fração IV-1 de sobrenadante. Como mostrado na Tabela 42, a purificação a partir de um pH baixo, sobrenadante elevado de álcool resultou num elevado rendimento de albumina (18,92 g/L de plasma), que cumpriram os requisitos de controle de qualidade testados.

**Tabela 42.** Caracterização bioquímica de uma composição preparada a partir de albumina de um pH baixo, em grande escala, sobrenadante elevado de álcool a precipitação, como descrito acima.

Teste	Unidade	AUF00111NG2 Recipiente final
Produção de proteína	g/L de plasma	18,92
Albumina (CAE)	(%)	97,3
	(%), Após 2 semanas a 30°C	97,8
HPLC	(% monômeros)	98,1
Citrato	mol/mL	<0,05
PKA	IE/mL	<4
A inspeção visual	Os frascos rejeitados (por exemplo, devido às partículas)	Nenhum

[00305] Entende-se que os exemplos e modalidades aqui descritos são apenas para fins ilustrativos e que várias modificações ou alterações à luz dos mesmos serão sugeridas aos versados na técnica e são para ser incluídas dentro do espírito e âmbito deste pedido e do âmbito das reivindicações anexas. Todas as publicações, patentes e pedidos de patente aqui citados são

incorporados por referência na sua totalidade para todos os fins.

### REIVINDICAÇÕES

1. Método para a fabricação de uma composição de imunoglobulina IgG enriquecida a partir de um agrupamento de Cohn, o método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a) coprecipitação de imunoglobulina IgG e alfa-1-antitripsina (A1PI) a partir de um agrupamento de Cohn, em uma primeira etapa de precipitação, pela adição de etanol ao agrupamento de Cohn em uma concentração final de 20% a 30% (v/v) em um pH de 5,0 a 6,0, para formar um primeiro precipitado e um primeiro sobrenadante;

(b) solubilização de imunoglobulina IgG no primeiro precipitado, para formar uma primeira suspensão tendo uma porção solúvel compreendendo imunoglobulina IgG e uma porção insolúvel compreendendo A1PI;

(c) separação da porção solúvel da primeira suspensão da porção insolúvel da primeira suspensão; e

(d) recuperação da fração solúvel da primeira suspensão, formando, assim, uma composição de imunoglobulina IgG enriquecida.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que:

(a) a concentração final de etanol é de  $25 \pm 4\%$ ;

(b) a concentração final de etanol é de  $25 \pm 3\%$ ;

(c) a concentração final de etanol é de  $25 \pm 2\%$ ; ou

(d) a concentração final de etanol é de  $25 \pm 1\%$ .

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a concentração final de etanol é de 25%.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, caracterizado pelo fato de que:

(a) o pH é  $5,5 \pm 0,4$ ;

(b) o pH é  $5,5 \pm 0,3$ ;

(c) o pH é  $5,5 \pm 0,2$ ; ou

(d) o pH é  $5,5 \pm 0,1$ .

5. Método de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o pH é 5,5.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a primeira etapa de precipitação é realizada a uma temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  a  $-9^{\circ}\text{C}$ .

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a primeira suspensão tem um pH de 4,7 a 5,1.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a primeira suspensão tem uma condutividade de 0,5 mS/cm a 2 mS/cm.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, caracterizado pelo fato de que a separação da porção solúvel da primeira suspensão da porção insolúvel da primeira suspensão compreende:

(i) a mistura de dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) finamente dividido com a primeira suspensão, em que o dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) finamente dividido tem uma área de superfície média de  $350 \text{ m}^2/\text{g}$  a  $410 \text{ m}^2/\text{g}$ ; e

(ii) a separação do  $\text{SiO}_2$  da suspensão.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 9, caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de:

(a) precipitação de imunoglobulinas a partir um agrupamento de Cohn, em uma primeira etapa de precipitação, com entre 24% e 26% de álcool a um pH de entre 5,3 e 5,7 e temperatura entre  $-6^{\circ}\text{C}$  e  $-8^{\circ}\text{C}$  para formar um primeiro precipitado e um primeiro sobrenadante;

(b) suspensão do primeiro precipitado para formar uma primeira suspensão;

(c) tratamento da primeira suspensão com dióxido de silício

(SiO<sub>2</sub>) finamente dividido;

(d) separação da fração solúvel da primeira suspensão da fração insolúvel da primeira suspensão; e

(e) recuperação da fração solúvel da primeira suspensão, formando, assim, uma composição de imunoglobulina enriquecida.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o método compreende ainda as etapas de:

(f) precipitação de imunoglobulinas da fração solúvel da primeira suspensão, em uma segunda etapa de precipitação, para obter um segundo precipitado e um segundo sobrenadante, em que a segunda etapa de precipitação compreende a adição de etanol à fração solúvel da primeira suspensão para alcançar uma concentração final entre 22% e 28% de etanol a um pH entre 6,5 e 7,5;

(g) suspensão do segundo precipitado para formar uma segunda suspensão; e

(h) recuperação da fração solúvel da segunda suspensão, formando assim uma composição de imunoglobulina adicionalmente enriquecida.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 11, caracterizado pelo fato de que:

(a) o método produz pelo menos 4g de IgG por L de agrupamento de Cohn usado na etapa (a);

(b) o método produz pelo menos 4,25g de IgG por L de agrupamento de Cohn usado na etapa (a); ou

(c) o método produz pelo menos 4,5g de IgG por L de agrupamento de Cohn usado na etapa (a).

13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 12, caracterizado pelo fato de que alfa-1-antitripsina (A1PI) é

adicionalmente purificada a partir de uma fração insolúvel da primeira suspensão.

14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizado pelo fato de que albumina é adicionalmente purificada a partir do primeiro sobrenadante.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o agrupamento de Cohn é plasma pobre em crio.

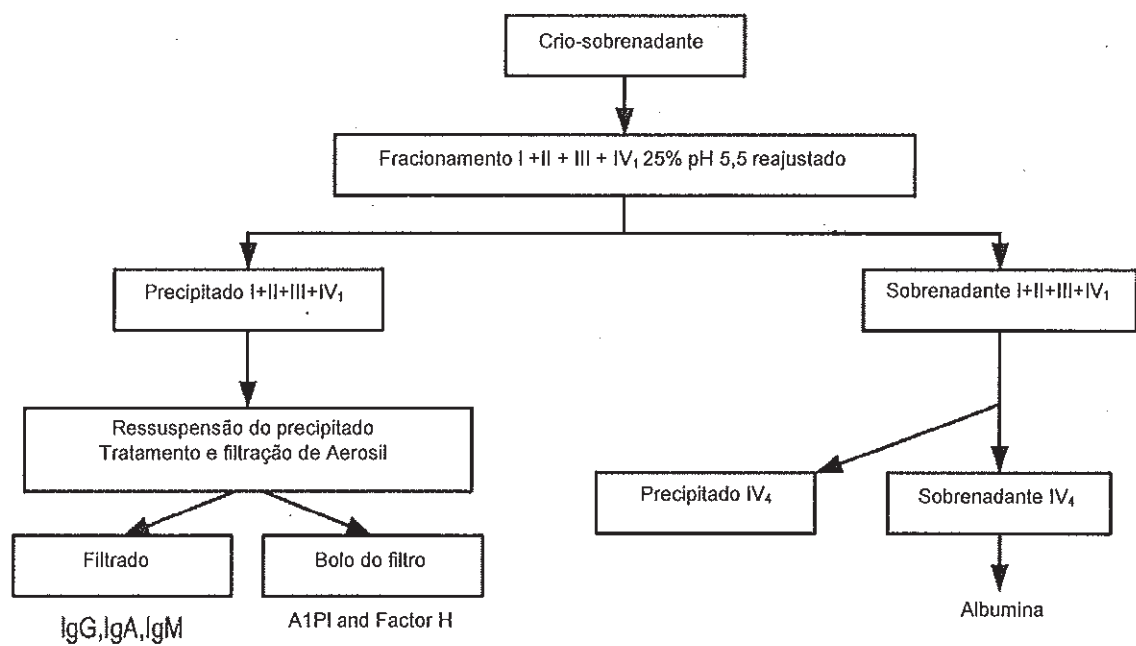


FIG. 1