



(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(21) A bejelentés ügyszáma: P 92 00925

(22) A bejelentés napja: 1992. 03. 20.

(30) Elsőbbségi adatok:

0651/91 1991. 03. 25. AT

(40) A közzététel napja: 1992. 11. 30.

(45) A megadás meghirdetésének a dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1997. 12. 29.

(11) Lajstromszám:

214 059 B

(51) Int. Cl.⁶

C 07 K 16/06

A 61 K 39/395

(72) Feltalálók:

dr. Eibl, Johann, Bécs (AT)

dr. Eibl, Martha, Bécs (AT)

dr. Linnau, Yendra, Bécs (AT)

(73) Szabadalmas:

IMMUNO AG., Bécs (AT)

(74) Képviselő:

Gödölle, Kékes, Mészáros & Szabó Szabadalmi és
Védjegy Iroda, Budapest

(54) **Eljárás immunglobulin A-t, immunglobulin G-t és transferrint tartalmazó
gyógyászati készítmény és a hatóanyag előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány szerinti eljárással plazmaprotein alapú, megnövelt mikroba ellenes, gyulladás ellenes és allergia ellenes hatású gyógyászati készítményt állítanak elő oly módon, hogy IgA-t és annak 1 tömegrész mennyiségére számítva 0,40–0,80 tömegrész IgG-t és 0,15–0,45 tömegrész transferrint – kívánt esetben az esetlegesen jelenlévő fertőző anyagok inaktiválása és/vagy eltávolítása után – egy vagy több ismert gyógyászati segéd- és/vagy adalékanyaggal összekevernek és gyógyászati készítménnyé elkészítik.

A találmány tárgya továbbá új eljárás a készítmény hatóanyagainak az előállítására oly módon, hogy egy IgA-t, IgG-t és transferrint tartalmazó plazmafrakciót vagy plazmát – kívánt esetben az esetlegesen jelenlévő fertőző anyagok inaktiválása és/vagy eltávolítása után – anioncserélővel hoznak érintkezésbe, az adszorbeált IgA-t, IgG-t és transferrint ismert módon mossák és eluálják, az eluátumot a nem kívánt kísérő proteinektől elválasztják, a kapott, tisztított IgA, IgG és transferrin tartalmú oldatból az IgA-t, IgG-t és transferrint kicsapják, a kicsapott IgA-t, IgG-t és transferrint elválasztják, liofilizálják, majd a fertőző anyagokat inaktiválják.

A találmány tárgya eljárás plazmaprotein alapú megnövelt mikroba ellenes, gyulladás ellenes és allergia ellenes hatású és széles hatásspektrumú gyógyászati készítmény és a hatóanyag előállítására.

Immunglobulinokon alapuló gyógyászati készítményeket eddig is alkalmaztak bakteriális és vírusos fertőzések megelőzésére és kezelésére. Így például az US 4 35 099 számú szabadalmi leírás olyan szájon át alkalmazható készítményt ismertet, amely immunglobulin A-t (IgA-t) és immunglobulin G-t (IgG-t) tartalmaz és bélfertőzések kezelésére alkalmas. Ismeretes továbbá, hogy egy olyan immunglobulin készítmény, amelyben az össz-globulin 73%-a IgI, 26%-a IgA, koraszülötteken profilaktikusan alkalmazva képes arra, hogy csökkentse a nekrotizáló enterocolitis-ben való megbetegedés veszélyét [Eibl, Martha M. és társai: *New Journal of Medicine*, 319, 1-7. (1988.)].

Azt is kimutatták, hogy a szérumban lévő sziderofilin (transzferrin) vastelítettségétől függ [Schade, Arthur L., *Protides Biolog. Fluids, Proc. Colloq.*, 8., 261/263. (1961)]. Vassal dúsított szérummintát vizsgáltak, amely 1 tömegrész IgA-ra 15 tömegrész IgG-t és 2,6 tömegrész transzferrint tartalmazott, és azt találták, hogy a minta csak kevés kórokozóra hat.

Az összes ismert IgA tartalmú gyógyászati készítménynek viszonylag kicsi a hatásspektruma.

A találmány feladata, hogy olyan antimikrobiális hatású, plazmaprotein alapú gyógyászati készítményt biztosítson, amely széles hatásspektrummal rendelkezik. Ezenkívül e készítménynek gyulladás ellenes és allergia ellenes hatással kell rendelkeznie.

Azt tapasztaltuk, hogy egy IgA és IgG tartalmú készítménynek nemcsak a bakteriális és vírusos kórokozókkal szembeni hatásának erősségét, hanem a hatásspektrumát is meg lehet növelni, ha transzferrint is tartalmaz, és ha a három komponenst, az IgA-t, IgG-t és transzferrint a találmány szerinti tömegarányban tartalmazza. Ezek az arányok az anyatejben és a kolosztrumban lévő arányokhoz hasonlóak.

A találmány szerinti készítményt az jellemzi, hogy 1 tömegrész immunglobulin A-ra (IgA-ra) vonatkoztatva 0,40-0,80 tömegrész immunglobulin G-t (IgG-t) és 0,15-0,45 tömegrész transzferrint tartalmaz.

A találmány szerinti készítményben az IgA előnyösen olyan formában van jelen, amely az úgynevezett „szekretoros IgA”-t (secretory piece, Mestecky és McGhee, *Advances in Immunology*, 40. kötet, 156-157. oldal, 1987.) tartalmazza. Ez a protein képessé teszi az IgA-t arra, hogy a nyálkahártyán áthatoljon.

A találmány szerinti készítmény egy előnyös kiviteli alakját az jellemzi, hogy az alkalmazandó oldat milliliterenként 10-100 mg IgA-t, 4-80 mg IgG-t és 1,4-45 mg transzferrint tartalmaz.

A találmány szerinti gyógyászati készítmény előállítása során előnyösen úgy járunk el, hogy a komponensek összekeverése előtt egy vagy több inaktíváló lépést hajtunk végre, ahol ezekben a lépésekben a fertőző anyagokat, különösen a vírusokat inaktíváljuk, illetve eltávolít-

juk. Fertőző anyagokon vírusokat, baktériumokat, vírusidokat, gombákat stb. értünk, ezeket ismert módon, így kicsapással vagy szűréssel inaktíválhatjuk, illetve távolíthatjuk el.

A találmány szerinti készítmény különösen a nyálkahártya fertőzések, főként a nekrotizáló enterocolitis, gyulladások, valamint allergiák megelőzésére és gyógyítására alkalmas. Helyettesítheti ezenkívül az anyatejet a humorális immunitás átadásának funkciójában.

A találmány tárgyát képező eljárással tehát megnövelt mikroba ellenes, gyulladás ellenes és allergia ellenes hatású és széles hatásspektrumú gyógyászati készítményt állítunk elő oly módon, hogy hatóanyagként immunglobulin A-t (IgA) és annak egy tömegrész mennyiségére számítva 0,40-0,80 tömegrész IgG-t és 0,15-0,45 tömegrész transzferrint, ahol az említett komponenseket ismert módon vagy a találmány szerinti új eljárással állítottuk elő, mimellett az utóbbi esetben az egyes komponensek mennyiségét szükség esetén kiegészítettük – kívánt esetben az esetlegesen jelenlévő fertőző anyagok inaktíválására és/vagy eltávolítására szolgáló kezelés után – egy vagy több ismert gyógyászati segéd- és/vagy adalékanyaggal összekeverünk és gyógyászati készítménnyé elkészítünk.

A találmány szerinti készítményhez, amint említettük, felhasználható a kereskedelemben kapható IgA és IgG és a szintén kereskedelmi IgA/IgG keveréket tartalmazó készítmény. Az IgA előállítását az US 4 335 099 számú szabadalmi leírás, az IgG előállítását az EP 0 122 909 számú szabadalmi leírás ismerteti. A transzferrint a *Ann. Rev. Biochem.*, 49., 357. (1980) irodalmi helyen írták le és a Sigma Chemia GmbH gyártja és forgalmazza.

A találmány a készítményen kívül új, egyszerű és gazdaságos eljárást is nyújt az IgA, IgG és transzferrin együttes előállítására.

A találmány szerinti eljárás értelmében úgy járunk el, hogy

egy IgA-t, IgG-t és transzferrint tartalmazó plazmafrakciót vagy plazmát – kívánt esetben az esetlegesen jelenlévő fertőző anyagok inaktíválására és/vagy eltávolítására szolgáló kezelés után – anioncserélővel hozunk érintkezésbe és így az IgA-t, IgG-t és transzferrint adszorbeáljuk,

az ioncserélőn adszorbeált IgA-t, IgG-t és transzferrint ismert módon mossuk és eluáljuk,

az eluátumot ismert módon kicsapással tisztítva a nem kívánt kísérő proteinektől elválasztjuk, így tisztított IgA, IgG és transzferrin tartalmú oldatot kapunk,

az oldatot protein kicsapószerrel kezelve az IgA-t, IgG-t és transzferrint kicsapjuk,

a kicsapott IgA-t, IgG-t és transzferrint elválasztjuk, – kívánt esetben az elválasztott IgA-, IgG- és transzferrin-tartalmú csapadékok egyesítése után – liofilizáljuk, majd a fertőző anyagok inaktíválása céljából kezeljük. A kapott terméket ismert módon orálisan, parenterálisan vagy helyileg alkalmazható gyógyászati készítménnyé dolgozzuk fel.

Kitűnt, hogy az említett előállítási lépések folyamán a kiindulási anyagban esetleg jelenlévő fertőző anyagok,

például vírusok titere csökken. Ez a hatás különösen akkor kifejezett, ha a találmány szerinti készítmény hatóanyagait az alábbiak szerint állítjuk elő:

a plazmát vagy a plazmafrakciókat Cohn-eljárással etanollal kezeljük és elválasztjuk a Cohn II+III frakciót, az elválasztott Cohn II+III frakciót vizes pufferrel, 5,0 és 6,5 közötti pH-értéken digérálva IgA, IgG és transzferrin tartalmú protein elegyet extrahálunk,

az extrahált protein elegyhez etanolt adva kicsapjuk a nem kívánt kísérő proteineket,

a kicsapott kísérő proteineket elválasztjuk,

a kapott, IgA, IgG és transzferrin tartalmú oldatot DEAE-ioncserélőre visszük,

az adszorbeált IgA-t, IgG-t és transzferrint mossuk és nátrium-klorid oldattal eluáljuk,

a kapott eluátumot kívánt esetben tisztítjuk, majd etanollal kezeljük és az IgA-t és IgG-t kicsapjuk,

a kicsapott IgA-t és IgG-t elválasztjuk, így IgA és IgG tartalmú csapadékot és transzferrin tartalmú felülúszót kapunk,

a felülúszót megsavanyítjuk és az így kicsapott transzferrint elválasztjuk,

az elválasztott, IgA-, IgG- és transzferrin-tartalmú csapadékokat egyesítjük és kívánt esetben a fertőző anyagokat inaktíváljuk. A terméket gyógyászati készítménnyé alakíthatjuk.

A plazmafrakciókat a Cohn, Chemical Reviews, 28., (1941.) 395–417. irodalmi helyen leírt módon állítjuk elő. A kromatográfiás tisztítást a DE 39 27 111 számú szabadalmi leírásban részletesen ismertetett módon végezzük.

Amennyiben a kiindulási anyagban esetleg fertőző anyag van jelen, a találmány szerinti eljárás ezen változatával legalább 29 logaritmus egységet jelentő titercsökkenést érünk el.

Az alábbiakban a találmány szerinti készítmény előállítását és hatékonyságát részletesen ismertetjük, anélkül azonban, hogy ezzel a találmány oltalmi körét korlátoznánk.

Előállítás

1. példa

100 liter lefagyasztott humán plazmát felolvasztunk, a csapadékot (krioprecipitátum) elválasztjuk és a felülúszóhoz (kriofelülúszó) -2°C -on és 7,0 pH-értéken annyi etanolt adunk, hogy a koncentrációja 8% legyen. A kapott csapadékot elválasztjuk, majd a felülúszó etanol koncentrációját -5°C -on 25%-ra növeljük. Az ekkor keletkező csapadékot (Cohn II+III frakció) foszfát-acetát pufferrel extraháljuk, majd -2°C -on 5,3 pH-értéken 12% etanolt adunk hozzá. Az ekkor keletkező csapadékot elválasztjuk. A felülúszót anioncserélővel – ilyen a DEAE-Sephadex anioncserélő – kezeljük 6,0 és 6,5 közötti pH-értéken az IgA, részben az IgG és a transzferrin adszorbeálása céljából. Más proteinek, például az albumin, szintén adszorbeálódnak.

A nem kötött proteineket foszfát-pufferrel, amely literenként 1,12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -t tartalmaz és pH-értéke $6,0 \pm 0,1$, végzett mosással távolítjuk el. Ennek a mosási lépésnek az intenzitásával befolyásolhatjuk a végtermékben az IgA IgG-hez viszonyított arányát. Ez-

után az adszorbeált proteineket foszfáttal pufferolt 3%-os nátrium-klorid oldattal eluáljuk. A kapott oldathoz 6,4–6,5 pH-értéken, -3°C -on 20% etanolt adunk, a kapott csapadékot eldobjuk és a felülúszó etanol koncentrációját 30%-ra növeljük, amikor is az IgA, IgG és transzferrin kicsapódik.

Ezt a csapadékot elválasztjuk, vízben feloldjuk és 6,5 pH-értéken és -5°C -on az oldathoz 25% etanolt adunk. Az ekkor keletkező csapadékot, amely IgA-t, IgG-t tartalmaz, elválasztjuk. A transzferrin oldatban marad és ha az oldat pH-ját 5,5-re állítjuk, kicsapódik.

Ezután a csapadékokban ismert módszerekkel meghatározzuk az IgA, IgG és transzferrin tartalmát, és a megfelelő mennyiségek elegyítésével beállítjuk a találmány szerinti összetételt, amikor is adott esetben az IgA-t, IgG-t és/vagy transzferrint kereskedelmi készítményekkel egészítjük ki és ezenkívül még a gyógyszer-gyártásban alkalmazott adalékanyagokat is hozzáadhatjuk.

Ezután az oldatot liofilizáljuk, vízzel megnedvesítjük és 10 órán át 60°C -on hőkezeljük az esetleges előforduló kórokozók előlése.

Annak érdekében, hogy a liofilizált, hőkezelt port felhasználásra alkalmassá tegyük, vagy nátrium-klorid tartalmú glükóz oldatban oldjuk, sterilre szűrjük és le-töltjük, vagy orális alkalmazáshoz tablettázzuk vagy kapszulákba töltjük, amikor is a tablettákat és kapszulákat gyomornedvnek ellenálló réteggel kell bevonni.

2. példa

10 liter humán plazmához literenként 140 g ammónium-szulfátot adunk, a pH-t 7,2-re állítjuk be. A csapadék elválasztása után az ammónium-szulfát koncentrációt 275 g/literre növeljük. Az ekkor kapott csapadékot 5 mmol/liter acetát pufferrel 5,0 pH-értéken feloldjuk, az oldhatatlan részt elválasztjuk és eldobjuk. A felülúszóból izoláljuk az IgA-t, IgG-t és a transzferrint, majd -5°C -on és 6,6 pH-értéken 30% etanollal való kicsapással koncentráljuk.

A készítmény összetétele az alábbi:

40 IgA	63 mg/ml
IgG	28 mg/ml
transzferrin	10 mg/ml

A vírus titer csökkentése

45 Annak szemléltetésére, hogy a találmány szerinti készítmény előállítása folyamán a kiindulási plazmában esetleg jelenlevő vírusok inaktíválása, illetve eltávolítása megtörténik, az 1. példában leírt eljárás lépéseit megismételtük úgy, hogy az eljárás minden egyes lépése előtt a mintában egy meghatározott vírus titer (HIV) állítottunk be és a titer az illető lépés megvalósítása után meghatároztuk. Az eredményeket az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. lépés: Krioprecipitátum előállítása

55 10 ml humán plazmához hozzáadunk 1 ml HIV-1 vírus szuszpenziót (vírus szuszpenzió I), amely $0,5\text{ ml}$ -enként 10^6 infektiós egységet tartalmaz. A szuszpenziót -20°C -ra lefagyasztjuk és $0 - -2^{\circ}\text{C}$ -on felolvasztjuk. A kapott csapadékot centrifugálással elválasztjuk. A felülúszóban (kriofelülúszó) meghatározott vírus titer

104 infektív egység volt. Az 1. lépésben tehát a vírus titer körülbelül egy tízes alapú kitevővel csökkent.

2. lépés: Frakcionálás 8% etanollal

6 ml kriofelülűszóhoz hozzáadunk 0,6 ml vírus szuszpenzió I-et. Az elegy hőmérsékletét -1°C és -2°C között tartjuk és hozzáadunk 0,6 ml 96%-os etanolt (-20°C), hogy 8%-os etanol koncentrációt kapjunk. A keletkezett csapadékot centrifugálással elválasztjuk. A felülűszóban a vírus koncentráció meghatározása 103 infektív egység/ml értéket adott, amely körülbelül 102 faktornak megfelelő csökkenést jelent.

3. lépés: Az albumin elválasztása az immunglobulinoktól

A 2. lépésben kapott felülűszó 8 ml-éhez hozzáadunk 10^7 infektív egység/0,5 ml tartalmú HIV-1 vírus szuszpenziót (vírus szuszpenzió II). Az elegy hőmérsékletét -5°C -on tartjuk és hozzáadunk 2,1 ml 96%-os etanolt, hogy 25%-os oldatot kapjunk. A keletkezett csapadékot centrifugálással választjuk el. Az 1 ml PBS-ben feloldott csapadékban nem lehetett vírust kimutatni, ami 10^6 faktornak megfelelő csökkenést jelent.

4. lépés: Extrakció és kicsapás 12% etanollal

A 3. lépésben kapott csapadék 1 g-ját 30 ml foszfát-acetát pufferben szuszpendáljuk. A szuszpenzió 10 ml-éhez hozzáadunk 1 ml vírus szuszpenzió I-et. Az elegyhez -22°C hőmérsékleten hozzáadunk 1,6 ml 96%-os etanolt, így a végkoncentráció 12%-os lesz. A felülűszóban nem tudtunk vírust kimutatni, ami 10^5 faktornak megfelelő csökkenést jelent.

5. lépés: Adsorpció, mosás, eluálás

A 4. lépésben kapott felülűszó 10 ml-éhez DEAE-Sephadex ioncserélőt adunk 500 mg/g protein mennyiségben és 1 ml vírus szuszpenzió II-t. Az elegyet -2°C -on keverjük és az adszorbeált anyagot elválasztjuk. A Sephadex-et mossuk, majd a proteinek eluáljuk. A mért vírus titer 10^3 infektív egység/ml, ez 10^3 faktornak megfelelő csökkenést jelent.

6. lépés: Kicsapás 20% etanollal

Az 5. lépésben kapott eluátum 5 ml-éhez hozzáadunk 0,5 ml vírus szuszpenzió II-t és 1,45 ml 96%-os etanolt. Az elegyet -2°C -on keverjük és a csapadékot centrifugáljuk. A felülűszóban nem lehetett vírust kimutatni (csökkenés: 10^6).

7. lépés: Kicsapás 30% etanollal

A 6. lépésben kapott felülűszó 5 ml-éhez hozzáadunk 0,5 ml vírus szuszpenzió II-t és 0,83 ml etanolt. Az elegyet -5°C hőmérsékleten keverjük, majd lecentrifugáljuk. A csapadékot 1 ml pufferben feloldjuk. Az oldatban nem lehetett vírust kimutatni (csökkenés: 10^6).

A teljes vírus titer csökkenés (az eljárás 1–7. lépéseinek az összege) legalább 10^{29} értéket tesz ki (lásd az 1. táblázatot).

1. táblázat
Vírus titer csökkenés

Az eljárás lépései	Vírus titer (infektív egység/ml)		csökkenés
	a lépés előtt	után	
1.	10^5	10^4	10^1
2.	10^5	10^3	10^2
3.	10^6	0	10^6
4.	10^5	0	$>10^5$
5.	10^6	10^3	10^3
6.	10^6	0	$>10^6$
7.	10^6	0	$>10^6$
Teljes vírus titer csökkenés			>29

3. példa

Az 1. példában kapott IgA, IgG és transferrin csapadék megfelelő mennyiségeit elegyítjük, liofilizáljuk és hőkezeltük, majd nátrium-klorid-tartalmú glükóz-oldatban (10 tömeg% glükóz, 0,3 tömeg% nátrium-klorid) feloldjuk olyan mennyiségben, hogy az oldat milliliterenként 50 mg IgA-t, 30 mg IgG-t és 15 mg transferrint tartalmazzon. Az oldat pH-ját $7,0 \pm 0,2$ értékre állítjuk, az oldatot sterilre szűrjük és 2 ml-es adagokban üvegcsékbe töltjük. Az oldat 4°C hőmérsékleten legalább 3 évig eltartható.

Baktériumok elleni hatékonyság

A találmány szerinti készítmény antibakteriális hatékonyságának vizsgálatához három oldatot (a, b és c) készítettünk a 2. táblázatban megadott összetétellel.

2. táblázat

Oldat	IgA	IgG	Transzferrin
a	50	30	15
b	25	20	11
c	90	40	15

(A számadatok mg/ml-t jelentenek)

Az a, b és c oldatból egyenként 3 ml-t kémcsövekbe mérünk és a csöveket 0,1 ml különböző baktérium szuszpenziókkal (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* és *Candida albicans*) oltjuk be. A csöveket összerázzuk, $2 \times 0,1$ ml-t Petri csészékbe pipetázunk. A csészéket tápagarral, illetve a *Candida* számára szójabab-kazein-agarral öntjük ki.

A telepeket 0,5, 1, 3, 5 és 24 óráig, $20-25^{\circ}\text{C}$ -on végzett inkubálás után megszámloljuk. Mindhárom készítmény (a, b és c) gátolta az öt baktérium növekedését. Csak a b oldat mutatott gyenge gátlást az *E. coli* növekedésére.

Összehasonlító vizsgálatot végeztünk az albumin, három IgA/IgG keverék és transferrin hatására vonatkozóan. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaljuk össze.

3. táblázat

	Staph. aur.	E.coli	Pseud. aerug.	Bac. subt.	Cand. alb.
Albumin (50 mg)	–	–	–	–	–
IgA (56 mg)	–	+	–	–	–
IgG (2 mg)					
IgA (75 mg)	+	–	–	–	+
IgG (26 mg)					
IgA (3 mg)	–	–	–	+	–
IgG (100 mg)					
Transzferrin (56 mg)	–	–	+	–	–
Transzferrin (15 mg)	–	–	–	–	–

A számok jelentése: mg/ml oldat

–: a baktérium növekedés nem gátolt

+: a baktérium növekedés gátolt

Vírusok elleni hatékonyság

A találmány szerinti készítmény vírusokra gyakorolt hatásának megállapítása céljából a fenti a) oldat 1–1 ml-éhez 0,1 ml HIV-, Sindbis- és VSV-vírus szuszpenziót adunk. A szuszpenziókat liofilizáljuk, majd megnedvesítve 10 órán át 60 °C-on zárt rendszerben melegítjük. A hőkezelés előtt és után meghatározzuk a vírus titert. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaljuk össze.

4. táblázat

Vírus	Vírus titer	
	kezelés előtt	10 óra múlva
Sindbis	10 ⁵	<10 ^{0,5}
VSV	10 ^{0,4}	<10 ^{0,5}
HIV	10 ⁴	<10 ^{0,5}

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás plazmaprotein alapú, mikroba ellenes, gyulladás ellenes és allergia ellenes gyógyászati készítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy hatóanyagként immunglobulin A-t (IgA) és annak 1 tömegrész mennyiségére számítva 0,40–0,80 tömegrész immunglobulin G-t (IgG) és 0,15–0,45 tömegrész transzferrint, ahol az említett komponenseket ismert módon vagy az 5. vagy 6. igénypont szerinti eljárással állítottuk elő, mimellett a két utóbbi esetben az egyes komponensek mennyiségét szükség esetén kiegészítjük – kívánt esetben az esetlegesen jelenlévő fertőző anyagok inaktiválására és/vagy eltávolítására szolgáló kezelés után – egy vagy több ismert gyógyászati segéd- és/vagy adalékanyaggal összekeverünk és gyógyászati készítménnyé elkészítünk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az IgA-t „szekretoros IgA”-t tartalmazó alakban alkalmazzuk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás alkalmazására kész oldat előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 12 ml oldatra számítva 10–100 mg, előnyösen 45–55 mg IgA-t, 4–80, előnyösen 25–35 mg IgG-t és 1,5–45 mg, előnyösen 10–20 mg transzferrint összekeverünk és a szokásos adalékanyag(ok)kal oldatot készítünk.

4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az összekeverés előtt inaktíváló lépést hajtunk végre, amelynek során a fertőző anyagokat inaktíváljuk és/vagy eltávolítjuk.

5. Eljárás az 1. igénypont szerinti készítmény hatóanyagainak az előállítására, *azzal jellemezve*, hogy egy IgA-t, IgG-t és transzferrint tartalmazó plazmafrakciót vagy plazmát – kívánt esetben az esetlegesen jelenlévő fertőző anyagok inaktiválása és/vagy eltávolítása után – anioncserélővel hozunk érintkezésbe és így az IgA-t, IgG-t és transzferrint adszorbeáljuk,

az ioncserélőn adszorbeált IgA-t, IgG-t és transzferrint ismert módon mossuk és eluáljuk,

az eluátumot ismert módon kicsapással tisztítva a nem kívánt kísérő proteinektől elválasztjuk, így tisztított IgA, IgG és transzferrin tartalmú oldatot kapunk,

az oldatot protein kicsapószerrel kezelve az IgA-t, IgG-t és transzferrint kicsapjuk,

a kicsapott IgA-t, IgG-t és transzferrint elválasztjuk, – kívánt esetben az elválasztott IgA-, IgG- és transzferrin-tartalmú csapadékok egyesítése után – liofilizáljuk, majd a fertőző anyagok inaktiválása céljából kezeljük.

6. Az 5. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

a plazmát vagy a plazmafrakciókat Cohn-eljárással etanollal kezeljük és elválasztjuk a Cohn II+III frakciót, az elválasztott Cohn II+III frakciót vizes pufferrel, 5,0 és 6,5 közötti pH-értéken digérálva IgA, IgG és transzferrin tartalmú protein elegyet extrahálunk,

az extrahált protein elegyhez etanol adva kicsapjuk a nem kívánt kísérő proteineket,

a kicsapott kísérő proteineket elválasztjuk,

a kapott, IgA, IgG és transzferrin tartalmú oldatot DEAE-ioncserélőre visszük,

az adszorbeált IgA-t, IgG-t és transzferrint mossuk és nátrium-klorid oldattal eluáljuk,

a kapott eluátumot kívánt esetben tisztítjuk, majd etanollal kezeljük és az IgA-t és IgG-t kicsapjuk,

a kicsapott IgA-t és IgG-t elválasztjuk és így IgA és IgG tartalmú csapadékot és transzferrin tartalmú felülűsöt kapunk,

a felülűsöt megsavanyítjuk, az így kicsapott transzferrint elválasztjuk és

az elválasztott, IgA-, IgG- és transzferrin-tartalmú csapadékokat egyesítjük és kívánt esetben a fertőző anyagokat inaktíváljuk.