(19) C2 (11) 64742 (13) UA

(98) п/с 98, Київ-166, 02166
(85) 1999-09-24
(74) Гренчук Марія Олександрівна, (UA)
(45) [2004-03-15]
(43) [2000-08-15]
(24) 2004-03-15
(22) 1998-12-07
(12) null
(21) 99084781
(46) 2004-03-15

(86) 1998-12-07 PCT/US98/25208
(30) 08/997,952 1997-12-24 US
(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ РОЗЧИНУ g-ГЛОБУЛІНУ, ПРИЗНАЧЕНОГО ДЛЯ ВНУТРІШНЬОВ
ЕННОГО ВВЕДЕННЯ, І ПРОДУКТ, ЩО ОДЕРЖУЄТЬСЯ У ЦЕЙ СПОСІБ (ВАРІАНТИ) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТВОРА ГАММА-Г
ЛОБУЛИНА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ И ПРОДУКТ, ПОЛУЧАЕМЫЙ ЭТИМ СПОСОБОМ PROCESS FOR PRODUCING INTRAV
ENOUSLY-ADMINISTRABLE GAMMA GLOBULIN SOLUTION AND PRODUCT MANUFACTURED BY THIS PROCESS
(56) US A 5371196 06.12.94 2 US A 5151499 29.09.92 2 US A 5132406 21.07.92 2
(71)
(72) US Маміді Райа Р. US Маміді Райа Р. US Маміді Райа Р. US Багдасаріан Андранік US Багдасаріан Андранік U
S Багдасаріан Андранік US Такечі Казуо US Такечі Казуо US Такечі Казуо US Канаверал Горгоніо US Канаверал Горг
оніо US Канаверал Горгоніо
(73) US АЛЬФА ТЕРАПЕВТИК КОРПОРЕЙШН US АЛЬФА ТЕРАПЕВТИК КОРПОРЕЙШН US АЛЬФА ТЕРАПЕВТИК КОРПОРЕЙШН

Изобретение относится к медицине и фармацевтике, в частности к способу получения раствора гамма-глобулина для внутривенного введения. Процесс получения гамма-глобулина включает в себя этапы тепловой обработки для инактивации вирусов и фракционирования неочищенного раствора гамма-глобулина полиэтиленгликолем с последующей обработкой очищенного гамма-глобулина растворителем-детергентом для последующей инактивации вирусов. Изобретение относится также к раствору гамма-глобулина, полученного в соответствии с данным способом.

Винахід відноситься до медицини та фармацевтики, стосується способу одержання розчину гамаглобуліну для внутрішньовенного введення, який включає у себе етапи теплової обробки для інактивації вірусів і фракціонування неочищеного розчину гамаглобуліну поліетиленгліколем з наступною обробкою очищеного гамаглобуліну розчинником-детергентом для подальшої інактивації вірусів. Також винахід стосується розчину гамаглобуліну, одержаного за даним способом.

A process for producing an intravenously-administrable gamma globulin solution substantially free of contaminating viruses by heat treating for viral inactivation and fractionating an impure gamma globulin solution and then treating the purified gamma globulin with a solvent-detergent for further viral inactivation.

1. Спосіб одержання розчину гамаглобуліну, призначеного для внутрішньовенного введення, який включає:

а) теплову обробку неочищеного розчину гамаглобуліну протягом такого часу і за таких температурних умов, які є достатніми для інактивації теплочутливих вірусів;

б) фракціонування поліетиленгліколем розчину гамаглобуліну, що пройшов теплову обробку, із одержанням очищеного розчину гамаглобуліну, причому фракціонування проводиться принаймні в дві стадії; при цьому домішки видаляють у вигляді преципітату на першій стадії фракціонування поліетиленгліколем, а гамаглобулін видаляють у вигляді преципітату на другій стадії фракціонування поліетиленгліколем; і

в) обробку очищеного розчину гамаглобуліну органічним розчинником для інактивації оболонкових вірусів без подальшого фракціонування поліетиленгліколем.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що неочищений розчин гамаглобуліну є фракцією Кона I + II + III, фракцією Кона II + III, фракцією Кона II + IIIw, або фракцією Кона II.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що неочищений розчин гамаглобуліну піддають принаймні одному етапу очищення до етапу теплової обробки (а).

4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що етап теплової обробки (а) здійснюють при температурі приблизно від 50 до 70°С протягом приблизно від 10 до 100 годин.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що етап теплової обробки (а) здійснюють при температурі близько 60°С протягом близько 10 годин.

6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що органічним розчинником, що застосовується на етапі (в), є алкілфосфат.

7. Спосіб за п. 6, який **відрізняється** тим, що алкілфосфатом є три-n-бутилфосфат.

8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що органічний розчинник містить детергент.

9. Спосіб за п.7, який **відрізняється** тим, що органічний розчинник містить детергент.

10. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що після етапу (а) розчин гамаглобуліну піддають обробці аніонообмінною смолою і катіонообмінною смолою.

11.Спосіб за п. 10, який **відрізняється** тим, що обробка аніонообмінною смолою передує етапу (в), а обробку катіонообмінною смолою проводять після етапу (в).

12.Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що етап просвітлювання бентонітом здійснюють після першої стадії фракціонування поліетиленгліколем.

13.Розчин гамаглобуліну, призначений для внутрішньовенного введення, одержаний у спосіб за п. 1.

14.Розчин гамаглобуліну, призначений для внутрішньовенного введення, одержаний у спосіб за п. 10.

Даний винахід стосується об'єднаного, багатоетапного промислового способу одержання імунного сироваткового глобуліну, який у якості головного інгредієнта містить IgG (γ-глобулін) і призначається для внутрішньовенного введення.

Із рівня техніки відомі різноманітні способи одержання розчинів γ-глобуліну для внутрішньовенного введення, вихідним матеріалом для яких є фракції людської плазми (фракції Кона). Деякі з фракцій Кона містять більш високі титри γ-глобуліну, ніж інші фракції. Зазвичай вихідним матеріалом для одержання розчинів γ-глобуліну є фракція Кона II або фракція Кона II+III.

Хоча у відомих з рівня техніки способах використовуються різноманітні методи поділу і стерилізації, постійно вводяться модифікації з метою підвищення чистоти остаточного продукту, його безпеки і загального виходу.

У багатьох промислових способах для інактивації вірусів застосовується етап обробки розчинником/детергентом або етап теплової обробки. На сьогодні не відомі багатоетапні способи, для яких вихідним матеріалом була б паста фракції Кона II або паста II + III і які б включали дві різні процедури інактивації вірусів як частину ефективного способу виробництва γ-глобуліну з високим виходом.

У патенті США 5,151,499 Kameyama et al. описаний спосіб одержання білкових композицій з інактивованими вірусами, згідно з яким білкову композицію піддають інактивації оболонкових вірусів обробкою білкової композиції розчинником/детергентом та інактивації безоболонкових вірусів тепловою обробкою білкової композиції. У патенті відзначається, що етап обробки розчинником/детергентом краще здійснювати першим і у присутності інгібітору протеаз, а вже потім проводити теплову обробку. Якщо теплову обробку проводять у рідинній фазі, то білок виділяють із суміші розчинник/детергент адсорбцією на іонообмінній колонці до теплової обробки. Теплову обробку в рідинній фазі можна здійснювати у присутності в якості стабілізатора цукру, цукрового спирту або амінокислот. Поряд з тим, що в патенті перераховані численні вихідні білкові композиції, що містять імуноглобулін, проте наведені приклади їх одержання обмежуються Фактором IX, тромбіном, фібриногеном і фібронектином. Видалення денатурованого білка, що утворився на етапі теплової обробки, при цьому не розглядається.

У деяких відомих з рівня техніки способах одержання розчинів γ-глобуліну, призначених для внутрішньовенного введення, описується застосування теплової обробки в рідинній фазі, проведеної при наявності сорбітолу в якості теплового стабілізатора, як одного з етапів процесу очищення, вихідним матеріалом для якого є паста фракцій Кона II + III. У патенті США 4,876,088 Hirao et al., фракцію Кона II+III піддають фракціонуванню поліетиленгліколем (далі "ПЕГ") (спочатку 8%мас. ПЕГ, потім 12%мас. ПЕГ), потім іонообмінною хроматографією (ДЕАЕ-Сефадекс), і видаляють антитіла групи крові людини до теплової обробки в рідинній фазі при наявності сорбітолу в якості стабілізатора білка. З іншого боку, у Прикладі 1 патенту США 4,876,088 описується одержання розчину γ-глобуліну для внутрішньовенного введення з пасти фракції Кона II+III. При цьому пасту суспендують у воді, pH доводять до 5,5, і проводять центрифугування, після чого супернатант піддають тепловій обробці для інактивації вірусів у присутності 33% (мас), сорбітолу. Далі йде фракціонування ПЕГом (6%/12%), при якому видаляють денатурований білок, та інші етапи очищення, включаючи іонообмінну хроматографію на ДЕАЕ-Сефадексі.

Метою даного винаходу є розробка об'єднаного, багатоетапного промислового способу одержання высокоочищеного імунного розчину γ-глобуліну на основі методу фракціонування Кона.

Іншою метою даного винаходу є одержання дуже чистого, призначеного для внутрішньовенного введення розчину γ-глобуліну, вільного як від оболонкових, так і від безоболонкових вірусів, включаючи всі теплочутливі віруси.

Ще однією метою даного винаходу є створення промислового способу одержання γ-глобуліну, що передбачав би видалення перед другою стадією інактивації вірусів будь-якого денатурованого білка, що утворився при тепловій стерилізації.

Перераховані вище й інші цілі, які є очевидними для кваліфікованого фахівця, були досягнуті у даному винаході шляхом того, що спиртові фракції Кона, що можуть бути частково очищені, але збагачені на γ-глобулін, піддають тепловій обробці у водяному середовищі при наявності теплового стабілізатора для інактивації вірусів, потім проводять фракціонування ПЕГом і другу інактивацію вірусів при наявності розчинника або, краще, суміші розчинник/детергент для руйнування оболонкових вірусів, після чого йде видалення розчинника або суміші розчинник/детергент.

Згідно з кращим варіантом здійснення даного винаходу, тепловим стабілізатором є сорбітол, а в якості розчинника використовується триалкілфосфат.

Згідно з іншим кращим варіантом здійснення даного винаходу, денатуровані продукти, що утворилися в результаті інактивації вірусів тепловою обробкою, видаляють фракціонуванням ПЕГом перед другою інактивацією вірусів, одержуючи тим самим додатково очищений, чистий, прогрітий γ-глобулін.

Відповідно до іншого кращого варіанта здійснення даного винаходу, будь-які присутні частки видаляються перед етапом обробки розчинником/детергентом.

Відповідно до ще одного варіанта здійснення винаходу, одержують стерилізований теплом і розчинником/детергентом γ-глобулін, придатний до внутрішньовенного введення.

У якості вихідного матеріалу використовуються фракції, що містять імуноглобулін. Ці фракції не обов'язково є фракціями сироватки людини, але повинні містити імуноглобулін. Конкретними прикладами таких фракцій, що містять імуноглобулін, є фракція II+III і фракція II, які отримуються при фракціонуванні етанолом за Коном, а також паста із еквівалентних їм фракцій, що містять імуноглобулін. Іншими вихідними матеріалами є фракції I + II + III і фракція II + IIIw. Вихідний матеріал може містити такі домішки, як антитіла групи крові людини, плазміноген, плазмін, калікреїн, прекалікреїн активатор, полімери IgM, IgA, IgG (що позначаються як "агрегати") і т.д.

Кращим вихідним матеріалом є фракція Кона II або фракція Кона II + III. Якщо використовується паста фракцій II + III, то бажано піддати її попередній процедурі відмивання з одержанням фракції II + IIIw, що і використовується в способі, відповідно до даного винаходу. "Фракція II + IIIw" являє собою преципітат фракції II + III, промитий розчином динатрійфосфату.

Фракцію II + IIIw можна приготувати розчиненням преципітату фракції II + III у холодній воді для ін'єкцій

у співвідношенні приблизно 1 кілограм пасти II + III на 20 об'ємів води. Для солюбілізації ліпідів, ліпопротеїнів і альбуміну добавляють розчин фосфату натрію до остаточної концентрації 0,003М фосфату натрію. Потім добавляють холодний етанол до остаточної концентрації близько 20%. При додаванні спирту температуру поступово знижують до -5±1°С, а pH підтримують на рівні 7,2±0,1, наприклад, додаванням ацетатного буфера або розведеної соляної кислоти. Преципітат фракції II + IIIw, що утворюється, виділяють за допомогою центрифугуваннння і/або фільтрації при температурі -5±1°С.

Відповідно до даного винаходу, перед першим етапом інактивації вірусів можуть бути проведені різноманітні попередні етапи очищення і/або зменшення кількості агрегатів. Наприклад, коли використовується паста фракцій II + III, що містить звичайно близько 20% спирту і більш ніж 70% IgG, її можна суспендувати у від 3-х до 10-и об'ємів холодної води, краще - у від 3-х до 5-й об'ємів при температурі близько 0-5°С і pH, доведеною до величини в інтервалі 4,5-6,0, краще в інтервалі 5,0-5,5, за допомогою ацетатного буфера з pH 4,0 або соляної кислоти. Суміш перемішують протягом 2-15 годин для того, щоб весь γ-глобулін перейшов у розчин. Потім такі нерозчинені білки, як альбумін і α-глобуліни, можна видалити шляхом центрифугуваннння і/або фільтрації.

Якщо в якості вихідного матеріалу використовуються різноманітні фракції Кона, то початковий етап або етапи способу можуть бути відповідним чином обрані для того, щоб провести попереднє очищення для отримання фракцій з високим вмістом IgG для подальшої обробки. Наприклад, коли фракція Кона II (яка містить більш як 95% IgG) відділена від фракції Кона III для подальшої обробки фракції II, то початкова обробка фракції II може проводитися при кислотності pH від 3,2 до 5,0, краще від 3,8 до 4,2, як описано Уемурою та ін. (Uemura et al.), у патенті США 4,371,520, із тим щоб зруйнувати агрегати імуноглобулінів, які існують серед мономерів і димерів імуноглобулінів, оскільки відомо, що агрегати мають анти-комплементарну активність (АСА). В іншому випадку, коли в якості вихідного матеріалу використовується фракція Кона II + III, тоді, відповідно до патенту США 4,371,520, обробка низьким pH може бути здійснена як додатковий етап після етапу початкового очищення, описаного вище, і перед інактивацією вірусів тепловою обробкою.

При здійсненні етапу теплової стерилізації білок імуноглобуліну розчиняють у воді, або, якщо він являє собою водяну суміш, наприклад, фільтрат, отриманий після згаданого вище часткового очищення, його можна використовувати в тому ж виді, у якому він є, і добавляти до нього цукор, цукровий спирт або амінокислоти для виконання ролі теплового стабілізатора. В якості теплового стабілізатора краще використовувати сахарозу, мальтозу, сорбітол або манітол, а найкраще - сорбітол. Цукор або цукровий спирт додають до розчину імуноглобуліну у вигляді порошку або перед додаванням змішують із невеличкою кількістю води і доводять його концентрацію в розчині до 10-50% (мас), до насичення. У цей момент водяний розчин імуноглобуліну містить достатню кількість води, так що концентрація загального білка в розчині складає від 1 до 6%, що відповідає звичайному вихідному матеріалу фракцій II + III, який містить близько 300 грамів білка на кілограм пасти.

Після додавання теплового стабілізатора суміш гріють для інактивації теплочутливих вірусів до температури 50-70°С протягом 10-100 годин, краще - при 60°С протягом 10-20 годин. Етап теплової обробки не тільки інактивує віруси, але, у силу своєї денатуруючої дії, може вибірково знижувати кількість окремих небажаних білків, зазвичай асоційованих із фракціями Кона II + III, таких як прекалікреїн, плазмін, плазміноген і IgA.

Після теплової обробки добавляють холодну воду в такій кількості, щоб довести концентрацію білка від 0,3 до 2,0%. Розчин охолоджують до 0-2°С.

Після цього ПЕГом проводять фракціонування розчину, який був підданий тепловій обробці. Фракціонування ПЕГом є добре відомим способом, який застосовується для очищення імуноглобуліну, тобто для відділення потрібних мономерів і димерів IgG від агрегатів IgG й інших домішок, що природно зустрічаються у вихідних фракціях білків плазми. Але, за способом, що тут описується, фракціонування ПЕГом також дає можливість відокремити потрібні мономери і димери IgG від небажаних денатурованих білкових продуктів, що утворилися при тепловій обробці. До цих денатурованих білкових продуктів належать денатурований прекалікреїн, плазміноген, плазмін, IgA, IgM та агрегати.

Може бути використана будь-яка відома з рівня техніки процедура фракціонування ПЕГом. Зазвичай проводять двоетапне фракціонування ПЕГом. На першому етапі концентрацію ПЕГ і величину pH вибирають таким чином, щоб потрібні мономери й димери IgG залишалися в розчині, а такі небажані білки, як агрегати, випадали з розчину в осад. Після центрифугування і/або фільтрації концентрацію ПЕГ підвищують, і pH регулюють так, щоб потрібні мономери й димери IgG випали в осад.

Наприклад, перший етап фракціонування ПЕГом можна проводити при pH від 5,0 до 7,5, краще - в інтервалі значень pH від 6,5 до 7,5, якщо в якості вихідного матеріалу використовується паста фракцій II + IIIw, і краще від 5,5 до 6,0, якщо в якості вихідного матеріалу використовується паста фракцій II + III, і концентрація ПЕГу варіює в межах 4-8%, краще - в межах 4-6%, якщо в якості вихідного матеріалу використовується паста фракцій II + IIIw, або 6-8%, якщо в якості вихідного матеріалу використовується паста фракцій II + III. При витриманні температури в межах 0-2°С перший етап фракціонування ПЕГом займає від 1 до 8 годин, після чого преципітат видаляють як описано вище.

Потім pH фільтрату доводять до значення в межах від 8,0 до 9,0, краще - від 8,5 до 8,9, і добавляють ще одну порцію ПЕГ до остаточної концентрації від 10 до 15%, краще, якщо близько 12%. Преципітат, що утворився і являє собою очищений імуноглобулін, видаляють фільтрацією і/або центрифугуваннням.

Подальші деталі процедур фракціонування ПЕГом, які застосовуються для здійснення даного винаходу, можна знайти в згаданих вище патентах США 4,876,088 Hirao et al., і 4,845,199 Hirao et al.

Заключним необхідним етапом способу, розкритого у даному винаході, є етап другої інактивації вірусів із використанням розчинника або суміші розчинник/детергент. Як описано нижче, наступні етапи очищення, зокрема, із використанням іонообмінних смол, можуть здійснюватися як до, так і/або після обробки розчинником/детергентом. Особливі переваги має процедура, що поєднує аніонообмінну обробку до інактивації вірусів розчинником/детергентом із катіонообмінною обробкою після інактивації вірусів розчинником/детергентом. У ході, цієї процедури деякі небажані білкові матеріали (такі як прекалікреїн активатор, IgA, IgM і альбумін), що виявляються в плазмі людини, можуть бути видалені з IgG за допомогою

аніонообмінника, а потім ці матеріали (прекалікреїн активатор, IgA, IgM, альбумін і ПЕГ), а також залишки реагентів, використаних для обробки розчинником/детергентом, можуть бути видалені катіонообмінною хроматографією.

Якщо цього не було зроблено на попередніх етапах способу, то призначений для обробки розчинником/детергентом розчин повинен бути оброблений для видалення всіх часток, до яких може належати і денатурований білок. Тому бажано пропустити розчин крізь одномікронний або більш тонкий фільтр до того, як буде додаватися розчинник/детергент. Це також знизить імовірність попадання вірусів у великі частки, де вони могли б уникнути контакту з розчинником/детергентом.

В даний час найкращим розчинником для інактивації оболонкових вірусів є триалкілфосфат. Триалкілфосфат, який використовується при здійсненні даного винаходу, не є предметом жодних особливих обмежень, але використовувати краще три(n-бутил)фосфат (TNBP). Серед інших триалкілфосфатів застосовувати можна також три(тер-бутил)фосфат, три(n-гексил)фосфат, три(2-етилгексил)фосфат та ін. Можливо застосування суміші двох і більше різних триалкілфосфатів.

Триалкілфосфат використовують у концентраціях від 0,01 до 10% (мас), краще - від 0,1 до 3% (мас).

Триалкілфосфат може застосовуватися як разом із детергентом або поверхнево-активною речовиною, так і без них. Використовувати триалкілфосфат краще у сполученні з детергентом. Функції детергента полягають у посиленні контакту вірусів, що утримуються в композиції імуноглобуліну, із триалкілфосфатом.

Прикладами детергентів є поліоксиетиленові похідні жирних кислот, часткові ефіри безводного сорбітолу, такі як Полісорбат 80 (Торгова назва: Твін 80, і т.д.) і Полісорбат 20 (Торгова назва: Твін 20, і т.д.); і такі неіонні агенти, промиті в масляній ванні, як оксиетильований алкілфенол (Торгова назва:Тритон X100) та ін., а також інші поверхнево-активні речовини і такі детергенти, як цвітеріонні детергенти, та ін.

При застосуванні детергента, його не варто добавляти в критичних кількостях; детергент можна використовувати в концентраціях, наприклад, від 0,001% до 10%, і краще - від 0,01% до 3%.

Відповідно до даного винаходу обробку триалкілфосфатом композиції, що містить імуноглобулін, проводять при температурі від 20 до 35°C, краще - від 25 до 30°C, протягом більш ніж однієї години, краще - від 5 до 8 годин, і найкраще - від 6 до 7 годин.

Під час обробки триалкілфосфатом імуноглобулін знаходиться у водяному середовищі у формі розчину з концентрацією білка від 3 до 8%.

Якщо аніонообмінна обробка не була проведена перед обробкою розчинником/детергентом, то її можна здійснити з вже обробленим розчинником/детергентом імуноглобуліном. Бажано хоча б катіонообмінну обробку проводити за допомогою імуноглобуліну, обробленого розчинником/детергентом. Іонообмінну обробку проводять імуноглобуліном, розчиненим у водяному розчиннику, з pH, як правило, близько 5-8, із достатньо низькою іонною силою для максимальної адсорбції IgG. Концентрація білка зазвичай знаходиться в межах 1-15% (мас.), краще, якщо в межах 3-10% (мас.). Іонообмінник врівноважують тим самим водяним розчинником, у якому розчиняють імуноглобулін, та за допомогою як безперервного, так і порціонного процесу. Наприклад, при здійсненні порціонної аніонообмінної обробки розчин імуноглобуліну змішують з аніонообмінником у кількості від 10 до 100мл на 1мл попередньо обробленого аніонообмінника (наприклад, 1 грам смоли ДЕАЕ Сефадекс А-50 набухає приблизно до 20 грамів вологої ваги в 0,4% розчині хлориду натрію), і суміш перемішують при 0-5°C протягом 0,5-5 годин із наступним фільтруванням або центрифугуваннням на швидкості від 6000 до 8000об./хв. протягом 10-30 хвилин із одержанням супернатанту. При здійсненні безперервного процесу розчин імуноглобуліну пропускають крізь колонку з аніонообмінником із швидкістю від 10 до 100мл на мл аніонообмінника, і збирають фракцію, що не зв'язалася.

Аніонообмінник, що використовується, містить, наприклад, аніонообмінні групи, пов'язані з нерозчинним носієм. До аніонообмінних груп належать діетиламіноетил (ДЕАЕ), група четверинного аміноетилу (QAE) та ін., а до нерозчинних носіїв належать агароза, целюлоза, декстран, поліакриламід та ін.

До прийнятних катіонообмінників належать карбоксиметил Сефадекс (CM-Сефадекс), CM-целюлоза, SP-Сефадекс, CM-Сефароза і S-Сефароза. Попередньо оброблений катіонообмінник у кількості 1мл (наприклад, 1 грам смоли ДЕАЕ Сефадекс С-50 набухає приблизно до 30-35 грамів вологої ваги в 0,4% розчині хлориду натрію) змішують із 0,5-5,0мл розчину імуноглобуліну і перемішують при 0-5°C протягом 1-6 годин. Суспензію центрифугують або фільтрують для відділення IgG смоли, що сорбувала. Може також застосовуватися і безперервний процес.

При катіонообмінній обробці в описаних умовах IgG сорбується і, після промивання катіонообмінної смоли, що сорбувала білок, IgG можна елюювати, наприклад, 1,4N розчином хлориду натрію.

Після здійснення описаних вище етапів процесу IgG просвітлюють, діафільтрують і концентрують до потрібного ступеня. При необхідності можна додати такий стабілізатор, як D-сорбітол, і провести остаточне регулювання концентрацій із тим, щоб одержати розчин із pH близько 5,4, який містить близько 100мг/мл IgG і 50мг/мл D-сорбітолу. Цей розчин потім стерилізують фільтруванням через стерилізований фільтр, що затримує бактерії, і закривають в ампули.

Нижченаведені приклади мають виключно ілюстративне спрямування і в жодній мірі не обмежують об'єм даного винаходу.

За необхідністю, з описаним вище процесом можна поєднувати й інші процеси очищення імуноглобулінів. Наприклад, можна використовувати етап просвітлювання бентонітом, ефективний у зменшенні кількості калікреїна і прекалікреїн-активатора. Ілюстрацією цього способу є наведений нижче Приклад 1.

Приклад 1. Гамаглобулін, підданий тепловій обробці й обробці розчинником/детергентом

Пасту фракції II + IIIw у кількості 685г суспендують у 11,9кг холодної води. До суспензії добавляють розчин ацетат-тригідрата натрію до остаточної концентрації близько 0,04M для селективної солюбілізації IgG. Після перемішування протягом 15 хвилин pH суспензії доводять до 4,8 ацетатним буфером із pH 4,0. До суспензії добавляють холодний спирт (95%) до остаточної концентрації 17%. Під час додавання спирту температуру суспензії поступово знижують до приблизно -6°C. До суспензії в якості агента, що фільтрує, добавляють 303г Целіту 535, промитого кислотою (наданого Celite Corporation), до остаточної концентрації близько 2%. Після перемішування протягом 1 години Целіт і пасту фракції III, що містять такі непотрібні

білки, як плазмін, плазміноген, IgM і IgA, видаляють фільтрацією за допомогою фільтрувального пресу. Фільтрат потім просвітлюють пропусканням крізь фільтри 0,45мкм і 0,2мкм.

Кислотність просвітленого розчину фракції II + IIIw доводять до pH 4,0 додаванням 0,1N соляної кислоти і концентрують ультрафільтрацією до об'єму 3,4 літра (1/5 початкового об'єму). До концентрованого розчину добавляють холодну воду в об'ємі, який дорівнює об'єму, видаленому при першій ультрафільтрації, і розчин знову піддають ультрафільтрації до 1/5 початкового об'єму. На цьому етапі концентрація білка в розчині складає близько 2%. Розчин концентрують приблизно до 4,0% білка і піддають діафільтрації проти холодної води доти, поки провідність розчину не падає нижче 300мкС/см, що сприяє запобіганню агрегатоутворенню і зниженню денатурації при тепловій обробці. Далі розчин знову концентрують до 8,8% білка. До розчину добавляють D-сорбітол до остаточної концентрації близько 33%. Після перемішування протягом 30 хвилин pH розчину, що містить сорбітол, доводять до 5,5 добавленням 0,5N гідроксиду натрію. Потім розчин нагрівають протягом 10 годин при 60°C. Після теплової обробки до розчину добавляють 3 об'єми холодної води, і розведений розчин охолоджують до 0-2°C.

Величину pH розчину доводять до 6,9 добавленням 0,25N гідроксиду натрію, і до розчину добавляють 50%-й поліетиленгліколь (ПЕГ) 3350 до остаточної концентрації 4%. Концентрацію хлориду натрію в розчині доводять до 8мМ для полегшення преципітації домішок і агрегатів при pH 6,9. Осад, що утворився, видаляють фільтрацією. Величину pH фільтрату доводять до 4,8 добавленням 0,1N соляної кислоти, і добавляють бентоніт остаточної концентрації близько 0,25%. Величину pH суспензії бентоніту доводять до 5,2, і суспензію фільтрують для видалення бентоніту. Величину pH фільтрату доводять до 8,5 добавленням 0,25N гідроксиду натрію, і до розчину додають 50%-й поліетиленгліколь (ПЕГ) 3350 до остаточної концентрації 12%. Преципітат (очищений імунний глобулін), що утворився, видаляють центрифугуванням.

Близько 175 грамів пасти імуноглобуліну, очищеного як описано вище, суспендують у 790г 0,3%-го розчину хлориду натрію, pH суспензії доводять до 5,5, і суспензію перемішують протягом 2,5 годин. До розчину добавляють 62г попередньо урівноваженої (0,3%-м розчином хлориду натрію з pH 5,5) смоли DEAE-Сефадекс A-50, і суспензію перемішують протягом 2 годин. Потім суспензію фільтрують для видалення смоли. Концентрацію хлориду натрію доводять до 0,4%, і до фільтрату добавляють суміш три-n-бутилфосфату (TNBP) і Полісорбату 80 так, щоб остаточна концентрація TNBP складала 0,3%, а Полісорбату 80-1%. Після інкубації протягом ночі pH розчину доводять до 5,8 і добавляють 860г попередньо урівноваженої (0,4%-м розчином хлориду натрію з pH 5,8) смоли CM-Сефадекс C-50. Після перемішування протягом 2 годин суспензію фільтрують. Після 3-х кратного промивання смоли CM-Сефадекс 0,3%-м хлоридом натрію, адсорбований IgG вимивають 1,4N хлоридом натрію. Елюат просвітлюють і піддають діафільтрації і концентруванню. Добавляють D-сорбітол, і концентрацію розчину остаточно доводять до приблизно 100мг/мл IgG і близько 50мг/мл D-сорбітолу з pH 5,4. Після цього розчин стерилізують пропусканням крізь стерилізований фільтр, який затримує бактерії, і закривають в ампули.

Проміжний етап обробки бентонітом, описаний у даному Прикладі, є ефективний для подальшого зменшення присутності таких гіпотензивних ферментів, як калікреїн і прекалікреїн-активатор.

Параметри, які піддавали тестуванню

Антикомплементарна активність (CH_{50} од./мг IgG)	0,34
Чистота IgG (%)	100
Вміст IgG (мг/мл)	112,7
Прекалікреїн (% CBER Ref. #3)	21
Антитіла проти кору (% CBER Ref. Lot No. 176)	0,67
Розподіл IgG за молекулярною масою при HPLC (%):	
- мономерів	82,2
- димерів	17 4
- фрагментів	0,10
- агрегатів	0,3
Антитіла проти гепатиту A (титр)	1:200
Антитіла проти гепатиту B (титр)	1:1024
IgA (мкг/мл)	22
IgM (мкг/мл)	16
Плазміноген (нг/мл)	HT
Плазмін (нг/мл)	16
PH	5,4

HT = Не тестували

Приклад 2. Гамаглобулін, підданий тепловій обробці й обробці розчинником/детергентом

Один (1) кг пасти фракції II + III суспендують у 4,5кг холодної води при 0-2°C. Після перемішування протягом 1 години pH суспензії доводять до 5,0 додаванням 1N соляної кислоти. Після перемішування протягом 3 годин при pH 5,0 преципітат видаляють центрифугуванням. До центрифугату добавляють D-сорбітол до остаточної концентрації 33%, і суміш перемішують протягом 1 години. Кислотність суспензії доводять до pH 5,5, а потім суспензію нагрівають при 60°C протягом 10 годин. Після теплової обробки до розчину добавляють 3 об'єми холодної води, і розведений розчин охолоджують до 0-2°C. Далі добавляють 50%-й розчин ПЕГ 3350 до остаточної концентрації ПЕГ 6%. Величину pH суспензії, що містить ПЕГ, доводять до 5,7 додаванням 0,5N гідроксиду натрію, і суспензію перемішують протягом 2 годин. Промитий кислотою Целіт 535 добавляють до остаточної концентрації 1,5%, і суспензію перемішують протягом 1 години. Преципітат разом із Целітом видаляють фільтрацією. Величину pH фільтрату доводять до 8,8 додаванням 0,5N гідроксиду натрію, концентрацію ПЕГ доводять до 12% додаванням 50% розчину ПЕГ. Величину pH суспензії доводять до 8,8, суспензію перемішують протягом 1 години і фільтрують, збираючи пасту очищеного імуноглобуліну. Таким чином отримують близько 251г пасти очищеного імуноглобуліну.

Пасту очищеного імуноглобуліну у кількості 251г, отриманої як описано вище, суспендують в 1,4кг 0,3%-го розчину хлориду натрію. Після перемішування протягом 1 години pH суспензії доводять до 6,0

додаванням 5%-ї оцтової кислоти. Після повного розчинення пасти добавляють 104г попередньо урівноваженої (0,3%-м розчином хлориду натрію з pH 6,0) смоли DEAE-Сефадекс А-50, і розчин перемішують на протязі 2 годин. Смолу видаляють фільтрацією. Потім фільтрат просвітлюють пропусканням крізь 0,2мкм фільтр. Концентрацію хлориду натрію в просвітленому розчині доводять до 0,4%. Потім до розчину добавляють суміш три-n-бутилфосфату (TNBP) і Полісорбату 80 так, щоб остаточна концентрація TNBP складала 0,3%, а Полісорбату 80-1%. Розчин инкубують при 27°С протягом 1 години і залишають на ніч у холодильнику при 4°С. Наступного дня pH розчину доводять до 5,8, і в розчин добавляють 1,8кг попередньо урівноваженої (0,4%-м розчином хлориду натрію з pH 5,8) смоли СМ-Сефадекс С-50. Після перемішування протягом 2 годин смолу видаляють фільтрацією. Після 3-х кратного промивання смоли СМ-Сефадекс 0,3%-м хлоридом натрію, адсорбований IgG вимивають 1,4N хлоридом натрію. Елюат просвітлюють і піддають діафільтрації і концентруванню. Добавляють D-сорбітол, і концентрацію розчину остаточно доводять до приблизно 100мг/мл IgG і близько 50мг/мл D-сорбітолу. Розчин поділяють на дві порції - порцію А и порцію В. Величину pH порції А доводять до 5,4, а pH порції D - до 4,3. Потім розчини порцій А і В індивідуально стерилізують пропусканням крізь стерилізовані фільтри, що затримують бактерії, і закривають в ампули.

Параметри, які піллавали тестуванню

Антикомплементарна активність (CH_{50} од./мг IgG)	<0,05	
Чистота IgG (%)	100	
Вміст IgG (мг/мл)	104,2	
Прекалікреїн (% CBER Ref. #3)	НТ	
Антитіла проти дифтерії (Антитоксин од./мл)	8,2	
Розподіл IgG за молекулярною масою при HPLC (%):	Рн 5,4	pH 4,3
- мономерів	88,8	97,5
- димерів	10,9	2,3
- фрагментів	0,3	НТ
- агрегатів	<0,3	<0,3
Антитіла проти гепатиту А (титр)	1:100	
LgA (мкг/мл)	78	
LgM (мкг/мл)	28	
Калікреїн (A_{405})	0,09	
Плазміноген (нг/мл)	<8,4	
Плазмін (нг/мл)	<8,4	

НТ = Не тестували

Для кваліфікованого фахівця є очевидними можливі варіанти винаходу.