

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490298 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.09.20

(22) Дата подачи заявки
2022.07.29

(51) Int. Cl. C07K 16/42 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ОЧИСТКИ ИММУНОГЛОБУЛИНА G И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 2021902332; 63/227,329; 63/365,530

(32) 2021.07.29; 2021.07.29; 2022.05.31

(33) AU; US; US

(86) PCT/IB2022/057039

(87) WO 2023/007445 2023.02.02

(71) Заявитель:
КСЛ БЕРИНГ АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Ананд Рупси, Доллингер Петер (DE),
Холлер Лора (US), Нойенфельдт
Мартин, Полатынская Магдалена,
Вилька Хайке Николь, Андерс
Катрин, Шульце Норберт (DE),
Бурема Дэвид (US)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам очистки иммуноглобулина G (IgG) и других белков, таких как альбумин, из плазмы или ее фракции с использованием смолы для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG. Настоящее изобретение также относится к составу и применению белкового продукта плазмы, полученного способом.

A1

202490298

202490298

A1

СПОСОБ ОЧИСТКИ ИММУНОГЛОБУЛИНА G И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

5 Данные о родственных заявках

По данной заявке испрашивается приоритет заявки на патент Австралии № 2021902332, поданной 29 июля 2021 г. и имеющей название «Способ очистки иммуноглобулина G и его применение», заявки на патент США № 63/227,329, поданной 29 июля 2021 г. и имеющей название «Способ очистки иммуноглобулина G и его применение » и заявки на патент США № 63/365,530, поданной 31 мая 2022 г. и имеющей название «Способ очистки иммуноглобулина G и его применение».

Перечень последовательностей

15 Настоящая заявка подана вместе с Перечнем последовательностей в электронном виде. Все содержимое Перечня последовательностей включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Область, к которой относится изобретение

20 Настоящее изобретение относится к способам очистки иммуноглобулина G (IgG) и других белков, таких как альбумин, из плазмы, а также к составам и применению их белкового продукта плазмы.

Предпосылки создания изобретения

25 Иммуноглобулин G (IgG) является одним из наиболее распространенных белков в плазме крови и отвечает, например, за нейтрализацию токсина, активацию комплемента и опсонизацию. IgG, очищенный из плазмы человека, применяют для профилактического предотвращения инфекций у пациентов с иммунодефицитом, заместительной терапии при дефиците антител у пациентов, а также лечения состояний, связанных с иммунодефицитом, воспалительных и аутоиммунных заболеваний и острых инфекций у пациентов. Иммуноглобулин, полученный из плазмы, стал основным продуктом плазмы, и его потребление во всем мире растет. Продукты иммуноглобулинов человека, как гипериммунные (или «специфические»), так и нормальные (или «неспецифические»), преимущественно состоят из IgG. К гипериммунным иммуноглобулинам относят иммуноглобулины против гепатита В, столбняка, ветряной оспы и бешенства; 30 каждый из которых содержит известную концентрацию конкретных антител.

Специфичность антител в нормальных поливалентных иммуноглобулинах человека (IG) аналогична таковой в популяции доноров. Список иммуноглобулинов, одобренных FDA, доступен по адресу <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/approved-blood-products/immune-globulins>. В настоящее время доступно несколько коммерческих продуктов для внутривенного введения ИГ (IVIG) (обычно стабилизированные растворы с концентрацией 5 % или 10 % (мас./об.), включая Privigen® (CSL Behring), Flebogamma® (Grifols), Gamunex®-C (Grifols), Gammagard® (Takeda) и Octagam® (Octapharma). Совсем недавно стало доступно подкожное введение ИГ (SCIG). Коммерческие продукты SCIG (обычно 10 %, 16,5 % или 20 % (мас./об.) стабилизированные растворы) включают в себя Hizentra® (CSL Behring), Gamunex®-C (Grifols), Xembify® (Grifols), Cutaquig® (Octapharma) и Cuvitru® (Takeda). Другие продукты ИГ вводят внутримышечно (IMIG).

Продукты ИГ в основном содержат IgG с определенным распределением подклассов: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Однако продукты ИГ могут различаться по разным параметрам: концентрации мономеров, димеров и агрегатов IgG; содержание IgA и IgM; стабилизаторы; добавки; и уровни примесей (таких как протеазы, подобные фактору XI/XIa). В отношении IgA признано, что он может вызывать анафилактические реакции у пациентов с дефицитом IgA. По этой причине желательно, чтобы продукты ИГ содержали низкие количества IgA. Свойства продуктов ИГ, содержащих IgG, также должны соответствовать требованиям местной и/или региональной Фармакопеи для регистрации в соответствующей юрисдикции (например, Нормальный иммуноглобулин человека для подкожного введения, монография Eur. Ph. 2788).

Существующие способы очистки IgG из плазмы и ее фракций включают в себя хроматографию (например, аффинную хроматографию, анионообменную хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия, эксклюзионную ВЭЖХ) и нехроматографические методы очистки (осаждение и жидкостная экстракция). Основными препятствиями существующих методов являются высокая стоимость и время очистки IgG, необходимость совместной очистки других белков из той же плазмы или ее фракций (например, альбумина и факторов свертывания крови), а также необходимость гарантировать, что продукт имеет подходящее качество (например, чистота и стабильность) для терапевтического применения. Например, аффинные смолы, используемые в

аффинной хроматографии, могут иметь относительно низкую связывающую способность, а хроматографическая очистка из партии среднего размера может достигать объемов в несколько сотен литров (в отличие от фракций плазмы, которые обычно исчисляются тысячами литров), что требует огромных капиталовложений в количество используемой смолы, инфраструктуру для обработки и упаковку хроматографических колонок, а также эксплуатационные расходы. В настоящее время с использованием существующих технологий из плазмы можно извлечь до 70-75 % присутствующих в плазме IgG.

Поэтому специалисту в данной области техники будет очевидно, что существует потребность в улучшенных способах очистки IgG из плазмы или ее фракций.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на выявлении изобретателями способа очистки IgG из плазмы или ее фракции с высокими выходами (например, $\geq 75\%$). Этот метод также позволяет извлекать IgG из плазмы или ее фракции с высокой чистотой (например, $\geq 95\%$). В частности, авторы изобретения обнаружили, что использование непрерывной аффинной хроматографии (например, хроматографии с псевдодвижущимся слоем (SMB)) со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG, приводило к очистке с высокими выходами и чистотой IgG из плазмы с минимальным влиянием на распределение подклассов IgG (т.е. IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), по сравнению с существующими продуктами. Кроме того, авторы изобретения обнаружили, что способ дополнительно улучшается при использовании определенных буферов для промывки и регенерации. Этот способ преимущественно позволяет использовать меньшие объемы хроматографических буферов и многократно использовать аффинные смолы (по меньшей мере 50 циклов), что дополнительно снижает стоимость очистки IgG из плазмы или ее фракции.

Соответственно, открытия изобретателей служат основой для способа получения препарата, обогащенного IgG. Полученные данные также обеспечивают основу для фармацевтической композиции, содержащей препарат, обогащенный IgG, а также для применения композиции или IgG для лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования у субъекта заболевания (например, первичного иммунодефицита, хронической воспалительной

демиелинизирующей полиневропатии и хронической иммунной тромбоцитопенической пурпуры).

Настоящее изобретение обеспечивает смолу для аффинной хроматографии, содержащую лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием аффинной хроматографии, причем способ включает связывание IgG со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG, и сбор IgG.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ получения обогащенного IgG препарата из плазмы или ее фракции с использованием аффинной хроматографии, причем способ включает в себя связывание IgG со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG, и сбор IgG.

Настоящее изобретение обеспечивает способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием непрерывной аффинной хроматографии, причем способ включает связывание IgG со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG, и сбор IgG.

Настоящее изобретение также относится к способу получения обогащенного IgG препарата из плазмы или ее фракции с использованием непрерывной аффинной хроматографии, при этом способ включает в себя связывание IgG со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG, и сбор IgG.

В одном примере смола содержит лиганд, содержащий фрагмент однодоменного антитела [VНН], полученного от верблюжьих. Например, лиганд представляет собой фрагмент антитела VНН. В одном примере лиганд не содержит домен СН1.

В одном примере смола содержит матрицу, выбранную из группы, включающей в себя матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) и матрицу на основе агарозы. Например, матрица представляет собой сшитую

поли(стирол-дивинилбензольную) матрицу. В другом примере матрица представляет собой матрицу на основе агарозы.

В одном примере смола содержит лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG, при этом лиганд конъюгирован со сшитой поли(стирол-дивинилбензольной) матрицей. Например, смола содержит лиганд, содержащий фрагмент антитела VHH, конъюгированный со сшитой матрицей из поли(стирол-дивинилбензола).

В одном примере смола содержит лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG и матрицу на основе агарозы. Например, смола содержит лиганд, содержащий фрагмент антитела VHH, конъюгированный с матрицей на основе агарозы.

В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или последовательность, содержащую по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1. В одном примере антигенсвязывающий белок VHH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В одном примере антигенсвязывающий белок VHH содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1.

В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1 или последовательность, содержащую по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1. В одном примере каркасная область содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1. В другом примере каркасная область содержит последовательность, содержащую по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1.

В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий аминокислотную последовательность, состоящую из 4 каркасных областей, FR1, FR2, FR3 и FR4, и 3 области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, которые функционально связаны в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где:

а) CDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID No: 2 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 2 одним или двумя аминокислотными остатками;

5 б) CDR2 имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3; и,

10 в) CDR3 имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4; и, где каждая из каркасных областей имеет по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с каркасной аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 1; и

15 где каждая из каркасных областей имеет по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с каркасной аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1.

В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий аминокислотную последовательность, которая содержит 4 каркасные области, FR1, FR2, FR3 и FR4, и 3 области, определяющие комплементарность, CDR1, CDR2 и CDR3, которые функционально связаны в порядке FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, где:

20 а) CDR1 имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID No: 2 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 2 одним или двумя аминокислотными остатками;

25 б) CDR2 имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3; и,

30 в) CDR3 имеет аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4; и, где каждая из каркасных областей имеет по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с каркасной аминокислотной последовательностью любой из SEQ ID NO: 1, и

где каждая из каркасных областей имеет по меньшей мере 50 % аминокислотной идентичности с каркасной аминокислотной

последовательностью SEQ ID NO: 1 и при этом антигенсвязывающий белок специфически связывается с доменом Fc молекулы IgG человека и не связывается с молекулой IgG мышиноного или бычьего происхождения.

5 В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий CDR1, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID No: 2 или аминокислотную последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 2 одним или двумя аминокислотными остатками.

10 В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий CDR2, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3.

15 В одном примере смола содержит антигенсвязывающий белок VHH, содержащий CDR3, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80 % идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4.

20 В одном примере способ дополнительно включает в себя промывку смолы промывочным буфером. Например, способ включает в себя промывку смолы промывочным буфером перед сбором IgG. Например, способ включает в себя промывку смолы промывочным буфером перед сбором связанного IgG.

25 В одном примере способ дополнительно включает в себя промывку смолы промывочным буфером как часть сбора IgG. Например, способ дополнительно включает в себя промывание смолы промывочным буфером как часть сбора связанного IgG. В таком способе промывка может удалить несвязанный или слабосвязанный IgG из смолы. Такой несвязанный или слабосвязанный IgG можно выбросить перед сбором связанного IgG. Альтернативно собирают несвязанный или слабосвязанный IgG. В одном примере собирают связанный, несвязанный и слабосвязанный IgG. В одном примере собирают связанный и слабосвязанный IgG. В другом примере несвязанный и слабосвязанный IgG не собирают.

30 В одном примере способ включает в себя промывку смолы промывочным буфером до сбора IgG. Например, способ включает в себя промывку примесей из смолы промывочным буфером и сбор IgG. В одном примере способ включает в себя промывку смолы промывочным буфером до сбора IgG и сбор элюата. В

одном примере элюат содержит примеси. В одном примере способ включает в себя промывку смолы промывочным буфером до сбора IgG и сбор примесей в элюате. Например, способ включает в себя сбор примесей из смолы с помощью промывочного буфера. В одном примере собирают примеси и IgG. Например, примеси и IgG собирают вместе. В другом примере примеси и IgG собирают отдельно.

В одном примере способ включает в себя сбор промывочной фракции. Например, способ включает в себя сбор промывочной фракции до сбора IgG. В одном примере промывочная фракция содержит примеси. В одном примере промывочная фракция содержит IgG. Например, промывочная фракция содержит несвязанный IgG. В одном примере промывочная фракция содержит слабосвязанный IgG. В другом примере промывочная фракция содержит несвязанный и слабосвязанный IgG. В одном примере промывочная фракция содержит примеси и IgG.

В одном примере примеси содержат альбумин (α -глобулины и/или β -глобулины), липиды плазмы, белки плазмы, протеазы (например, сериновые протеазы, калликреин, плазмин и FXa), ингибиторы сериновых протеаз (например, ингибитор C1, альфа-1-антитрипсин и антитромбин) IgA и IgM, фактор VIII, фибриноген, фактор фон Виллебранда, активированные факторы свертывания крови (например, FXa, FIXa, FVIIa и тромбин), фактор XIII, факторы контактной системы (например, FXIa, FXIIa и плазменный калликреин), PKA, фактор IX, протромбиновый комплекс, ингибитор эстеразы C1, белок C, антитромбин III, иммуноглобулин RhD и/или микрочастицы мембран тромбоцитов.

В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием способа, описанного в настоящей заявке.

В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой препарат, обогащенный IgG. В другом примере белковый продукт плазмы содержит очищенный IgG.

В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием связанного, несвязанного и/или слабосвязанного IgG. Например, связанный, несвязанный и/или слабосвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием связанного IgG. Например, связанный IgG используют для

получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием несвязанного IgG. Например, несвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием слабосвязанного IgG. Например, слабосвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием связанного и слабосвязанного IgG. Например, связанный и слабосвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием несвязанного и слабосвязанного IgG. Например, несвязанный и слабосвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием связанного и несвязанного IgG. Например, связанный и несвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием связанного, несвязанного и слабосвязанного IgG. Например, связанный, несвязанный и слабосвязанный IgG используют для получения белкового продукта плазмы.

В одном примере белковый продукт плазмы получают с использованием примесей. Например, примеси собирают и используют для получения белкового продукта плазмы.

В одном примере белковый продукт плазмы выбирают из группы, включающей в себя альбумин, сериновую протеазу, плазмин, FXa, альфа-1-антитрипсин, IgA, IgM, фактор VIII, фибриноген, фактор фон Виллебранда, активированный фактор свертывания крови, фактор XIII, фактор контактной системы, PKA, фактор IX, протромбиновый комплекс, ингибитор эстеразы C1, белок C, антитромбин III, белковый продукт иммуноглобулина RhD.

В одном примере активированный фактор свертывания крови выбирают из группы, включающей в себя FXa, FIXa, FVIIa и тромбин. Например, активированный фактор свертывания крови представляет собой FXa. Например, активированный фактор свертывания крови представляет собой FIXa. Например, активированный фактор свертывания крови представляет собой FVIIa. Например, активированный фактор свертывания крови представляет собой тромбин.

В одном примере белок фактора контактной системы выбирают из группы, включающей в себя FXIa, FXIIa и калликреин. Например, белок фактора контактной системы представляет собой FXIa. Например, белок фактора контактной системы представляет собой FXII. Например, белок фактора контактной системы представляет собой калликреин.

В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт альбумина. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт сериновой протеазы. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт плазмина. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт FXa. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт альфа-1-антитрипсин. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт IgA. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт IgM. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт фактора VIII. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт фибриногена. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт фактора фон Виллебранда. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт активированного фактора свертывания крови. Например, белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт FIXa. Например, белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт FIXa. Например, белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт FVIIa. Например, белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт тромбина.

В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт фактора XIII. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт фактора контактной системы. Например, белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт FXIa. Например, белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт FXII. Например, белковый продукт плазмы представляет собой калликреиновый продукт плазмы. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт PKA. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт фактора IX. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт протромбинового

комплекса. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт ингибитора эстеразы C1. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт белка C. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт антитромбина III. В одном примере белковый продукт плазмы представляет собой белковый продукт иммуноглобулина RhD.

В одном примере промывочный буфер имеет рН от 5 до 9 и константу диссоциации (рКа) от 6,8 до 8,5 при 25 °С. В одном примере промывочный буфер имеет рН от 5 до 10 и константу диссоциации (рКа) от 6,8 до 8,5 при 25 °С.

В одном примере промывочный буфер имеет рН от 5 до 10. В одном примере промывочный буфер имеет рН от 5 до 9. Например, рН промывочного буфера составляет 5, или 5.1, или 5.2, или 5.3, или 5.4, или 5.5, или 5.6, или 5.7, или 5.8, или 5.9, или 6.0, или 6.1, или 6.2, или 6.3, или 6.4, или 6.5, или 6.6, или 6.7, или 6.8, или 6.9, или 7, или 7.1, или 7.2, или 7.3, или 7.4, или 7.5, или 7.6 или 7.7 или 7.8, или 7.9, или 8.0, или 8.1, или 8.2, или 8.3, или 8.4, или 8.5, или 8.6, или 8.7, или 8.8, или 8.9, или 9.0, или 9.1, или 9.2, или 9.3, или 9.4, или 9.5, или 9.6, или 9.7, или 9.8, или 9.9 или 10.0.

В одном примере промывочный буфер имеет рН от 7 до 10 и константу диссоциации (рКа) от 6,8 до 8,5 при 25 °С.

В одном примере промывочный буфер имеет рН от 7 до 8 и константу диссоциации (рКа) от 6,8 до 8,5 при 25 °С.

В одном примере промывочный буфер имеет рН от 7 до 8. Например, промывочный буфер имеет рН 7, или 7.1, или 7.2, или 7.3, или 7.4, или 7.5, или 7.6 или 7.7 или 7.8, или 7.9 или 8.0. В одном примере промывочный буфер имеет рН 7,4.

В одном примере промывочный буфер имеет рН от 7,4 до 7,8. Например, промывочный буфер имеет рН 7,4, или 7,5, или 7,6, или 7,7 или 7,8.

В одном примере промывочный буфер имеет рКа от 6,8 до 8,5 при 25 °С. Например, промывочный буфер имеет рКа 6,8, или 6,9, или 7.0, или 7.1, или 7.2, или 7.3, или 7.4, или 7.5, или 7.6, или 7.7, или 7.8, или 7.9, или 8.0, или 8.1, или 8.2, или 8.3, или 8.4 или 8,5 при 25 °С.

В одном примере промывочный буфер имеет рКа 7,21 при 25 °С.

В одном примере промывочный буфер имеет рН 7,4 и константу диссоциации (рКа) 7,21 при 25 °С.

В одном примере промывочный буфер содержит буферный агент, выбранный из группы, включающей в себя дигидрофосфат натрия, цитрат натрия, имидазол, Трис, глицилглицин, 3-морфолинопропан-1-сульфоновую кислоту (MOPS), пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновую кислоту) (PIPES), 2-[(2-Гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил)амино]этансульфоновую кислоту (TES), бис[(2-гидроксиэтил)амино]уксусную кислоту (Бицин), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPPES), сернистую кислоту, 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновую кислоту (EPPS), N-(Гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-гидроксипропансульфоновую кислоту (HEPPSO), 4-(N-Морфолино)бутансульфоновую кислоту (MOBS), Пиперазин-N,N'-бис(2-гидроксипропансульфоновую кислоту) (POPSO), N-[Трис(гидроксиметил)метил]-3-амино-2-гидроксипропансульфоновую кислоту (TAPSO), Трицин, триэтаноламин (ТЭА) и их комбинации. Например, промывочный буфер представляет собой буфер на основе дигидрофосфата натрия. Например, промывочный буфер представляет собой имидазольный буфер. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер Трис. В другом примере промывочный буфер представляет собой глицилглициновый буфер. В одном примере промывочный буфер представляет собой буфер MOPS. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер PIPES. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер TES. В одном примере промывочный буфер представляет собой бициновый буфер. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер сернистой кислоты. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер EPPS. В одном примере промывочный буфер представляет собой буфер HEPPSO. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер MOBS. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер POPSO. В одном примере промывочный буфер представляет собой буфер TAPSO. В другом примере промывочный буфер представляет собой трициновый буфер. В другом примере промывочный буфер представляет собой буфер ТЕА. В одном примере промывочный буфер представляет собой буфер цитрата натрия.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации от 5 мМ до 200 мМ. Например, буферный агент промывочного

буфера находится в концентрации от 5 мМ до 10 мМ, или от 5 мМ до 20 мМ, или от 5 мМ до 50 мМ, или от 50 мМ до 100 мМ, или от 100 мМ до 150 мМ или от 150 мМ до 200 мМ. В другом примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ, или 105 мМ, или 110 мМ, или 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ или 200 мМ.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 5 мМ.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 20 мМ.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 50 мМ.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 100 мМ.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 150 мМ.

В одном примере буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 200 мМ.

В одном примере промывочный буфер дополнительно содержит хлорид натрия. Например, промывочный буфер дополнительно содержит хлорид натрия в концентрации до 1000 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 5 мМ и 50 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ или 50 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 50 мМ и 100 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 100 и 200 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 105 мМ, или 110 мМ, 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150

мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ, или 200 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 200 и 300 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 200 мМ, или 225 мМ, или 250 мМ, или 275 мМ
5 или 300 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 300 и 400 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 300 мМ, или 325 мМ, или 350 мМ, или 375 мМ, или 400 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 400 мМ и 500 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 400 мМ, или 425 мМ, или 450 мМ, или 475 мМ, или
10 400 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 500 мМ и 1000 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 500 мМ, или 550 мМ, или 600 мМ, или 650 мМ, или 700 мМ, или 750 мМ, или 800 мМ, или 850 мМ, или 900 мМ, или 950 мМ, или 1000 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации менее 1000 мМ. Например, хлорид натрия находится
15 в концентрации 500 мМ.

В одном примере промывочный буфер дополнительно содержит хлорид натрия, при этом хлорид натрия находится в концентрации 145 мМ.

В одном примере промывочный буфер дополнительно содержит хлорид натрия, при этом хлорид натрия находится в концентрации 500 мМ.

20 В одном примере промывочный буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеет рН 7,4.

В одном примере промывочный буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеет рН 7,4.

25 В одном примере промывочный буфер дополнительно содержит двухвалентную соль. Например, промывочный буфер дополнительно содержит двухвалентную соль в концентрации до 1000 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 5 мМ и 50 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ. В
30 другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 50 мМ и 100 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 100 и 200 мМ. Например, двухвалентная соль находится в

концентрации 105 мМ, или 110 мМ, 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ или 200 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в
5 концентрации от 200 и 300 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 200 мМ, или 225 мМ, или 250 мМ, или 275 мМ или 300 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 300 и 400 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 300 мМ, или 325 мМ, или 350 мМ, или 375 мМ, или 400 мМ. В одном примере двухвалентная соль
10 находится в концентрации от 400 мМ и 500 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 400 мМ, или 425 мМ, или 450 мМ, или 475 мМ, или 400 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 500 мМ и 1000 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 500 мМ, или 550 мМ, или 600 мМ, или 650 мМ, или 700 мМ, или 750 мМ, или 800
15 мМ, или 850 мМ, или 900 мМ, или 950 мМ или 1000 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации 500 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации менее 1000 мМ.

В одном примере промывочный буфер содержит хлорид натрия и/или двухвалентную соль в концентрации до 1000 мМ. Например, промывочный
20 буфер содержит хлорид натрия и/или двухвалентную соль в концентрации приблизительно 500 мМ.

В одном примере двухвалентную соль выбирают из группы, включающей в себя хлорид магния, хлорид кальция, хлорид бария, хлорид меди (II), хлорид никеля, хлорид марганца и их комбинацию. Например, двухвалентная соль
25 представляет собой хлорид магния. В одном примере двухвалентная соль представляет собой хлорид кальция. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид бария. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид меди. В одном примере двухвалентная соль представляет собой хлорид никеля. В другом примере двухвалентная соль
30 представляет собой хлорид марганца.

В одном примере способ включает в себя сбор IgG путем элюирования IgG из смолы элюирующим буфером. Например, способ включает в себя сбор связанного IgG путем элюирования связанного IgG из смолы элюирующим буфером.

В одном примере элюирующий буфер имеет рН от 3 до 5. Например, элюирующий буфер имеет рН 3 или 3,1, или 3,2, или 3,3, или 3,4, или 3,5, или 3,6, или 3,7, или 3,8, или 3,9, или 4, или 4,1, или 4,2, или 4,3, или 4,4, или 4,5, или 4,6, или 4,7, или 4,8, или 4,9 или 5.

5 В одном примере элюирующий буфер имеет рН 4.

В одном примере элюирующий буфер содержит буферный агент, выбранный из группы, включающей в себя ацетат натрия, уксусную кислоту и цитрат натрия. В одном примере элюирующий буфер содержит ацетат натрия, уксусную кислоту, цитрат натрия и дигидрофосфат натрия. В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит натрий-фосфатный буфер и/или ацетатный буфер. Например, элюирующий буфер содержит ацетат натрия. Например, элюирующий буфер содержит уксусную кислоту. Например, элюирующий буфер содержит цитрат натрия. Например, элюирующий буфер содержит дигидрофосфат натрия.

15 В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации от 5 мМ до 200 мМ. Например, буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации от 5 мМ до 10 мМ, или от 5 мМ до 20 мМ, или от 5 мМ до 50 мМ, или от 50 мМ до 100 мМ, или от 100 мМ до 150 мМ, или от 150 мМ до 200 мМ. Например, буферный агент промывочного буфера находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ, или 105 мМ, или 110 мМ, или 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ или 200 мМ.

В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации 5 мМ.

В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации 20 мМ.

В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации 50 мМ.

В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации 100 мМ.

В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации 150 мМ.

В одном примере буферный агент элюирующего буфера находится в концентрации 200 мМ.

5 В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит ацетатный буфер. Например, натрий-ацетатный буфер.

10 В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный буфер и/или ацетатный буфер. Например, элюирующий буфер представляет собой или содержит дигидрофосфат натрия и натрий-ацетатный буфер. В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный буфер.

15 В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит ацетатный буфер с рН от 3 до 5. Например, элюирующий буфер представляет собой или содержит ацетатный буфер с рН 3, или 3.1, или 3.2, или 3.3, или 3.4, или 3.5, или 3.6, или 3.7, или 3.8, или 3.9, или 4, или 4.1, или 4.2, или 4.3, или 4.4, или 4.5, или 4.6, или 4.7, или 4.8, или 4.9, или 5. В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит ацетатный буфер с рН 4. Например, элюирующий буфер представляет собой или содержит натрий-ацетатный буфер с рН 4.

20 В одном примере элюирующий буфер представляет собой или фосфатный и/или ацетатный буфер с рН от 3 до 5. Например, элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный и/или ацетатный буфер с рН 3, или 3.1, или 3.2, или 3.3, или 3.4, или 3.5, или 3.6, или 3.7, или 3.8, или 3.9, или 4, или 4.1, или 4.2, или 4.3, или 4.4, или 4.5, или 4.6, или 4.7, или 4.8, или 4.9, или 5. В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный и/или ацетатный буфер с рН 4.

30 В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный буфер с рН от 3 и 5. Например, элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный буфер с рН 3, или 3.1, или 3.2, или 3.3, или 3.4, или 3.5, или 3.6, или 3.7, или 3.8, или 3.9, или 4, или 4.1, или 4.2, или 4.3, или 4.4, или 4.5, или 4.6, или 4.7, или 4.8, или 4.9, или 5. В одном примере элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный буфер с рН 4.

В одном примере элюирующий буфер содержит 10 мМ, или 11 мМ, или 12 мМ, или 13 мМ, или 14 мМ, или 15 мМ, или 16 мМ, или 17 мМ, или 18 мМ, или 19 мМ, или 20 мМ фосфатного и/или ацетатного буфера.

5 В одном примере элюирующий буфер содержит 10 мМ, или 11 мМ, или 12 мМ, или 13 мМ, или 14 мМ, или 15 мМ, или 16 мМ, или 17 мМ, или 18 мМ, или 19 мМ, или 20 мМ ацетатного буфера. Например, элюирующий буфер содержит 20 мМ ацетатного буфера. В одном примере элюирующий буфер содержит 20 мМ натрий-ацетатного буфера.

10 В одном примере элюирующий буфер содержит 10 мМ, или 11 мМ, или 12 мМ, или 13 мМ, или 14 мМ, или 15 мМ, или 16 мМ, или 17 мМ, или 18 мМ, или 19 мМ, или 20 мМ фосфатного буфера. Например, элюирующий буфер содержит 20 мМ фосфатного буфера. В одном примере элюирующий буфер содержит 20 мМ натрий-фосфатного буфера.

15 В одном примере элюирующий буфер содержит 20 мМ ацетата натрия с рН 4.

20 В одном примере элюирующий буфер дополнительно содержит хлорид натрия. Например, элюирующий буфер дополнительно содержит хлорид натрия в концентрации до 150 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 50 до 100 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ, или 50 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 100 до 150 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 105 мМ, 110 мМ, 115 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 145 мМ, или 150 мМ.

25 В одном примере элюирующий буфер дополнительно содержит двухвалентную соль. Например, элюирующий буфер дополнительно содержит двухвалентную соль в концентрации до 150 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 50 до 100 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 30 40 мМ, 45 мМ, или 50 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 100 до 150 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 55 мМ, 60 мМ, 65 мМ, 70 мМ, 75 мМ, 80 мМ, 85 мМ, 90 мМ, 95 мМ, 100 мМ, 105 мМ, 110 мМ, 115 мМ, 120 мМ, 125 мМ, 130 мМ, 135 мМ, 140 мМ, 145 мМ или 150 мМ.

В одном примере двухвалентную соль выбирают из группы, включающей в себя хлорид магния, хлорид кальция, хлорид бария, хлорид меди (II), хлорид никеля, хлорид марганца и их комбинацию. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид магния. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид кальция. В одном примере двухвалентная соль представляет собой хлорид бария. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид меди. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид никеля. В одном примере двухвалентная соль представляет собой хлорид марганца.

В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером. Например, смолу уравнивают перед загрузкой на смолу плазмы или ее фракции, содержащей IgG.

В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером с рН от 5 до 9. Например, уравнивающий буфер имеет рН 5, или 5.1, или 5.2, или 5.3, или 5.4, или 5.5, или 5.6, или 5.7, или 5.8, или 5.9, или 6.0, или 6.1, или 6.2, или 6.3, или 6.4, или 6.5, или 6.6, или 6.7, или 6.8, или 6.9, или 7, или 7.1, или 7.2, или 7.3, или 7.4, или 7.5, или 7.6, или 7.7, или 7.8, или 7.9, или 8.0, или 8.1, или 8.2, или 8.3, или 8.4, или 8.5, или 8.6, или 8.7, или 8.8, или 8.9 или 9.0.

В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером с рН от 7 до 8. Например, уравнивающий буфер имеет рН 7, или 7.1, или 7.2, или 7.3, или 7.4, или 7.5, или 7.6, или 7.7, или 7.8, или 7.9, или 8. В одном примере уравнивающий буфер имеет рН 7.4.

В одном примере уравнивающий буфер содержит буферный агент, выбранный из группы, включающей в себя дигидрофосфат натрия, цитрат натрия, имидазол, Трис, глицилглицин, MOPS, PIPES, TES, Бицин, HEPES, EPPS, HEPPSO, MOBS, POPSO, TAPSO, Трицин, TEA и их комбинации. Например, уравнивающий буфер представляет собой буфер на основе дигидрофосфата натрия. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой натрий-цитратный буфер. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой имидазольный буфер. В одном примере уравнивающий буфер представляет собой буфер Трис. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой глицилглициновый буфер. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер

MOPS. В одном примере уравнивающий буфер представляет собой буфер PIPES. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер TES. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой бициновый буфер. В одном примере уравнивающий буфер представляет собой буфер сернистой кислоты. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер EPPS. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер HEPPSO. В одном примере уравнивающий буфер представляет собой буфер MOBS. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер POPSO. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер TAPSO. В одном примере уравнивающий буфер представляет собой трициновый буфер. В другом примере уравнивающий буфер представляет собой буфер TEA.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации от 5 мМ и 200 мМ. В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации от 5 мМ до 50 мМ, например в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ или 50 мМ. В другом примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации от 50 мМ до 100 мМ, например, 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ. В другом примере уравнивающий буфер находится в концентрации от 100 мМ до 150 мМ, например 105 мМ, или 110 мМ, или 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ или 150 мМ. В одном примере уравнивающий буфер находится в концентрации от 150 мМ до 200 мМ, например 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ или 200 мМ.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации 5 мМ.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации 20 мМ.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации 50 мМ.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации 100 мМ.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации 150 мМ.

В одном примере буферный агент уравнивающего буфера находится в концентрации 200 мМ.

5 В одном примере уравнивающий буфер дополнительно содержит хлорид натрия. Например, уравнивающий буфер дополнительно содержит хлорид натрия в концентрации до 1000 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 5 мМ до 50 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ,
10 или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 50 мМ и 100 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 100 и 200 мМ. Например,
15 хлорид натрия находится в концентрации 105 мМ, или 110 мМ, 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ, или 200 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 200 и 300 мМ. Например, хлорид
20 натрия находится в концентрации 200 мМ, или 225 мМ, или 250 мМ, или 275 мМ, или 300 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 300 и 400 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 300 мМ, или 325 мМ, или 350 мМ, или 375 мМ, или 400 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 400 мМ и 500 мМ. Например, хлорид натрия
25 находится в концентрации 400 мМ, или 425 мМ, или 450 мМ, или 475 мМ, или 400 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 500 мМ и 1000 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 500 мМ, или 550 мМ, или 600 мМ, или 650 мМ, или 700 мМ, или 750 мМ, или 800 мМ, или 850 мМ, или 900 мМ, или 950 мМ или 1000 мМ. В одном примере хлорид натрия
30 находится в концентрации менее 1000 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 500 мМ.

В одном примере уравнивающий буфер дополнительно содержит хлорид натрия, при этом хлорид натрия находится в концентрации 145 мМ.

В одном примере уравнивающий буфер дополнительно содержит хлорид натрия, при этом хлорид натрия находится в концентрации 500 мМ.

В одном примере уравнивающий буфер дополнительно содержит двухвалентную соль. Например, уравнивающий буфер дополнительно содержит двухвалентную соль в концентрации до 1000 мМ. В одном примере 5 двухвалентная соль находится в концентрации от 5 мМ до 50 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 50 мМ и 100 10 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ или 100 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 100 и 200 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 105 мМ, или 110 мМ, 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 15 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ или 200 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 200 и 300 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 200 мМ или 225 мМ, или 250 мМ, или 275 мМ или 300 мМ. В 20 другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 300 и 400 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 300 мМ, или 325 мМ, или 350 мМ, или 375 мМ или 400 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 400 мМ и 500 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 400 мМ, или 425 мМ, или 450 мМ, или 475 мМ или 25 400 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 500 мМ и 1000 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 500 мМ, или 550 мМ, или 600 мМ, или 650 мМ, или 700 мМ, или 750 мМ, или 800 мМ, или 850 мМ, или 900 мМ, или 950 мМ или 1000 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации менее 1000 мМ. Например, 30 двухвалентная соль находится в концентрации 500 мМ.

В одном примере двухвалентная соль выбирают из группы, включающей в себя хлорид магния, хлорид кальция, хлорид бария, хлорид меди (II), хлорид никеля, хлорид марганца и их комбинацию. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид магния. В одном примере двухвалентная соль

представляет собой хлорид кальция. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид бария. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид меди. В одном примере двухвалентная соль представляет собой хлорид никеля. В другом примере двухвалентная соль представляет собой хлорид марганца.

В одном примере состав уравнивающего буфера такой же, как и у промывочного буфера. Например, уравнивающий буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеет рН 7,4. В другом примере уравнивающий буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеет рН 7,4.

В одном примере смолу уравнивают i) после стриппинга смолы или ii) без стриппинга смолы. Например, смолу уравнивают после стриппинга смолы. В другом примере смолу уравнивают без стриппинга смолы.

В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание смолы после стриппинга смолы с помощью уравнивающего буфера, имеющего рН от 7 до 8.

В одном примере способ необязательно включает в себя стриппинг смолы буфером для стриппинга после сбора IgG из смолы. Например, способ дополнительно включает в себя стриппинг смолы буфером для стриппинга после сбора IgG из смолы. В другом примере способ не включает в себя стриппинг смолы буфером для стриппинга после сбора IgG из смолы. Например, смолу удаляют после сбора IgG из смолы.

В одном примере буфер для стриппинга имеет рН от 2 до 3. Например, буфер для стриппинга имеет рН 2, или 2,1, или 2,2, или 2,3, 2,4, или 2,5, или 2,6, или 2,7, или 2,8, или 2,9 или 3. В одном примере буфер для стриппинга имеет рН 2,5.

В одном примере буфер для стриппинга содержит буферный агент, выбранный из группы, включающей в себя дигидрофосфат натрия, глицин и цитрат натрия. Например, буфер для стриппинга содержит дигидрофосфат натрия. Например, буфер для стриппинга содержит глицин. Например, буфер для стриппинга содержит цитрат натрия.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации от 10 мМ до 500 мМ. Например, буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации от 10 мМ до 20 мМ, или от 10 мМ до 50

мМ, или от 10 мМ до 100 мМ, или от 10 мМ до 100 мМ, или от 10 мМ до 200 мМ, или от 10 мМ до 300 мМ, или от 10 мМ до 400 мМ. Например, буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ, или 100 мМ, или 105 мМ, или 110 мМ, или 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ, или 200 мМ, или 210 мМ, или 220 мМ, или 230 мМ, или 240 мМ, или 250 мМ, или 260 мМ, или 270 мМ, или 280 мМ, или 290 мМ, или 300 мМ, или 310 мМ, или 320 мМ, или 330 мМ, или 340 мМ, или 350 мМ, или 360 мМ, или 370 мМ, или 380 мМ, или 390 мМ, или 400 мМ, или 410 мМ, или 420 мМ, или 430 мМ, или 440 мМ, или 450 мМ, или 460 мМ, или 470 мМ, или 480 мМ, или 490 мМ или 500 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 5 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 20 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 50 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 100 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 150 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 200 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 250 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 300 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 350 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 400 мМ.

В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 450 мМ.

5 В одном примере буферный агент буфера для стриппинга находится в концентрации 500 мМ.

В одном примере буфер для стриппинга содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия и имеет рН 2,5.

10 В одном примере буфер для стриппинга дополнительно содержит хлорид натрия. Например, буфер для стриппинга дополнительно содержит хлорид натрия в концентрации до 1000 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 5 мМ до 50 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ или 50 мМ. В другом примере хлорид натрия
15 находится в концентрации от 50 мМ до 100 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 95 мМ или 100 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 100 до 200 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 105 мМ, или 110 мМ, 115 мМ, или 120
20 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 мМ, или 195 мМ или 200 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 200 до 300 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 200 мМ, или 225 мМ, или 250 мМ, или 275 мМ
25 или 300 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 300 до 400 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 300 мМ, или 325 мМ, или 350 мМ, или 375 мМ или 400 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 400 мМ до 500 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 400 мМ, или 425 мМ, или 450 мМ, или 475 мМ или
30 400 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации от 500 мМ до 1000 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 500 мМ, или 550 мМ, или 600 мМ, или 650 мМ, или 700 мМ, или 750 мМ, или 800 мМ, или 850 мМ, или 900 мМ, или 950 мМ или 1000 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации менее 1000 мМ.

В одном примере буфер для стриппинга дополнительно содержит двухвалентную соль. Например, буфер для стриппинга дополнительно содержит двухвалентную соль в концентрации до 1000 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 5 мМ до 50 мМ. Например, 5 двухвалентная соль находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 15 мМ, или 20 мМ, или 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ или 50 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 50 мМ и 100 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ, или 80 мМ, или 85 мМ, или 90 мМ, или 10 95 мМ или 100 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 100 до 200 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 105 мМ, или 110 мМ, 115 мМ, или 120 мМ, или 125 мМ, или 130 мМ, или 135 мМ, или 140 мМ, или 145 мМ, или 150 мМ, или 155 мМ, или 160 мМ, или 165 мМ, или 170 мМ, или 175 мМ, или 180 мМ, или 185 мМ, или 190 15 мМ, или 195 мМ или 200 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 200 до 300 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 200 мМ, или 225 мМ, или 250 мМ, или 275 мМ или 300 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 300 до 400 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 300 мМ, или 325 20 мМ, или 350 мМ, или 375 мМ или 400 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации от 400 мМ до 500 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 400 мМ, или 425 мМ, или 450 мМ, или 475 мМ или 400 мМ. В другом примере двухвалентная соль находится в концентрации от 500 мМ до 1000 мМ. Например, двухвалентная соль находится в концентрации 500 25 мМ, или 550 мМ, или 600 мМ, или 650 мМ, или 700 мМ, или 750 мМ, или 800 мМ, или 850 мМ, или 900 мМ, или 950 мМ или 1000 мМ. В одном примере двухвалентная соль находится в концентрации менее 1000 мМ.

В одном примере двухвалентную соль выбирают из группы, включающей в себя хлорид магния, хлорид кальция, хлорид бария, хлорид меди (II), хлорид 30 никеля, хлорид марганца и их комбинацию. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид магния. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид кальция. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид бария. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид меди.

Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид никеля. Например, двухвалентная соль представляет собой хлорид марганца.

В одном примере смолу уравнивают. В одном примере смолу уравнивают после стриппинга смолы. В одном примере способ
5 дополнительно включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером, имеющим рН от 7 до 8 после стриппинга смолы.

В одном примере способ включает в себя:

- а) уравнивание смолы уравнивающим буфером, имеющим рН от 7 до 8;
- 10 б) стриппинг смолы буфером для стриппинга, имеющим рН от 2 до 3 после сбора связанного IgG со смолы; и/или
- в) уравнивание смолы уравнивающим буфером после стриппинга смолы.

В одном примере смола уравновешена без стриппинга смолы. Например,
15 способ включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером после сбора связанного IgG со смолы и без стриппинга смолы буфером для стриппинга. В одном примере способ включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером, имеющим рН от 7 до 8 после сбора связанного IgG со смолы.

20 В одном примере способ дополнительно включает в себя регенерацию смолы.

В одном примере способ дополнительно включает в себя дезинфекцию смолы.

В одном примере способ включает в себя загрузку плазмы или ее фракции
25 на смолу для аффинной хроматографии.

В одном примере плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение по меньшей мере 0,1 минуты во время загрузки плазмы или ее фракции. Например, плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение по меньшей мере 0,25 минут, или 0,5 минут, или 1 минуты, или 1,5 минут, или 2 минут или
30 2,5 минут, или 3 минут, или 3,5 минут, или 4 минут, или 4,5 минут или 5 минут. Например, плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение 0,1 минуты, 0,25 минут, 0,3 минуты, 0,35 минуты, 0,4 минуты, 0,45 минуты, 0,5 минуты или 1 минуты, или 1,5 минут, или 2 минут, или 2,5 минут, или 3 минут, или 3,5 минут, или 4 минут, или 4,5 минут или 5 минут.

В одном примере плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение до 5 минут во время загрузки плазмы или ее фракции.

В одном примере плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение от 0,25 до 5 минут во время загрузки плазмы или ее фракции. Например, во время загрузки плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение 0,25 минут, 0,3 минут, 0,35 минуты, 0,4 минуты, 0,45 минуты, 0,5 минуты, или 1 минуты, или 1,5 минут, или 2 минут, или 2,5 минут, или 3 минут, или 3,5 минут, или 4 минут, или 4,5 минут или 5 минут. В одном примере во время загрузки плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение по меньшей мере 0,25 минут.

В одном примере буфер контактирует со смолой в течение по меньшей мере 0,1 минуты в течение одной или нескольких фаз без загрузки способа.

В одном примере буфер контактирует со смолой в течение до 5 минут в течение одной или нескольких фаз без загрузки метода непрерывной хроматографии.

В одном примере буфер контактирует со смолой в течение от 0,1 до 5 минут в течение одной или нескольких фаз без загрузки метода непрерывной хроматографии. Например, буфер контактирует со смолой в течение по меньшей мере 0,1 минуты, или 0,25 минут, или 0,5 минут, или 1 минуты, или 1,5 минут, или 2 минут или 2,5 минут, или 3 минут, или 3,5 минут, или 4 минут, или 4,5 минут или 5 минут.

В одном примере фазу без загрузки выбирают из группы, включающей в себя фазу уравнивания, фазу промывки, фазу элюирования, фазу стриппинга, фазу повторного уравнивания и их комбинации.

В одном примере фаза без загрузки является фазой уравнивания.

В одном примере фаза без загрузки является фазой промывки.

В одном примере фаза без загрузки является фазой элюирования.

В одном примере фаза без загрузки является фазой стриппинга.

В одном примере фаза без загрузки является фазой повторного уравнивания.

В одном примере буфер, который контактирует со смолой в течение одной или нескольких фаз без загрузки метода непрерывной хроматографии выбирают из группы, включающей в себя буфер для уравнивания, буфер для промывки, буфер для стриппинга и буфер для повторного уравнивания.

Например, буфер представляет собой уравнивающий буфер. В другом примере буфер представляет собой промывочный буфер. В другом примере буфер представляет собой буфер для стриппинга. В одном примере буфер представляет собой буфер для повторного уравнивания.

5 В одном примере уравнивающий буфер контактирует со смолой в течение от 0,1 до 5 минут.

В одном примере промывочный буфер контактирует со смолой в течение от 0,1 до 5 минут.

10 В одном примере элюирующий буфер контактирует со смолой в течение от 0,1 до 5 минут.

В одном примере буфер для стриппинга контактирует со смолой в течение от 0,1 до 5 минут.

15 В одном примере способ включает в себя контактирование смолы с объемом элюирующего буфера, меньшим объема колонки (ОК), перед сбором связанного IgG со смолы. Например, способ включает в себя фазу «предварительного элюирования», при которой смола контактирует с объемом элюирующего буфера, меньшим объема колонки (ОК), перед сбором связанного IgG со смолы. В одном примере способ включает в себя промывку смолы
20 объемом элюирующего буфера, меньшим объема колонки ОК, перед сбором связанного IgG со смолы. Например, объем элюирующего буфера, используемый для промывки смолы до сбора связанного IgG со смолы, составляет до 0,5 ОК. Например, объем элюирующего буфера, используемый для промывки смолы до сбора связанного IgG со смолы, составляет от 0,5 до 1,0 ОК. Например, объем элюирующего буфера, используемый для промывки смолы до сбора связанного
25 IgG со смолы, составляет 0,1 ОК, или 0,2 ОК, или 0,3 ОК, или 0,4 ОК, или 0,5 ОК, или 0,6 ОК, или 0,7 ОК, или 0,8 ОК или 0,9 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,1 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,2 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,3 ОК.

30 В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,4 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,5 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,6 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,7 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,8 ОК.

В одном примере объем элюирующего буфера составляет 0,9 ОК.

В одном примере способ включает в себя элюирование связанного IgG из смолы после выполнения этапа контактирования смолы с объемом элюирующего буфера, меньшим ОК.

5 Специалисту в данной области техники будет очевидно, что обычно IgG присутствует в плазме в концентрации 5-15 г/л плазмы.

В одном примере фракцию плазмы выбирают из группы, включающей в себя криобогащенную плазму, криобедненную плазму, супернатант I (SN I), фракцию Кона II (Fr II), фракцию Кона II+III (Fr II+III), фракцию Кона I+II+III
10 (FrI+II+III), осадок А Кистлера/Ничмана (KN A), осадок В Кистлера/Ничмана (KN B), осадок супернатанта В Кистлера/Ничмана (KN B+1) и их комбинации. В одном примере фракция плазмы представляет собой криобогащенную плазму. Например, фракция плазмы представляет собой криобедненную плазму. Например, фракция плазмы представляет собой супернатант I (SN I). Например,
15 фракция плазмы представляет собой фракцию Кона II (Fr II). Например, фракция плазмы представляет собой фракцию Кона II+III (Fr II+III). Например, фракция плазмы представляет собой фракцию Кона I+II+III (FrI+II+III). Например, фракция плазмы представляет собой осадок А Кистлера/Ничмана (KN A). Например, фракция плазмы представляет собой осадок В Кистлера/Ничмана (KN
20 B). Например, фракция плазмы представляет собой осадок супернатанта В Кистлера/Ничмана (KN B+1).

В одном примере фракция плазмы представляет собой суспендированную пасту. Например, суспендированную пасту выбирают из группы, включающей в себя фракцию Кона II (Fr II), фракцию Кона II+III (Fr II+III), фракцию Кона
25 I+II+III (FrI+II+III), осадок А Кистлера/Ничмана (KN A), осадок В Кистлера/Ничмана (KN B), осадок супернатанта В Кистлера/Ничмана (KN B+1), и их комбинации. Например, суспендированная паста представляет собой пасту фракции Кона II (Fr II). В одном примере суспендированная паста представляет собой пасту фракции Кона II+III (Fr II+III). В другом примере суспендированная
30 паста представляет собой пасту фракции Кона I+II+III (FrI+II+III). В другом примере суспендированная паста представляет собой пасту осадка А Кистлера/Ничмана (KN A). В другом примере суспендированная паста представляет собой пасту осадка В Кистлера/Ничмана (KN B). В другом примере

суспендированная паста представляет собой пасту осадка супернатанта В Кистлера/Ничмана (KN В+1).

5 В одном примере фракцию плазмы выбирают из группы, включающей в себя фракцию плазмы млекопитающих, фракцию плазмы человека, фракцию плазмы лошади и фракцию плазмы быка.

В одном примере фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы млекопитающих.

В одном примере фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы человека.

10 В одном примере фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы лошади.

В одном примере фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы быка.

15 В одном примере фракция плазмы представляет собой фракцию плазмы быка, содержащую человеческие поликлональные антитела.

В одном примере плазму или ее фракцию осветляют. Способы осветления плазмы или ее фракции будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Например, плазму или ее фракцию осветляют путем пропускания плазмы или ее фракции через фильтр. Например, можно 20 использовать глубинный или мембранный фильтр. Например, плазму или ее фракцию пропускают через комбинацию фильтров. Например, комбинация может представлять собой комбинацию мембранных фильтров 1,2 и 0,45/0,22 мкм. Например, плазму или ее фракцию осветляют путем пропускания плазмы или ее фракции через глубинный фильтр (например, глубинный фильтр ВЕСО®).

25 В одном примере плазму или ее фракцию осветляют путем пропускания плазмы или ее фракции через фильтр-пресс (например, интегральная пластина или компактная пластина ВЕСО®), содержащий один или несколько глубинных фильтров. В одном примере фильтр-пресс дополнительно содержит одну или несколько фильтрующих добавок (например, фильтрующие добавки на основе целлюлозы, такие как Diacel® 150). В одном примере плазму или ее фракцию 30 осветляют путем пропускания плазмы или ее фракции через липид-специфичный фильтр (например, фильтр Zeta Plus™ DEL Series). Например, фракция плазмы представляет собой осветленный супернатант I (SN I). Например, фракция плазмы представляет собой осветленную фракцию Кона II (Fr II). Например,

фракция плазмы представляет собой осветленную фракцию Кона II+III (Fr II+III). Например, фракция плазмы представляет собой осветленную фракцию Кона I+II+III (FrI+II+III). Например, фракция плазмы представляет собой осветленный осадок А Кистлера/Ничмана (KN A). Например, фракция плазмы представляет собой осветленный осадок В Кистлера/Ничмана (KN B). Например, фракция плазмы представляет собой осветленный осадок супернатанта В Кистлера/Ничмана (KN B+1).

В одном примере плазма представляет собой осветленную криообогащенную плазму.

В одном примере фракция плазмы представляет собой осветленную криообедненную плазму.

В одном примере плазму или ее фракцию нагревают до первой температуры приблизительно 32 °С и затем охлаждают до второй температуры приблизительно 21°С перед стадией непрерывной аффинной хроматографии. В одном примере плазма или ее фракция имеет первую температуру приблизительно 32 °С, а затем вторую температуру приблизительно 21 °С перед стадией непрерывной аффинной хроматографии.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°С до 35°С перед стадией непрерывной аффинной хроматографии. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°С до 28°С перед стадией непрерывной аффинной хроматографии. Например, температуру в диапазоне от 10°С до 28°С, такую как 10°С, или 11°С, или 12°С, или 13°С, или 14°С, 15°С, или 16°С, или 17°С, или 18°С, или 19°С, или 20°С, или 21°С, или 22°С, или 23°С, или 24°С, или 25°С, или 26°С, или 27°С или 28°С. Например, температуру в диапазоне от 10°С до 28°С, такую как 10°С, или 11°С, или 12°С, или 13°С, или 14°С, 15°С, или 16°С, или 17°С, или 18°С, или 19°С, или 20°С, или 21°С, или 22°С, или 23°С, или 24°С, или 25°С, или 26°С, или 27°С, или 28°С, или 29°С, или 30°С, или 31°С, или 32°С, или 33°С, или 34°С или 35°С. В одном примере плазму или ее фракцию имеет температуру в диапазоне от 2°С до 35°С перед загрузкой на смолу для непрерывной аффинной хроматографии. В одном примере плазму или ее фракцию имеет температуру в диапазоне от 2°С до 28°С перед загрузкой на смолу для непрерывной аффинной хроматографии. Например, температуру в диапазоне от 10°С до 35°С. Например, плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 30°С до 35°С. Например, плазма или

ее фракция имеет температуру по меньшей мере 32°C. Например, плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 32°C до 35°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 32°C. Например, температуру в диапазоне от 10°C до 28°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°C до 25°C. Например, температуру в диапазоне от 10°C до 25°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 20°C до 25°C. Например, плазма или ее фракция имеет температуру 21°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°C до 20°C. Например, температуру в диапазоне от 10°C до 20°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°C до 18°C. Например, температуру в диапазоне от 10°C до 18°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°C до 15°C. Например, температуру в диапазоне от 10°C до 15°C. В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2°C до 10°C. Например, плазма или ее фракция имеет температуру 2°C, или 3°C, или 4°C, или 5°C, или 6°C, или 7°C, или 8°C, или 9°C или 10°C.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 2°C.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 10°C.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 18°C.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 21°C.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 28°C.

В одном примере плазма или ее фракция имеет температуру 32°C.

В одном примере плазма или ее фракция находится при такой температуре до 48 часов. Например, плазму или ее фракцию выдерживают при температуре до 48 ч. перед загрузкой плазмы или ее фракции на смолу для непрерывной аффинной хроматографии. В одном примере плазму или ее фракцию выдерживают при температуре до 2 ч., или 4 ч., или 6 ч., или 8 ч., или 10 ч., или 12 ч., или 14 ч., или 16 ч., или 18 ч., или 20 ч., или 22 ч., или 24 ч., или 26 ч., или 28 ч., или 30 ч., или 32 ч., или 34 ч., или 36 ч., или 38 ч., или 40 ч., или 42 ч., или 44 ч., или 46 ч. перед загрузкой. Например, плазму или ее фракцию выдерживают при температуре в течение от 0 до 2 ч., от 2 до 24 ч., или от 4 до 24 ч., или от 8 до 24 ч., или от 12 до 24 ч., или от 18 до 24 ч., или от 24 до 48 ч., или от 36 до 48 ч. перед загрузкой.

В одном примере перед стадией непрерывной аффинной хроматографии плазма или ее фракция имеет первую температуру в диапазоне от 30°C до 38°C, а затем вторую температуру в диапазоне от 2°C до 28°C. Например, перед стадией непрерывной аффинной хроматографии плазму или ее фракцию нагревают до 5 первой температуры в диапазоне от 30°C до 38°C, а затем охлаждают до второй температуры в диапазоне от 2°C до 28°C. В одном примере перед стадией непрерывной аффинной хроматографии плазму или ее фракцию нагревают до первой температуры в диапазоне от 30°C до 35°C, а затем охлаждают до второй температуры в диапазоне от 18°C до 25°C. Например, плазму или ее фракцию 10 нагревают до первой температуры приблизительно 30°C, или приблизительно 31°C, или приблизительно 32°C, или приблизительно 33°C, или приблизительно 34°C, или приблизительно 35°C. В одном примере плазму или ее фракцию охлаждают до второй температуры приблизительно 18°C, или приблизительно 19°C, или приблизительно 20°C, или приблизительно 21°C, или приблизительно 22°C, или приблизительно 23°C, или приблизительно 24 °C или приблизительно 25 °C.

В одном примере плазма или ее фракция находится при первой и/или второй температуре в течение до 48 ч. Например, плазму или ее фракцию выдерживают при первой и/или второй температуре в течение до 48 ч. перед 20 загрузкой плазмы или ее фракции на смолу для непрерывной аффинной хроматографии. В одном примере перед загрузкой плазму или ее фракцию выдерживают при первой и/или второй температуре в течение до 2 ч., или 4 ч., или 6 ч., или 8 ч., или 10 ч., или 12 ч., или 14 ч., или 16 ч., или 18 ч., или 20 ч., или 22 ч., или 24 ч., или 26 ч., или 28 ч., или 30 ч., или 32 ч., или 34 ч., или 36 ч., 25 или 38 ч., или 40 ч., или 42 ч., или 44 ч., или 46 ч. перед загрузкой. Например, плазму или ее фракцию выдерживают при первой и/или второй температуре в течение от 0 до 2 ч., от 2 до 24 ч., или т о4 до 24 ч., или от 8 до 24 ч., или от 12 до 24 ч., или от 18 до 24 ч., или от 24 до 48 ч., или от 36 до 48 ч.

В одном примере непрерывная аффинная хроматография выбрана из 30 группы, включающей в себя хроматографию с псевдодвижущимся слоем (SMB), периодическую противоточную хроматографию (PCC), непрерывную противоточную тангенциальную хроматографию (CCTC) и непрерывную противоточную спиральную хроматографию (CCSC).

В одном примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой хроматографию с псевдодвижущимся слоем (SMB). В другом примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой периодическую противоточную хроматографию (PCC). В другом примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой непрерывную противоточную тангенциальную хроматографию (CCTC). В одном примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой непрерывную противоточную спиральную хроматографию (CCSC).

В одном примере смола находится в виде суспензии. Например, смола содержит частицы смолы в виде суспензии.

В одном примере суспензию пропускают через одну или несколько колонок, каждая из которых содержит мембрану. Например, мембрана представляет собой полволоконную мембрану.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из двух или более колонок, содержащих мембрану. Например, суспензию пропускают через две, или три, или четыре, или пять, или шесть, или семь, или восемь, или девять, или десять, или одиннадцать, или двенадцать колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из двух колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из трех колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из четырех колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из пяти колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из шести колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из семи колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из восьми колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из девяти колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из десяти колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из одиннадцати колонок.

В одном примере суспензию пропускают через ряд из двенадцати колонок.

В одном примере смола упакована в одну или несколько колонок, где каждая колонка содержит одну или несколько зон. Например, смола упакована в ряд из двух или нескольких колонок. Например, смола упакована в ряд из двух, или трех, или четырех, или пяти, или шести, или семи, или восьми, или девяти, или десяти, или одиннадцати или двенадцати колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из двух колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из трех колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из четырех колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из пяти колонок.

5 В одном примере смола упакована в ряд из шести колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из семи колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из восьми колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из девяти колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из десяти колонок.

10 В одном примере смола упакована в ряд из одиннадцати колонок.

В одном примере смола упакована в ряд из двенадцати колонок.

Например, зону выбирают из группы, включающей в себя зону уравнивания, зону связывания, зону промывки, зону элюирования, зону стриппинга и их комбинацию. В другом примере зону выбирают из группы,

15 включающей в себя зону уравнивания, зону связывания, зону промывки, зону элюирования и их комбинацию. В одном примере зона представляет собой

зону уравнивания. В другом примере зона представляет собой зону связывания. В другом примере зона представляет собой зону промывки. В одном

20 примере зона представляет собой зону элюирования. В другом примере зона представляет собой зону стриппинга. В одном примере зона стриппинга

отсутствует. В другом примере зона представляет собой зону промывки/элюирования. В одном примере зона представляет собой зону

уравнивания/связывания. В другом примере зона представляет собой зону связывания/промывки.

25 В одном примере смолу упаковывают в одну или несколько колонок, причем каждая колонка содержит одну зону.

В одном примере смолу упаковывают в одну или несколько колонок, причем каждая колонка содержит две зоны.

30 В одном примере смолу упаковывают в одну или несколько колонок, причем каждая колонка содержит четыре зоны.

В одном примере две или несколько колонок соединены по текучей среде и разделены трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и

выпускной клапаны.

В одном примере смолу упаковывают в первую колонку и одну или несколько последующих колонок.

В одном примере в первую колонку загружают IgG в концентрации, превышающей емкость динамического связывания (ЕДС) смолы.

5 Определение ЕДС смолы будет очевидным для специалиста в данной области техники и/или описано в настоящей заявке. Например, ЕДС смолы можно определить путем загрузки IgG в колонку и мониторинга концентрации, при которой несвязанный IgG протекает через колонку, например по УФ-следу хроматографической системы. Например, ЕДС смолы составляет 5 мг, или 10 мг,
10 или 20 мг, или 30 мг, или 40 мг, или 50 мг, или 60 мг, или 70 мг IgG на мл смолы.

В одном примере ЕДС смолы составляет по меньшей мере 5 мг IgG на мл смолы.

15 В одном примере ЕДС смолы составляет по меньшей мере 10 мг IgG на мл смолы.

В одном примере ЕДС смолы составляет по меньшей мере 20 мг IgG на мл смолы.

В одном примере ЕДС смолы составляет 40 мг IgG на мл смолы.

20 В одном примере первую колонку загружают посредством IgG в концентрации более 5 мг, или 10 мг, или 20 мг, или 30 мг, или 40 мг, или 50 мг, или 60 мг, или 70 мг IgG на мл смолы.

25 В одном примере первую колонку загружают посредством IgG в концентрации до ЕДС смолы. Например, первую колонку загружают посредством IgG в концентрации до 5 мг, или 10 мг, или 20 мг, или 30 мг, или 40 мг IgG на мл смолы.

В одном примере первую колонку загружают посредством IgG в концентрации более 5 мг IgG на мл смолы.

В одном примере первую колонку загружают посредством IgG в концентрации более 10 мг IgG на мл смолы.

30 В одном примере первую колонку загружают посредством IgG в концентрации более 20 мг IgG на мл смолы.

В одном примере первую колонку загружают посредством IgG в концентрации до 40 мг IgG на мл смолы.

В одном примере одну или несколько последующих колонок загружают посредством IgG в концентрации до ЕДС смолы.

5 В одном примере одну или несколько последующих колонок загружают посредством IgG в концентрации до 5 мг, или 10 мг, или 20 мг, или 30 мг, или 40 мг IgG на мл смолы.

В одном примере одну или несколько последующих колонок загружают посредством IgG в концентрации до 20 мг IgG на мл смолы.

В одном примере одну или несколько последующих колонок загружают посредством IgG в концентрации до 30 мг IgG на мл смолы.

10 В одном примере одну или несколько последующих колонок загружают посредством IgG в концентрации до 40 мг IgG на мл смолы.

В одном примере способ дополнительно включает в себя промывку несвязанного IgG из первой колонки в одну или несколько последующих колонок с помощью промывочного буфера и сбор связанного IgG. Например, 15 связанный IgG собирают из первой и одной или нескольких последующих колонок. Например, связанный IgG собирают из первой колонки без стадии промывки. Например, связанный IgG собирают из первой колонки путем элюирования связанного IgG с помощью элюирующего буфера, описанного в настоящей заявке. Например, связанный IgG собирают из одной или нескольких 20 последующих колонок после промывки промывочным буфером, описанным в настоящей заявке. Например, связанный IgG собирают из одной или нескольких последующих колонок после промывки смолы промывочным буфером и элюирования связанного IgG элюирующим буфером, описанным в настоящей заявке.

25 В одном примере способ дополнительно включает в себя промывку одной или нескольких последующих колонок промывочным буфером, описанным в настоящей заявке и сбор связанного IgG из одной или нескольких последующих колонок.

30 В одном примере способ дополнительно включает в себя стриппинг и/или уравнивание первой колонки в момент сбора связанного IgG из одной или нескольких последующих колонок. В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание первой колонки во время сбора связанного IgG из одной или нескольких последующих колонок. Например, способ не

включает в себя стриппинг первой колонки в момент сбора связанного IgG из одной или нескольких последующих колонок.

5 В одном примере способ дополнительно включает в себя стриппинг и/или уравнивание одной или нескольких последующих колонок во время сбора связанного IgG из первой колонки. В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание одной или нескольких последующих колонок во время сбора связанного IgG из первой колонки. Например, способ не включает в себя стриппинг одной или нескольких последующих колонок во время сбора связанного IgG из первой колонки.

10 В одном примере способ дополнительно включает в себя стриппинг и/или уравнивание первой колонки во время промывки одной или нескольких последующих колонок промывочным буфером, описанным в настоящей заявке. В одном примере способ дополнительно включает в себя уравнивание первой колонки во время промывки одной или нескольких последующих колонок промывочным буфером, описанным в настоящей заявке. Например, способ не включает в себя стриппинг первой колонки во время промывки одной или нескольких последующих колонок промывочным буфером, описанным в настоящей заявке.

20 В одном примере способ дополнительно содержит стриппинг и/или уравнивание одной или нескольких последующих колонок во время промывки первой колонки промывочным буфером, описанным в настоящей заявке. В одном примере способ дополнительно содержит уравнивание одной или нескольких последующих колонок во время промывки первой колонки промывочным буфером, описанным в настоящей заявке. Например, способ не включает в себя стриппинг одной или нескольких последующих колонок во время промывки первой колонки промывочным буфером, описанным в настоящей заявке.

30 В одном примере смола имеет общую высоту слоя по меньшей мере 2 см. Например, смола имеет общую высоту слоя от 2 см до 30 см. Например, смола имеет общую высоту слоя от 10 см до 30 см. Например, смола имеет общую высоту слоя от 30 см до 70 см. Например, смола имеет общую высоту слоя 2 см, или 6 см, или 10 см, или 15 см, или 20 см, или 25 см, или 30 см, или 35 см, или 40 см, или 45 см, или 50 см, или 55 см, или 60 см, или 65 см или 70 см.

В одном примере смола имеет общую высоту слоя по меньшей мере 2 см.

В одном примере смола имеет общую высоту слоя 6 см.

В одном примере смола имеет общую высоту слоя 20 см.

В одном примере смола имеет общую высоту слоя 30 см.

В одном примере смола имеет общую высоту слоя 50 см.

5 В одном примере смола имеет общую высоту слоя 70 см.

В одном примере колонка имеет диаметр от 5 см до 200 см. Например, колонка имеет диаметр 5 см, или 10 см, или 20 см, или 30 см, или 40 см, или 50 см, или 60 см, или 70 см, или 80 см, или 90 см, или 100 см, или 110 см, или 120 см, или 130 см, или 140 см, или 150 см, или 160 см, или 170 см, или 180 см, или
10 190 см или 200 см.

В одном примере колонка имеет диаметр 5 см.

В одном примере колонка имеет диаметр 20 см.

В одном примере колонка имеет диаметр 50 см.

В одном примере колонка имеет диаметр 100 см.

15 В одном примере колонка имеет диаметр 200 см.

В одном примере способ дополнительно включает в себя одну или несколько стадий, выбранных из осаждения этанолом, фракционирования октановой кислотой, мембранной или смоляной хроматографии (например, ионообменной хроматографии, хроматографии с гидрофобным взаимодействием, аффинной хроматографии с изоагглютинином), вирусной инактивации, вирусной фильтрации и ультрафильтрации/диафильтрации, при этом стадии осуществляют до или после стадии непрерывной аффинной хроматографии. Например, способ дополнительно включает в себя осаждение этанолом. Например, способ дополнительно включает в себя фракционирование октановой кислотой.
20 Например, способ дополнительно включает в себя мембранную или смоляную хроматографию. Например, способ дополнительно включает в себя ионообменную хроматографию. Например, способ дополнительно включает в себя анионообменную хроматографию. Например, способ дополнительно включает в себя катионообменную хроматографию. Например, способ включает в себя хроматографию с гидрофобным взаимодействием. Например, способ
30 включает в себя аффинную хроматографию с изоагглютинином. Например, способ дополнительно включает в себя инактивацию вирусов. Например, способ дополнительно включает в себя нанофильтрацию. Например, способ включает в себя содержит ультрафильтрацию/диафильтрацию.

В одном примере способ дополнительно включает в себя анионообменную хроматографию и вирусную фильтрацию.

5 В одном примере способ дополнительно включает в себя инкубацию при низком рН, глубинную фильтрацию, анионообменную хроматографию и вирусную фильтрацию.

В одном примере инкубацию при низком рН осуществляют в присутствии детергента. Например, способ дополнительно включает в себя инкубацию при низком рН в присутствии детергента.

10 В одном примере способ дополнительно включает в себя ионообменную хроматографию, причем стадия ионообменной хроматографии включает в себя стадию анионообменной хроматографии с использованием анионообменной смолы, работающей в проточном режиме.

15 В одном примере собирают проточный элюат и/или элюат после промывки. Например, собирают проточный элюат. В другом примере собирают элюат после промывки. В одном примере собирают проточный элюат и элюат после промывки. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что собирают (т.е. объединяют) только проточную и послепромывочную, а не фазу элюирования.

20 В одном примере анионообменную смолу выбирают из группы, включающей в себя слабый анионообменник, сильный анионообменник и анионообменник смешанного типа.

В одном примере анионообменная смола представляет собой слабый анионообменник.

25 В одном примере анионообменная смола представляет собой анионообменник смешанного типа.

30 В одном примере анионообменная смола представляет собой сильный анионообменник. В одном примере стадия ионообменной хроматографии включает в себя стадию анионообменной хроматографии с использованием сильной анионообменной смолы, работающей в проточном режиме. В одном примере сильная анионообменная смола содержит матрицу, состоящую из матрицы поли(стирол-дивинилбензола). В одном примере сильная анионообменная смола содержит кватернизованную полиэтилениминовую функциональную группу.

В одном примере анионообменную смолу перед уравниванием промывают буфером для предварительного уравнивания. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что стадию предварительного уравнивания осуществляют только для первого опыта и/или после хранения смолы.

В одном примере буфер предварительного уравнивания выбирают из группы, включающей в себя моонатрийфосфат (NaH_2PO_4), динатрийфосфат (Na_2HPO_4), фосфорную кислоту (H_3PO_4) и их комбинации.

В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит Na_2HPO_4 .

В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит H_3PO_4 .

В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит NaH_2PO_4 .

В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 .

В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит буфер в концентрации в диапазоне от 50 мМ до 150 мМ. Например, в концентрации 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, или 150 мМ. В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит буфер в концентрации 100 мМ.

В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит NaH_2PO_4 в концентрации в диапазоне от 50 мМ до 150 мМ. Например, буфер предварительного уравнивания содержит NaH_2PO_4 в концентрации 50 мМ, 60 мМ, 70 мМ, 80 мМ, 90 мМ, 100 мМ, 110 мМ, 120 мМ, 130 мМ, 140 мМ, или 150 мМ. В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит NaH_2PO_4 в концентрации 100 мМ.

В одном примере буфер предварительного уравнивания имеет рН в диапазоне от 5,8 до 6,6. Например, буфер предварительного уравнивания имеет рН приблизительно 5,8, или приблизительно 5,9, или приблизительно 6,0, или приблизительно 6,1, или приблизительно 6,2, или приблизительно 6,3, или приблизительно 6,4, или приблизительно 6,5, или приблизительно 6,6. В одном примере буфер предварительного уравнивания имеет рН 6,2.

В одном примере буфер предварительного уравнивания дополнительно содержит соль. Например, буфер предварительного уравнивания дополнительно содержит хлорид натрия. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации в диапазоне от 100 мМ до 1000 мМ.

5 Например, буфер предварительного уравнивания содержит хлорид натрия в концентрации 100 мМ, 200 мМ, 300 мМ, 400 мМ, 500 мМ, 600 мМ, 700 мМ, 800 мМ, 900 мМ или 1000 мМ. В одном примере буфер предварительного уравнивания содержит хлорид натрия в концентрации 1000 мМ.

10 В одном примере анионообменную смолу предварительно уравнивают буфером для предварительного уравнивания, содержащим 1000 мМ NaH_2PO_4 , и 1000 мМ хлорида натрия, pH 6,2. В одном примере анионообменную смолу предварительно уравнивают буфером для предварительного уравнивания, содержащим 100 мМ NaH_2PO_4 , и 1000 мМ хлорида натрия, pH 6,2.

15 В одном примере объем буфера предварительного уравнивания составляет по меньшей мере 2 ОК. Например, объем буфера предварительного уравнивания составляет 2 ОК, или 3 ОК, или 4 ОК, или 5 ОК, или 6 ОК, или 7 ОК, или 8 ОК, или 9 ОК, или 10 ОК. В одном примере объем буфера предварительного уравнивания составляет от 2 ОК до 10 ОК.

20 В одном примере объем буфера предварительного уравнивания составляет по меньшей мере 10 ОК. Например, объем буфера предварительного уравнивания is 10 ОК, или 11 ОК, или 12 ОК, или 13 ОК, или 14 ОК, или 15 ОК, или 16 ОК, или 17 ОК, или 18 ОК, или 19 ОК, или 20 ОК. В одном примере объем буфера предварительного уравнивания составляет 15 ОК.

25 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, выбранным из группы, включающей в себя моносодийфосфат (NaH_2PO_4), дисодийфосфат (Na_2HPO_4), фосфорную кислоту (H_3PO_4), цитрат натрия, 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), Бис-Трис, L-Гистидин и их комбинации.

30 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим Na_2HPO_4 .

В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим H_3PO_4 .

В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим NaH_2PO_4 .

В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 .

5 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим MES.

В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим цитрат натрия.

10 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим Бис-Трис.

В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим L-гистидин.

15 В одном примере уравнивающий буфер находится в концентрации в диапазоне от 5 мМ до 50 мМ. Например, уравнивающий буфер находится в концентрации 5 мМ, или 10 мМ, или 20 мМ, или 30 мМ, или 40 мМ, или 50 мМ.

В одном примере уравнивающий буфер находится в концентрации 5 мМ. В другом примере уравнивающий буфер находится в концентрации 10 мМ. В другом примере уравнивающий буфер находится в концентрации 20 мМ. В одном примере уравнивающий буфер находится в концентрации 30 мМ. В 20 другом примере уравнивающий буфер находится в концентрации 40 мМ. В другом примере уравнивающий буфер находится в концентрации 50 мМ.

25 В одном примере уравнивающий буфер содержит NaH_2PO_4 в концентрации в диапазоне от 5 мМ до 50 мМ. В одном примере уравнивающий буфер содержит NaH_2PO_4 в концентрации в диапазоне от 10 мМ до 50 мМ. Например, уравнивающий буфер содержит NaH_2PO_4 в концентрации 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ. В одном примере уравнивающий буфер содержит NaH_2PO_4 в концентрации 5 мМ. В одном примере уравнивающий буфер содержит NaH_2PO_4 в концентрации 10 мМ.

30 В одном примере уравнивающий буфер имеет pH в диапазоне от 5,8 до 6,6. Например, уравнивающий буфер имеет pH приблизительно 5,8, или приблизительно 5,9, или приблизительно 6,0, или приблизительно 6,1, или приблизительно 6,2, или приблизительно 6,3, или приблизительно 6,4, или приблизительно 6,5, или приблизительно 6,6. В одном примере уравнивающий буфер имеет pH 6,2.

В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим фосфатный буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6. В одном примере уравнивающий буфер содержит фосфатный буфер рН 6,0. В одном примере уравнивающий буфер содержит фосфатный буфер рН 6,2. В одном примере уравнивающий буфер содержит фосфатный буфер рН 6,6. В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим 5 мМ NaH_2PO_4 , рН 6,2. В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим 10 мМ NaH_2PO_4 , рН 6,2.

10 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим MES буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6. В одном примере уравнивающий буфер содержит MES буфер с рН 6,0. В одном примере уравнивающий буфер содержит MES буфер с рН 6,2. В одном примере уравнивающий буфер содержит MES буфер с рН 6,6.

15 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим буфер Бис-Трис с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6. В одном примере уравнивающий буфер содержит буфер Бис-Трис с рН 6,0. В одном примере уравнивающий буфер содержит буфер Бис-Трис с рН 6,2. В одном примере уравнивающий буфер содержит буфер Бис-Трис с рН 6,6.

20 В одном примере анионообменную смолу уравнивают уравнивающим буфером, содержащим L-гистидиновый буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6. В одном примере уравнивающий буфер содержит L-гистидиновый буфер с рН 6,0. В одном примере уравнивающий буфер содержит L-гистидиновый буфер с рН 6,2. В одном примере уравнивающий буфер содержит L-гистидиновый буфер с рН 6,6.

В одном примере объем уравнивающего буфера составляет по меньшей мере 2 ОК. Например, объем уравнивающего буфера составляет 2 ОК, или 3 ОК, или 4 ОК, или 5 ОК, или 6 ОК, или 7 ОК, или 8 ОК, или 9 ОК или 10 ОК. В одном примере объем уравнивающего буфера составляет от 2 ОК до 10 ОК.

30 В одном примере объем уравнивающего буфера составляет по меньшей мере 10 ОК. Например, объем уравнивающего буфера составляет 10 ОК, или 11 ОК, или 12 ОК, или 13 ОК, или 14 ОК, или 15 ОК, или 16 ОК, или

17 ОК, или 18 ОК, или 19 ОК, или 20 ОК. В одном примере объем уравнивающего буфера составляет 15 ОК.

В одном примере анионообменную смолу загружают посредством IgG в концентрации в диапазоне от 5 г IgG на литр смолы до 15 г IgG на литр смолы.
5 Например, смола содержит 5 г, или 6 г, или 7 г, или 8 г, или 9 г, или 10 г, или 11 г, или 12 г, или 13 г, или 14 г, или 15 г IgG на литр смолы. В одном примере смола содержит 15 г IgG на литр смолы.

В одном примере анионообменную смолу загружают посредством IgG в концентрации в диапазоне от 5 г IgG на литр загрузки до 15 г IgG на л загрузки.
10 Например, смолу загружено посредством 5 г/л, или 6 г/л, или 7 г/л, или 8 г/л, или 9 г/л, или 10 г/л, или 11 г/л, или 12 г/л, или 13 г/л, или 14 г/л или 15 г/л IgG. В одном примере смола содержит 15 г IgG на литр загрузки.

В одном примере стадия анионообменной хроматографии включает в себя промывочный буфер после загрузки, выбранный из группы, включающей в себя
15 фосфатный буфер, натрий-цитратный буфер, буфер 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, буфер уксусной кислоты, буфер Бис-трис и L-гистидиновый буфер. В одном примере стадия анионообменной хроматографии включает в себя промывочный буфер после загрузки, выбранный из группы, включающей в себя фосфатный буфер, натрий-цитратный буфер и
20 буфер уксусной кислоты.

В одном примере промывочный буфер после загрузки находится в концентрации в диапазоне от 5 мМ до 50 мМ. В одном примере промывочный буфер после загрузки находится в концентрации в диапазоне от 10 мМ до 50 мМ.
25 Например, промывочный буфер после загрузки находится в концентрации 10 мМ, 20 мМ, 30 мМ, 40 мМ, 50 мМ. В одном примере промывочный буфер после загрузки находится в концентрации 5 мМ. В одном примере промывочный буфер после загрузки находится в концентрации 10 мМ.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер. Например, фосфатный буфер выбирают из группы, включающей в себя
30 моонатрийфосфат (NaH_2PO_4), динатрийфосфат (Na_2HPO_4), фосфорную кислоту (H_3PO_4) и их комбинации.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Na_2HPO_4 .

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит H_3PO_4 .

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит NaH_2PO_4 . Например, промывочный буфер после загрузки содержит 5 мМ NaH_2PO_4 . В другом примере промывочный буфер после загрузки содержит 10 мМ NaH_2PO_4 .

5 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 .

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер.

10 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит буфер уксусной кислоты. Например, промывочный буфер после загрузки содержит ацетат натрия. Например, промывочный буфер после загрузки содержит 5 мМ уксусной кислоты. В другом примере промывочный буфер после загрузки содержит 10 мМ уксусной кислоты.

15 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и буфер уксусной кислоты. Например, промывочный буфер после загрузки содержит NaH_2PO_4 и ацетат натрия. Например, промывочный буфер после загрузки содержит 5 мМ NaH_2PO_4 и 10 мМ ацетата натрия.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер.

20 В одном примере промывочный буфер после загрузки представляет собой буфер Бис-Трис.

В одном примере промывочный буфер после загрузки представляет собой L-гистидиновый буфер.

25 В одном примере промывочный буфер после загрузки имеет рН в диапазоне от 5,0 до приблизительно 8,0. Например, промывочный буфер после загрузки имеет рН в диапазоне от 5,5 до 7,0. В другом примере промывочный буфер после загрузки имеет рН в диапазоне от 5,8 до 6,6. Например, промывочный буфер после загрузки имеет рН приблизительно 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5 или 6,6. В одном примере промывочный буфер после загрузки имеет рН 6,0. В одном примере промывочный буфер после загрузки имеет рН 6,2. В другом примере промывочный буфер после загрузки имеет рН 6,6.

30 В одном примере промывочный буфер после загрузки дополнительно содержит соль. Например, соль представляет собой хлорид натрия.

В одном примере промывочный буфер после загрузки не содержит соль.

В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 0 мМ до 200 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 0 мМ до 50 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 0 мМ до 100 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации от 20 мМ до 150 мМ. В
5 одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 20 мМ до 80 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации приблизительно 20 мМ, или 30 мМ, или 40 мМ, или 50 мМ, или 60 мМ, или 70 мМ или 80 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации приблизительно 20 мМ. В
10 одном примере хлорид натрия находится в концентрации приблизительно 25 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 50 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации приблизительно 70 мМ. В одном примере хлорид натрия находится в концентрации от 120 мМ до 200 мМ. Например, хлорид натрия находится в концентрации 150 мМ. В другом примере хлорид натрия находится в концентрации 200 мМ.

15 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер с рН 6,0.

20 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер рН 6,2.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 0 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

25 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 20 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

30 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 0 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 25 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер и 0 мМ хлорида натрия с рН 6,2.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

5 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер с рН 6,6.

10 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер и 20 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер и 25 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

15 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит MES буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

20 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер и 20 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

25 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер и 25 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

30 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-цитратный буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-ацетатный буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит натрий-ацетатный буфер с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный и натрий-ацетатный буфер и 25 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный и натрий-ацетатный буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

5 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный и натрий-ацетатный буфер и 0 мМ хлорида натрия с рН 6,2.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

10 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер и 20 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

15 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер и 25 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

20 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит Бис-Трис буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер с рН 6,0.

25 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер и 20 мМ хлорида натрия рН 6,0.

30 В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,0.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер и 25 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере промывочный буфер после загрузки содержит L-гистидиновый буфер и 50 мМ хлорида натрия с рН 6,6.

В одном примере объем промывочного буфера после загрузки составляет от 1 до 5 ОК. Например, объем промывочного буфера после загрузки составляет 1 ОК, или 2 ОК, или 3 ОК, или 4 ОК или 5 ОК. В одном примере объем промывочного буфера после загрузки составляет 3 ОК.

5 В одном примере анионообменную смолу регенерируют с помощью буфера регенерации, выбранного из группы, включающей в себя хлорид натрия, дигидрофосфат натрия, гидроксид натрия, уксусную кислоту и их комбинации.

10 В одном примере анионообменную смолу регенерируют с помощью буфера регенерации, выбранного из группы, включающей в себя хлорид натрия, фосфатный буфер, буфер гидроксида натрия, буфер уксусной кислоты и их комбинации.

15 В одном примере анионообменную смолу регенерируют с помощью буфера регенерации, содержащего фосфатный буфер. Например, фосфатный буфер выбран из группы, включающей в себя моноватрийфосфат (NaH_2PO_4), динатрийфосфат (Na_2HPO_4), фосфорную кислоту (H_3PO_4) и их комбинации.

В одном примере буфер регенерации содержит Na_2HPO_4 .

В одном примере буфер регенерации содержит H_3PO_4 .

В одном примере буфер регенерации содержит NaH_2PO_4 .

В одном примере буфер регенерации содержит Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 .

20 В одном примере буфер регенерации содержит хлорид натрия. В другом примере буфер регенерации содержит гидроксид натрия. В другом примере буфер регенерации содержит уксусную кислоту.

25 В одном примере буфер регенерации содержит хлорид натрия и фосфатный буфер. В одном примере буфер регенерации содержит хлорид натрия и дигидрофосфат натрия (NaH_2PO_4). В одном примере буфер регенерации содержит хлорид натрия и Na_2HPO_4 . В одном примере буфер регенерации содержит хлорид натрия и H_3PO_4 . В одном примере буфер регенерации содержит хлорид натрия и Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 .

30 В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 10 мМ дигидрофосфат натрия, pH 6,2.

В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 10 мМ Na_2HPO_4 , pH 6,2.

В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 10 мМ H_3PO_4 , pH 6,2.

В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 10 мМ Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 , pH 6,2.

В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 100 мМ дигидрофосфат натрия, pH 6,2.

5 В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 100 мМ Na_2HPO_4 , pH 6,2.

В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 100 мМ H_3PO_4 , pH 6,2.

10 В одном примере буфер регенерации содержит 1 М хлорида натрия и 100 мМ Na_2HPO_4 и NaH_2PO_4 , pH 6,2.

В одном примере буфер регенерации содержит 0,5 М гидроксида натрия.

В одном примере буфер регенерации содержит 1 М уксусной кислоты.

В одном примере объем буфера регенерации составляет от 1 до 10 ОК. Например, объем буфера регенерации составляет 1 ОК, или 2 ОК, или 3 ОК, или 15 4 ОК, или 5 ОК, или 6 ОК, или 7 ОК, или 8 ОК, или 9 ОК или 10 ОК. В одном примере объем буфера регенерации составляет 5 ОК.

Подходящие способы регенерации будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке.

В одном примере по меньшей мере 75 % IgG извлекается из плазмы или ее 20 фракции. В другом примере по меньшей мере 75 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии. Например, по меньшей мере 75 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии без дополнительных стадий очистки. Например, по 25 меньшей мере 75 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. Например, по меньшей мере 75 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии ионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 75 % IgG извлекается из 30 плазмы или ее фракции, при этом IgG получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракций. Например, по меньшей мере 75 % IgG извлекают в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, 75 %, или 76 %, или 77 %, или 78 % или 79 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 75 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В

одном примере 76 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 77 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 78 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере 79 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции.

5 В одном примере по меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере по меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии. Например, по меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии без дополнительных стадий очистки. Например, по
10 меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. Например, по меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии ионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии анионообменной
15 хроматографии. В одном примере по меньшей мере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции, при этом IgG получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракций. Например, по меньшей мере 80 % IgG извлекают в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, 80 %, или 81 %, или 82 %, или 83 %, или 84 % IgG извлекается из плазмы или ее
20 фракции. В одном примере 80 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 81 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 82 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 83 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере 84 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции.

25 В одном примере по меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере по меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии. Например, по меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии без дополнительных стадий очистки. Например, по
30 меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. Например, по меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии ионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии анионообменной

хроматографии. В одном примере по меньшей мере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции, при этом IgG получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракций. Например, по меньшей мере 85 % IgG извлекают в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, 5 85 %, или 86 %, или 87 %, или 88 %, или 89 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 85 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 86 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 87 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 88 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере 89 % IgG 10 извлекается из плазмы или ее фракции.

В одном примере по меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере по меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии. Например, по 15 меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии без дополнительных стадий очистки. Например, по меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. Например, по меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии 20 ионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии анионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции, при этом IgG получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракций. Например, по меньшей мере 90 % IgG извлекают в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, 25 90 %, или 91 %, или 92 %, или 93 % или 94 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 90 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 91 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 92 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 93 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере 94 % IgG 30 извлекается из плазмы или ее фракции.

В одном примере по меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере по меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии. Например, по 35 меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода

непрерывной хроматографии без дополнительных стадий очистки. Например, по меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. Например, по меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии ионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции после стадии анионообменной хроматографии. В одном примере по меньшей мере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции, при этом IgG получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракций. Например, по меньшей мере 95 % IgG извлекают в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, 95 %, или 96 %, или 97 %, или 98 %, или 99 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 95 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 96 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 97 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В одном примере 98 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции. В другом примере 99 % IgG извлекается из плазмы или ее фракции.

В одном примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 95 %. В другом примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 95 % после метода непрерывной хроматографии. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 95 % после метода непрерывной хроматографии без дополнительных стадий очистки. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 95 % после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. В одном примере элюированный IgG, имеющий чистоту по меньшей мере 95 %, получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракции. Например, элюированный IgG, имеющий чистоту по меньшей мере 95 %, извлекается в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, элюированный IgG имеет чистоту 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 %. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту 95 %. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту 96 %. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту 97 %.

В одном примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 98 %. В другом примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 98 % после метода непрерывной хроматографии. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 98 % после метода непрерывной хроматографии

без дополнительных стадий очистки. В одном примере элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 98 % после метода непрерывной хроматографии с дополнительными стадиями очистки. В одном примере элюированный IgG, имеющий чистоту по меньшей мере 98 % получают из по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракции. Например, элюированный IgG, имеющий чистоту по меньшей мере 98 % извлекается в результате очистки в крупных масштабах плазмы или ее фракции. Например, элюированный IgG имеет чистоту 98 % или 99 %.

В одном примере способ осуществляют в крупных масштабах. Например, способ осуществляют в промышленных или коммерческих масштабах. Способы осуществления в промышленных или коммерческих масштабах будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Например, способ, осуществляемый в промышленном масштабе, включает в себя крупномасштабную очистку IgG из плазмы или ее фракции.

В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют, используя по меньшей мере 500 кг плазмы или ее фракции. Например, крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием от 500 кг до 1000 кг, или от 1000 кг до 2500 кг, или от 2500 кг до 5000 кг, или от 5000 кг до 7500 кг, или от 7500 кг до 10000 кг, или от 10000 кг до 12500 кг или от 12500 кг до 15000 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 1000 кг, или 2500 кг, или 5000 кг, или 7500 кг, или 10000 кг, или 12500 кг, или 15000 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 1000 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 2500 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 5000 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 7500 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 10000 кг плазмы или ее фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 12500 кг плазмы или ее

фракции. В одном примере крупномасштабную очистку IgG осуществляют с использованием по меньшей мере 15000 кг плазмы или ее фракции.

В одном примере способ дополнительно включает в себя приготовление очищенного IgG в фармацевтической композиции.

5 В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола), и лиганд, способный
10 специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG посредством 20 мМ фосфатного уравнивающего буфера, имеющего рН от 7 до 8;

б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;

в) промывание смолы посредством 20 мМ фосфатного промывочного буфера, имеющего рН от 7 до 8; и

15 г) элюирование связанного IgG посредством 20 мМ ацетатного элюирующего буфера, имеющего рН от 3 до 5;

при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и необязательно способ дополнительно включает в себя
20 стриппинг смолы посредством 20 мМ фосфатного промывочного буфера, имеющего рН от 2 до 3.

В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из
25 плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) и лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG
30 уравнивающим буфером, содержащим 20 мМ буфера дигидрофосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеющим рН от 7 до 8;

б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;

в) промывку смолы промывочным буфером, содержащим 20 мМ буфера дигидрофосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеющим рН от 7 до 8; и

г) элюирование связанного IgG посредством 20 mM ацетатного элюирующего буфера, имеющего pH от 3 до 5;

при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и необязательно способ дополнительно включает в себя стриппинг смолы посредством 20 mM фосфатного промывочного буфера, имеющего pH от 2 до 3.

10 В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) и лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG уравнивающим буфером, содержащим 20 mM буфера дигидрофосфата натрия, 500 mM хлорида натрия и имеющим pH от 7 до 8;

б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;

в) промывку смолы промывочным буфером, содержащим 20 mM буфера дигидрофосфата натрия, 500 mM хлорида натрия и имеющим pH от 7 до 8; и

г) элюирование связанного IgG посредством 20 mM ацетатного элюирующего буфера, имеющего pH от 3 до 5;

при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и необязательно способ дополнительно включает в себя стриппинг смолы посредством 20 mM фосфатного промывочного буфера, имеющего pH от 2 до 3.

30 В одном примере способ не включает в себя стриппинг смолы.

В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола), и лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG посредством 20 мМ фосфатного уравнивающего буфера, имеющего рН от 7 до 8;

5 б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;

в) промывание смолы посредством 20 мМ фосфатного промывочного буфера, имеющего рН от 7 до 8; и

г) элюирование связанного IgG посредством 20 мМ ацетатного элюирующего буфера, имеющего рН от 3 до 5;

10 при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и при этом способ не включает в себя стриппинг смолы.

15 В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола), и лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG посредством 20 мМ фосфатного уравнивающего буфера, имеющего рН от 7 до 8;

20 б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;

в) промывание смолы посредством 20 мМ фосфатного промывочного буфера, имеющего рН от 7 до 8; и

25 г) элюирование связанного IgG посредством 20 мМ ацетатного или фосфатного буфера, имеющего рН от 3 до 5;

30 при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и необязательно при этом способ не включает в себя стриппинг смолы.

В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

- 5 а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) и лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG уравнивающим буфером, содержащим 20 мМ буфера дигидрофосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеющим рН от 7 до 8;
- 10 б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;
- в) промывку смолы промывочным буфером, содержащим 20 мМ буфера дигидрофосфата натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеющим рН от 7 до 8; и
- г) элюирование связанного IgG посредством 20 мМ ацетатного элюирующего буфера, имеющего рН от 3 до 5;

15 при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и при этом способ не включает в себя стриппинг смолы.

20 В настоящей заявке дополнительно предложен способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием SMB хроматографии, способ включает в себя:

- 25 а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) и лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG уравнивающим буфером, содержащим 20 мМ буфера дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеющим рН от 7 до 8;
- б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;
- в) промывку смолы промывочным буфером, содержащим 20 мМ буфера дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеющим рН от 7 до 8; и
- 30 г) элюирование связанного IgG посредством 20 мМ ацетатного элюирующего буфера, имеющего рН от 3 до 5;

при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок,

разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и при этом способ не включает в себя стриппинг смолы.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение по меньшей мере 50 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение по меньшей мере 50 циклов на партию плазмы или ее фракции. В одном примере способ повторяют на смоле в течение от 50 до 80 циклов, от 60 до 80 циклов, от 70 до 80 циклов на партию плазмы или ее фракции. Например, способ повторяют на смоле в течение по меньшей мере 60, или 65, или 70, или 75 или 80 циклов на партию плазмы или ее фракции.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 50 циклов на партию плазмы или ее фракции.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 60 циклов на партию плазмы или ее фракции.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 70 циклов на партию плазмы или ее фракции.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 80 циклов на партию плазмы или ее фракции.

В одном примере способ повторяют на смоле с несколькими порциями плазмы или ее фракций. Например, способ повторяют на смоле с по меньшей мере двумя партиями плазмы или ее фракций. В одном примере способ повторяют на смоле с 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9 или 10 партиями плазмы или ее фракций. В одном примере способ повторяют на смоле с использованием от 4 до 10 партиями плазмы или ее фракций.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение в общем до 800 циклов. Например, смолу повторно используют в течение в общем количестве до 800 циклов. В одном примере способ повторяют на смоле в течение в общем до 100, или 200, или 300, или 400, или 500, или 600 или 700 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 100 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 200 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 300 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 400 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 500 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 600 циклов. Например, способ повторяют на смоле в течение в общем до 700 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение от 100 до 200 циклов, или от 200 до 300 циклов, или от 200 до 500 циклов или от 500 до 800 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 200 циклов.

5 В одном примере способ повторяют на смоле в течение 300 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 400 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 500 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 600 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение 700 циклов.

10 В одном примере способ повторяют на смоле в течение 800 циклов.

В одном примере способ повторяют на смоле в течение от 200 до 500 циклов. Например, смолу повторно используют в течение в общем количестве от 200 до 500 циклов. В одном примере смолу повторно используют в общей сложности до 500 циклов с использованием до 10 партий плазмы или ее фракций.

15

В одном примере стадию обеззараживания осуществляют на смоле после каждого отдельного цикла. В другом примере стадию обеззараживания осуществляют на смоле после множества циклов. Например, стадию обеззараживания осуществляют на смоле после по меньшей мере 50 циклов. В одном примере стадию обеззараживания осуществляют на смоле после по меньшей мере 100 циклов. В другом примере стадию обеззараживания осуществляют на смоле после по меньшей мере 150 циклов. В другом примере стадию обеззараживания осуществляют на смоле после по меньшей мере 200 циклов. В одном примере стадию обеззараживания осуществляют на смоле после каждой партии плазмы или ее фракций. Например, стадию обеззараживания осуществляют на смоле между каждой партией плазмы или ее фракций, т.е., перед загрузкой каждой партии плазмы или ее фракций на смолу.

20

25

Подходящие способы обеззараживания будут известны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке.

30

В одном примере способ снижает ЕДС смолы. Например, повторное использование смолы снижает ЕДС смолы. В одном примере ЕДС смолы снижается на величину до 80 %. Например, ЕДС смолы снижается на величину до 75 %, или 70 %, или 65 %, или 60 %, или 55 %, или 40 %, или 45 %, или 40 %, или 35 %, или 30 %, или 25 %, или 20 %, или 15 %, или 10 % или 5 %.

В одном примере смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на величину до 80 %.

В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 80 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 80 %.

5 В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 70 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 70 %.

В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 60 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 60 %.

10 В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 50 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 50 %.

В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 40 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 40 %.

В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 30 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 30 %.

15 В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 20 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 20 %.

В одном примере способ снижает ЕДС смолы на 10 %. Например, смолу используют повторно до тех пор, пока ЕДС смолы не снизится на 10 %.

20 Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей IgG, очищенный или полученный способом, описанным в настоящей заявке. Например, фармацевтическая композиция содержит IgG, очищенный или полученный способом, описанным в настоящей заявке и фармацевтически приемлемый носитель.

25 В одном примере фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере 1 % (мас./об.) очищенного IgG. Например, фармацевтическая композиция содержит 1 % (мас./об.) очищенного IgG. В другом примере фармацевтическая композиция содержит 5 % (мас./об.) очищенного IgG. В одном примере фармацевтическая композиция содержит от 10 до 30 % (мас./об.) очищенного IgG. Например, фармацевтическая композиция содержит 10 % (мас./об.)
30 очищенного IgG. В одном примере фармацевтическая композиция содержит 16.5 % (мас./об.) очищенного IgG. В другом примере фармацевтическая композиция содержит 20 % (мас./об.) очищенного IgG. В одном примере фармацевтическая композиция содержит 25 % (мас./об.) очищенного IgG. В

другом примере фармацевтическая композиция содержит 30 % (мас./об.) очищенного IgG.

В одном примере содержание IgG в фармацевтической композиции составляет по меньшей мере 95 % (мас./мас.) от общего количества белка в композиции. Например, содержание IgG в фармацевтической композиции составляет 95 % (мас./мас.) от общего количества белка в композиции. В другом примере содержание IgG в фармацевтической композиции составляет 96 % (мас./мас.) от общего количества белка в композиции. В другом примере содержание IgG в фармацевтической композиции составляет 97 % (мас./мас.) от общего количества белка в композиции. В одном примере содержание IgG в фармацевтической композиции составляет 98 % (мас./мас.) от общего количества белка в композиции. В другом примере содержание IgG в фармацевтической композиции составляет 99 % (мас./мас.) от общего количества белка в композиции.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит 100 мг/мл общего белка плазмы человека. В одном примере фармацевтическая композиция содержит 20 г/100 мл общего белка плазмы человека.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит иммуноглобулин G (IgG) чистотой по меньшей мере 95 %. Например, фармацевтическая композиция содержит иммуноглобулин G (IgG) чистотой по меньшей мере 96 %. В другом примере фармацевтическая композиция содержит иммуноглобулин G (IgG) чистотой по меньшей мере 97 %. В другом примере фармацевтическая композиция содержит иммуноглобулин G (IgG) чистотой по меньшей мере 98 %. В другом примере фармацевтическая композиция содержит иммуноглобулин G (IgG) чистотой по меньшей мере 99 %.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG1 по меньшей мере 60 %. Например, фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG1 по меньшей мере 65 %.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG2 менее 30 %. Например, фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG2 менее 28 %.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG3 менее 5 %. Например, фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG3 менее 4 %.

В одном примере фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG4 менее 5 %. Например, фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG4 менее 3 %.

5 В одном примере фармацевтическая композиция содержит распределение подклассов IgG, подобное распределению в нормальной плазме человека, например 69 % IgG₁, 26 % IgG₂, 3 % IgG₃ и 2 % IgG₄.

10 В одном примере фармацевтическая композиция имеет номинальную осмоляльность между примерно 300 мОсм/кг и 400 мОсм/кг. В одном примере фармацевтическая композиция имеет номинальную осмоляльность 380 мОсм/кг. Например, фармацевтическая композиция имеет номинальную осмоляльность от приблизительно 300 мОсм/кг до 350 мОсм/кг. В одном примере фармацевтическая композиция имеет номинальную осмоляльность 320 мОсм/кг.

15 В одном примере фармацевтическая композиция имеет рН от 4 до 5,5. Например, фармацевтическая композиция имеет рН от 4,5 до 5,0. В одном примере фармацевтическая композиция имеет рН от 4,6 до 5,0. Например, фармацевтическая композиция имеет рН 4,6. В одном примере фармацевтическая композиция имеет рН 4,7. В другом примере фармацевтическая композиция имеет рН 4,8. В другом примере фармацевтическая композиция имеет рН 4,9. В одном примере фармацевтическая композиция содержит рН 5,0.

20 В одном примере фармацевтическая композиция дополнительно содержит от 200 ммоль/л до 300 ммоль/л L-пролина. Например, фармацевтическая композиция дополнительно содержит от 225 ммоль/л до 275 ммоль/л L-пролина. В одном примере фармацевтическая композиция дополнительно содержит от 240 ммоль/л до 260 ммоль/л L-пролина. Например, фармацевтическая композиция дополнительно содержит 250 ммоль/л L-пролина.

В одном примере в фармацевтической композиции содержание натрия составляет ≤ 1 ммоль/л.

30 В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgA составляет $\leq 0,05$ мг/мл. Например, в фармацевтической композиции содержание IgA составляет $\leq 0,04$ мг/мл, или $\leq 0,03$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgA составляет $\leq 0,025$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgA составляет \leq

0,01 мг/мл. Например, в фармацевтической композиции содержание IgA составляет $\leq 0,009$ мг/мл.

В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgA составляет $\leq 0,1$ мг/г IgG. В одном примере в фармацевтической композиции
5 содержание IgA составляет $\leq 0,09$ мг/г IgG.

В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgM составляет ≤ 10 мг/л. Например, содержание IgM составляет ≤ 10 мг/л, ≤ 9 мг/л,
10 ≤ 8 мг/л, ≤ 7 мг/л, ≤ 6 мг/л, ≤ 5 мг/л, ≤ 4 мг/л, ≤ 3 мг/л, ≤ 2 мг/л. В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgM составляет ≤ 2 мг/л. В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgM составляет ≤ 1 мг/л. В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgM составляет $\leq 0,5$ мг/л. Например, в фармацевтической композиции содержание IgM составляет $< 0,17$ мг/л.

В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgM
15 составляет ≤ 2 мкг/г IgG. В одном примере в фармацевтической композиции содержание IgM составляет $\leq 1,9$ мкг/г IgG.

В одном примере в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,50$ мг/мл. Например, в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,40$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической
20 композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,30$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,20$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,10$ мг/мл. Например, в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,09$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической
25 композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,08$ мг/мл. В одном примере в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,07$ мг/мл.

В одном примере в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет ≤ 1 мг/г IgG. В одном примере в фармацевтической композиции содержание альбумина составляет $\leq 0,80$ мг/г IgG.

30 В одном примере в фармацевтической композиции уровень активатора прекалликреина (РКА) составляет ≤ 35 МО/мл. В одном примере в фармацевтической композиции уровень активатора прекалликреина (РКА) составляет ≤ 30 МО/мл. В одном примере в фармацевтической композиции уровень активатора прекалликреина (РКА) составляет ≤ 50 МО/мл. В одном

примере в фармацевтической композиции уровень активатора прекалликреина (РКА) составляет ≤ 20 МО/мл. Например, в фармацевтической композиции уровень активатора прекалликреина (РКА) составляет ≤ 15 МО/мл. В одном примере в фармацевтической композиции уровень активатора прекалликреина (РКА) составляет ≤ 10 МО/мл.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, для применения в лечении, предотвращении и/или замедлении прогрессирования заболевания у субъекта. Например, в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, для применения в лечении заболевания у субъекта. В другом примере в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, для применения для предотвращения заболевания у субъекта. В другом примере в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, для применения для замедления прогрессирования заболевания у субъекта.

В некоторых примерах фармацевтическая композиция находится во флаконе, предварительно заполненном шприце или устройстве для самоинъекции.

Настоящее изобретение также относится к предварительно заполненному шприцу, содержащему описанную в настоящей заявке фармацевтическую композицию.

В настоящем изобретении также предложено устройство для самоинъекции, содержащее описанную в настоящей заявке фармацевтическую композицию.

В одном примере композицию в соответствии с изобретением вводят подкожно нуждающемуся в этом субъекту. В другом примере композицию в соответствии с изобретением вводят внутривенно нуждающемуся в этом субъекту.

В одном примере композицию в соответствии с изобретением вводят самостоятельно.

В одном примере композицию в соответствии с изобретением вводят самостоятельно подкожно.

В одном примере композиция в соответствии с изобретением представлена в предварительно заполненном шприце.

В одном примере композицию в соответствии с изобретением вводят самостоятельно подкожно с помощью предварительно заполненного шприца.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает применение IgG, очищенного или полученного способом, описанным в настоящей заявке, при
5 изготовлении лекарственного средства для лечения, предотвращения и/или задержки прогрессирования заболевания у субъекта. Например, настоящее изобретение обеспечивает применение IgG, очищенного или полученного способом, описанным в настоящей заявке, при изготовлении лекарственного
10 средства для лечения заболевания у субъекта. В другом примере настоящее изобретение обеспечивает использование IgG, очищенного или полученного способом, описанным в настоящей заявке, при изготовлении лекарственного средства для предотвращения заболевания у субъекта. В следующем примере настоящее изобретение обеспечивает применение IgG, очищенного или
15 полученного способом, описанным в настоящей заявке, при изготовлении лекарственного средства для замедления прогрессирования заболевания у субъекта.

Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования заболевания у субъекта, причем способ включает введение субъекту фармацевтической композиции в
20 соответствии с настоящим изобретением. Например, настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания у субъекта. В другом примере настоящее изобретение обеспечивает способ предотвращения заболевания у субъекта. В дополнительном примере настоящее изобретение обеспечивает способ замедления прогрессирования заболевания у субъекта.

25 В настоящем изобретении также предложен набор для применения в лечении, предотвращении и/или замедлении прогрессирования заболевания у субъекта, набор включает в себя:

- (а) по меньшей мере одну фармацевтическую композицию, описанную в
настоящей заявке;
- 30 (б) инструкции по использованию набора в лечении или предотвращении или замедлении прогрессирования заболевания у субъекта; и
- (в) необязательно, по меньшей мере одно дополнительное терапевтически активное соединение или лекарственное средство.

В одном примере заболевание представляет собой иммунодефицит, аутоиммунное заболевание или острую инфекцию. Например, заболеванием является аллогенная трансплантация костного мозга, хронический лимфоцитарный лейкоз, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (ИТП),
5 детский ВИЧ, первичные иммунодефициты, болезнь Кавасаки, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (ХВДП), трансплантация почки от реципиента с высоким уровнем антител или от АВО-несовместимого донора, синдром хронической усталости, псевдомембранозный колит, вызванный *C. difficile*, дерматомиозит и полимиозит, офтальмопатия Грейвса,
10 синдром Гийена-Барре, мышечная дистрофия, миозит с включенными тельцами, синдром Ламберта-Итона, красная волчанка, мультифокальная моторная нейропатия, рассеянный склероз (РС), миастения гравис, неонатальная аллоиммунная тромбоцитопения, парвовирусная инфекция В19, пузырчатка, посттрансфузионная пурпура, отторжение трансплантата почки,
15 самопроизвольный выкидыш, самопроизвольный аборт, синдром ригидного человека, опсиклонус-миоклонус, тяжелый сепсис и септический шок у взрослых в критическом состоянии, токсический эпидермальный некролиз, хронический лимфоцитарный лейкоз, множественная миелома, X-сцепленная агаммаглобулинемия, гипогаммаглобулинемия, первичный иммунодефицит,
20 RRMS, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

В одном примере заболевание выбирают из группы, включающей в себя первичный иммунодефицит (ПИ), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП), и хроническую иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ХИТП).

25 В одном примере заболевание представляет собой первичный иммунодефицит (ПИ).

В одном примере заболевание представляет собой хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП).

30 В одном примере заболевание представляет собой хроническую иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ХИТП).

В одном примере любого способа, описанного в настоящей заявке, субъектом является млекопитающее, например примат, такой как человек.

Краткое описание чертежей

Фигура 1 представляет собой **(А)** изображение геля SDS-PAGE осветленного элюата FcXP POROS® из криообедненной плазмы (FcXP) в восстанавливающих (слева) и невосстанавливающих (справа) условиях и **(В)** Таблица белковых примесей, идентифицированных в элюате после анализа геля SDS-PAGE.

Фигура 2 представляет собой изображение геля 2D-DIGE белков в элюате.

Фигура 3 представляет собой графическое изображение, показывающее распределение подклассов IgG в криообогащенной плазме (CRP) и криообедненной плазме (CPP) до использования в описанном в настоящей заявке способе, элюат CRP и CPP (т.е. элюатов из смолы FcXP).

Фигура 4 представляет собой графическое изображение, показывающее статическую связывающую способность смолы FcXP POROS® в ходе последовательных экспериментов при высоте слоя 6 см (LTS1) и 20 см (LTS2).

Фигура 5 представляет собой графическое изображение, показывающее прокоагулянтную активность **(А)** плазмы и **(В)** криообедненной плазмы (CPP) в зависимости от температуры с течением времени или фильтрации, как определено анализом NaPTT. Время коагуляции было установлено на уровне > 150 с.

Фигура 6 представляет собой графическое изображение, показывающее протеолитическую активность тромбина (S-2238), общих сериновых протеаз (S-2288), калликреина (S-2302), плазмина (S-2251) и FXa (S-2765) в зависимости от температуры с течением времени в **(А)** плазме и **(В)** криообедненной плазме (CPP).

Фигура 7 представляет собой графическое изображение, показывающее вирусную инактивацию СРБ с использованием N-октил-β-D-глюкопиранозида.

Фигура 8 представляет собой графическое изображение, показывающее **(А)** зависимое от температуры нормализованное по объему соотношение криопреципитата в образцах, размороженных при различных температурах; и **(В)** схема исследования времени выдержки для оценки оптимальной температуры размораживания и времени выдержки соответственно.

Фигура 9 представляет собой серию графических изображений, показывающих противодавление во время способа SMB **(А)** со стрип-фазой и **(В)** без стрип-фазы.

Фигура 10 представляет собой серию графических изображений, показывающих (А) снижение протеолитической активности в элюате (т.е. элюате из смолы FcXP) с увеличением проводимости промывочного буфера и (В) снижение протеолитической активности в элюате (т.е. элюате из смолы FcXP) из нормальной и криообедненной плазмы (СРР) в результате увеличения проводимости промывочного буфера со 145 мМ хлорида натрия до 500 мМ хлорида натрия.

Фигура 11 представляет собой серию графических изображений, показывающих (А) выход IgG, (В) чистоту продукта с использованием анализа Lарсhір и (С) уровни альбумина, IgА и IgМ в нормальной плазме и криообедненной плазме (СРР) в элюатах (т.е. элюатах из смолы FcXP) с использованием промывочного буфера, содержащего 145 мМ или 500 мМ хлорида натрия.

КЛЮЧ К ПЕРЕЧЕНЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность фрагмента VHH
- SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 фрагмента VHH
- SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 фрагмента VHH
- SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 фрагмента VHH

15

Подробное описание

Общие положения

В данном описании, если специально не указано иное или контекст не требует иного, ссылка на одну стадию, состав вещества, группу стадий или группу составов вещества должна пониматься как охватывающая одну и множество (т. е. одну или несколько) таких стадий, составов вещества, групп стадий или групп составов вещества.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что настоящее изобретение допускает изменения и модификации, отличные от конкретно описанных. Следует понимать, что изобретение включает в себя все такие варианты и модификации. Настоящее изобретение также включает в себя все этапы, признаки, композиции и соединения, упомянутые или указанные в

25

данном описании, по отдельности или вместе, а также любые и все комбинации или любые две или более указанных стадий или признаков.

5 Объем настоящего изобретения не ограничивается конкретными примерами, описанными в настоящей заявке, которые предназначены только для целей иллюстрации. Функционально эквивалентные продукты, композиции и способы явно входят в объем настоящего изобретения.

Любой пример настоящего описания в настоящей заявке следует применять с соответствующими изменениями к любому другому примеру описания, если специально не указано иное.

10 Если специально не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, должны иметь то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области (например, в культуре клеток, молекулярной генетике, иммунологии, иммуногистохимии, химии белков и биохимии).

15 Термин «и/или», например, «X и/или Y» следует понимать как означающий либо «X и Y», либо «X или Y», и должен рассматриваться как обеспечивающий явную поддержку обоих значений или любого из значений.

20 В данном описании слово «содержать» или его варианты, такие как «содержит» или «содержащий», следует понимать как подразумевающие включение указанного элемента, целого числа или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий, но не исключение любого другого элемента, целого числа или стадии, или группы элементов, целых чисел или стадий.

25 Используемый в настоящей заявке термин «полученный из» следует понимать для обозначения того, что указанное целое число может быть получено из конкретного источника, хотя и не обязательно непосредственно из этого источника.

Кроме того, используемые в настоящей заявке формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

30 **Избранные определения**

Термин «очищать» или «очистка», или «очищение» следует понимать как означающий удаление, полное или частичное, по меньшей мере, одной примеси, присутствующей в плазме или ее фракции, что тем самым повышает уровень чистоты IgG в растворе.

Термин «примесь» или «примеси» следует понимать как включающий в себя один или несколько компонентов плазмы или ее фракции, кроме IgG. Например, примеси могут охватывать альбумин (α -глобулин и/или β -глобулин), липиды плазмы, белки плазмы, протеазы (например, сериновые протеазы, калликреин, плазмин и FXa), ингибиторы сериновых протеаз (например, ингибитор C1, альфа-1-антитрипсин и антитромбин), IgA и IgM, фактор VIII, фибриноген, фактор фон Виллебранда, активированные факторы свертывания крови (например, FXa, FIXa, FVIIa и тромбин), фактор XIII, факторы контактной системы (например, FXIa, FXIIa и плазменный калликреин), PKA, фактор IX, протромбиновый комплекс, ингибитор эстеразы C1, протеин C, антитромбин III, иммуноглобулин RhD и микрочастицы мембран тромбоцитов.

Термин «иммуноглобулин G (IgG)», также известный как «гамма-глобулин» или «иммунный глобулин», следует понимать для обозначения антитела изотипа G. Существует несколько подклассов IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. .

Термин «плазма» относится к компоненту крови соломенного/бледно-жёлтого цвета, полученному от одного или нескольких доноров крови. Способы получения плазмы от донора будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Например, плазму получают путем удаления эритроцитов из донорской крови. Например, плазму получают методом плазмафереза.

Термин «фракция плазмы» или «ее фракция» относится к плазме, которая была фракционирована для выделения одного или более желательных белковых компонентов из плазмы. Например, плазму можно фракционировать для выделения криопреципитатов (белков, которые выпадают в осадок из раствора, когда единица свежезамороженной плазмы медленно оттаивает на холоде) и криосупернатанта (также известного как криообедненная плазма). Например, плазму можно фракционировать путем осаждения этанолом с получением IgG-содержащих фракций Онкли, фракций Кона, осадков сульфата аммония или осадков A (KN A), B (KN B), и осадка супернатанта B (KN B+1) из плазмы, как описано в патенте США 3,301,842. Фракции плазмы включают в себя осадок II+III, полученный по методам Кона, таким как Метод 6, Cohn и соавт. J. Am; Chem. Soc., 68 (3), 459-475 (1946), Метод 9, Oncley и соавт. J. Am; Chem. Soc., 71, 541-550 (1946), или осадок I+II+III, Метод 10, Cohn и соавт. J. Am; Chem. Soc., 72, 465-474 (1950); а также метод у Deutsch и соавт. J. Biol. Chem. 164, 109-

118 (1946) или осадок А, В и осадок супернатанта В Ничманна и Кистлера Vox Sang. 7, 414-424 (1962); Helv. Chim. Acta 37, 866-873 (1954). Например, плазма может быть фракционирована путем фракционирования октановой кислоты, как описано в европейской заявке 893450. Обычно используют фракции Кона и осадки А Кистлера/Ничмана (KN А), В (KN В), а осадок супернатанта В (KN В+1) существует в виде взвешенной пасты. Могут быть использованы другие методы очистки, включая хроматографию.

10 Термин «криопреципитат» или «криопреципитаты» относится к белкам в плазме, которые выпадают в осадок из раствора, когда единицу свежезамороженной плазмы медленно оттаивают на холоде. Криопреципитаты включают в себя фактор VIII, фибриноген, фактор Виллебранда, фактор XIII и микрочастицы мембран тромбоцитов.

Под термином «криообедненная плазма» понимают плазму, очищенную от криопреципитатов.

15 Термин «криообогащенная плазма» следует понимать для обозначения плазмы, содержащей компоненты, обычно встречающиеся в криопреципитатах.

20 Термин «осветленный» или «осветляющий» означает процесс пропускания плазмы или ее фракции через подходящий фильтр (например, глубинный фильтр и/или мембранный фильтр 1,2 и 0,45/0,22 мкм) для удаления одной или нескольких примесей перед для использования в способе, описанном в настоящей заявке.

25 Термин «константа диссоциации» относится к рКа буфера. $pK_a = -\log_{10}(K_a)$, где K_a представляет собой константу диссоциации кислоты буферного агента буфера. Например, промывочный буфер, состоящий из 20 мМ дигидрофосфата натрия, 40 мМ хлорида натрия при рН 7,4, содержит дигидрофосфат натрия в качестве буферного агента. Фосфорная кислота имеет три константы диссоциации (рКа1: 2,16, рКа2: 7,21, рКа3: 12,32).

30 Термин «смола для аффинной хроматографии» следует понимать как означающий смолу, содержащую лиганд для аффинной хроматографии (например, фрагмент однодоменного [VНН] антитела верблюжьего происхождения), прикрепленный к матрице, такой как, например, описанные в настоящей заявке. Типичные смолы для аффинной хроматографии, используемые в описанном в настоящей заявке способе, включают в себя аффинную смолу POROS[®] CaptureSelect[®] FcXP (Thermo Fisher) и агарозную

аффинную смолу CaptureSelect[®] FcXP (Thermo Fisher). Дополнительные
примеры смол для аффинной хроматографии включают в себя смолу, имеющую
аминокислотную последовательность, кодируемую посредством SEQ ID NO: 1,
или ее варианты, которые специфически связываются с доменом СН3
5 человеческого IgG. Типичные смолы для аффинной хроматографии также
описаны в патенте US10259886.

Термин «специфически связывается», «специфическое связывание» или
«связывается специфически» следует понимать как означающий, что белок в
соответствии с настоящим изобретением реагирует или связывается чаще,
10 быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с
конкретным антигеном или экспрессирующей его клеткой, чем с альтернативными
антигенами или клетками. Например, лиганд, способный специфически
связываться с доменом СН3 человеческого IgG с существенно большей
аффинностью (например, в 1,5 раза или в 2 раза, или в 5 раз, или в 10 раз, или в
15 20 раз, или в 40 раз, или в 60 раз или в 80 раз, или в 100 раз, или в 150 или 200
раз), чем с другими антигенами. Обычно, но не обязательно, ссылка на
связывание означает специфическое связывание, и каждый термин следует
понимать как обеспечивающий явную поддержку другого термина.

Термин «лиганд» следует понимать для обозначения молекулы,
20 иммобилизованной на матрице смолы для аффинной хроматографии, которая
специфически связывается с доменом СН3 человеческого IgG. Например, лиганд
представляет собой фрагмент однодоменного антитела [VНН] верблюжьего
происхождения.

Термин «обогащенный препарат» следует понимать как включающий в себя
25 элюат, раствор или фармацевтическую композицию, описанные в настоящей
заявке. Обогащенный препарат в соответствии с настоящим изобретением
содержит IgG большей чистоты по сравнению с IgG в плазме или ее фракции.

Термин «фрагмент однодоменного [VНН] антитела верблюжьего
происхождения» следует понимать как означающий домен VНН антитела
30 верблюжьих. Антитело верблюжьих представляет собой антитело, полученное от
верблюдов и лам, и оно не имеет домена СН1, обычно присутствующего в
иммуноглобулинах человека, а имеет только один домен VНН. Типичные смолы
для аффинной хроматографии, содержащие фрагмент антитела [VНН]
верблюжьего происхождения, включают в себя смолы для аффинной

хроматографии на основе антител CaptureSelect[®] (Thermo Fisher). Например, такие как аффинная смола CaptureSelect[®] FcXL, аффинная смола POROS[®] CaptureSelect[®] FcXP, аффинная смола CaptureSelect IgG-CH1 и агарозная аффинная смола CaptureSelect FcXP. Другие типичные смолы для аффинной хроматографии включают в себя аффинную смолу IgSelect[®] (Cytiva), аффинную смолу HiTrap[®] IgSelect[®] (Cytiva), агарозную аффинную смолу Pierce[®] Protein G (Thermo Fisher), и быстротекущую аффинную смолу Protein G сефарозы 4 (Cytiva).

10 Термин «матрица» следует понимать для обозначения носителя, на котором иммобилизован лиганд. Типичными матрицами являются матрица из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) и матрица на основе агарозы.

15 Термин «емкость динамического связывания» или «ЕДС» хроматографической смолы следует использовать для обозначения максимального количества IgG, которое смола свяжет в рабочих условиях до того, как произойдет значительный прорыв несвязанного IgG.

Термин «на мл смолы» следует использовать для обозначения объема смолы на мл, упакованного во влажном состоянии.

20 Термин «высота слоя» следует понимать для обозначения высоты, на которой смолу для аффинной хроматографии упаковывают в колонку. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что термин «общая высота слоя» относится к высоте слоя всех колонок в установке непрерывной хроматографии.

25 Термин «фаза без загрузки» следует понимать для обозначения фазы, отличной от фазы загрузки метода непрерывной хроматографии. Например, фаза без загрузки может относиться к фазе уравнивания, фазе промывки, фазе элюирования, стрип-фазе и/или фазе повторного уравнивания.

Термин «цикл» следует понимать для обозначения одного цикла уравнивания, загрузки IgG, связывания, элюирования, стриппинга, дезинфекции и/или регенерации, выполняемого на смоле.

30 Термин «чистота» относится к доле IgG относительно общего содержания белка в очищенном IgG, препарате, обогащенном IgG, и фармацевтической композиции, выраженной в процентах.

Термин «промышленный или коммерческий масштаб», «крупномасштабный» или «производственный масштаб» относится к количеству

продукта, которое будет произведено в партии, предназначенной для клинических испытаний, разработки, продажи и/или распространения среди населения. Например, промышленный масштаб относится к крупномасштабной очистке IgG из плазмы или ее фракции с получением белкового продукта плазмы.

5

Термин «белковый продукт плазмы» относится к препарату, композиции и/или белковому продукту, содержащему белок плазмы (например, IgG или примесь, такую как альбумин), полученный в результате очистки плазмы или ее фракции. Обычно белок плазмы является преобладающим белком в белковом продукте плазмы.

10

Термин «фармацевтическая композиция» означает состав IgG с соединениями, общепринятыми в данной области техники для доставки IgG млекопитающим. Типичные соединения включают в себя все их фармацевтически приемлемые носители, разбавители или наполнители.

15

Термин «лечить» или «лечение» или «обработка» следует понимать как означающий введение терапевтически эффективного количества IgG, так что у субъекта снижается один или несколько симптомов или характеристик заболевания или у субъекта больше не диагностируют клиническое заболевание.

20

Термин «предотвращение», «предупреждать» или «предупреждение» включает в себя обеспечение профилактики возникновения или рецидива определенного заболевания у субъекта. Субъект может быть предрасположен к заболеванию или иметь риск его развития, но у него еще не диагностировано это заболевание.

25

Используемая в настоящей заявке фраза «замедление прогрессирования» включает уменьшение или снижение прогрессирования заболевания у субъекта и/или по меньшей мере одного симптома заболевания.

30

Термин «заболевание» следует понимать как означающий состояние или состояние здоровья субъекта, нуждающегося в лечении посредством IgG. Типичные заболевания включают в себя, но не ограничены этим, первичный иммунодефицит (ПИ), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП) и хроническую иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ХИТП).

Термин «субъект» следует понимать для обозначения любого животного, включая человека, например млекопитающего. К типичным субъектам относят,

помимо прочего, людей и приматов, не являющихся человеком. Например, субъектом является человек.

Непрерывная аффинная хроматография

Настоящее изобретение обеспечивает способ очистки IgG из плазмы или ее фракции с использованием непрерывной аффинной хроматографии.

Термин «непрерывная аффинная хроматография» следует понимать для обозначения хроматографического метода, включающего в себя одну или несколько колонок, заполненных идентичными аффинными смолами, при этом каждая колонка содержит одну или несколько зон. Зона представляет собой колонку или область колонки, содержащую смолу, где можно провести одну или несколько стадий хроматографии. Например, зону выбирают из группы, включающей в себя зону уравнивания, зону связывания, зону промывки, зону элюирования, зону стриппинга или их комбинации. В одном примере зону выбирают из группы, включающей в себя зону уравнивания, зону связывания, зону промывки, зону элюирования или их комбинации.

Непрерывная аффинная хроматография, содержащая более одной колонки, предполагает соединение колонок таким образом, чтобы обеспечить возможность работы колонок последовательно и/или параллельно. В принципе, IgG можно наносить на первую и/или последующие колонки, в то время как другие колонки (или другие зоны колонки) одновременно подвергаются уравниванию, промывке, элюированию и/или регенерации. Примеры непрерывной аффинной хроматографии будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке.

Примеры колонок, которые можно использовать для осуществления метода непрерывной хроматографии, будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Например, метод непрерывной хроматографии можно осуществлять с использованием Tricorn 5/100 (Cytiva). В другом примере метод непрерывной хроматографии можно осуществлять с использованием системы BioSMB PD (Sartorius).

Хроматография с псевдодвижущимся слоем (SMB)

В одном примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой хроматографию с псевдодвижущимся слоем (SMB). Термин «хроматография с псевдодвижущимся слоем» или «хроматография SMB» относится к методу хроматографии, впервые описанному в патенте США

2,985,589. Примеры установки и/или устройства для хроматографии SMB будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Концепция псевдодвижущегося слоя предполагает использование нескольких колонок меньшего размера (а не одной большой колонки), содержащих твердый абсорбент (например, аффинную смолу) и одновременное выполнение одной или нескольких стадий непрерывной хроматографии (т.е. уравнивания, связывания, промывки, элюирования или стриппинга) на разных колонках в непрерывном цикле.

Пример хроматографической установки SMB состоит из колонок, разделенных на четыре секции, по одной или более колонок на секцию. Два входных потока (сырье и элюент) и два выходных потока (экстракт и рафинат) направляются в чередующемся порядке к кольцу колонны и от него. Положения входа и выхода переключаются через равные промежутки времени по направлению потока жидкости, имитируя таким образом противоточное движение колонок. Сырье (содержащее адсорбируемые компоненты (экстракт)) загружается в одну или несколько колонок хроматографической установки SMB, и экстракт связывается со смолой внутри колонок. При этом через колонку проходят менее адсорбированные компоненты (рафинат) сырья. Рафинат можно загрузить в одну или несколько последующих колонок или удалить из хроматографической системы SMB как отходы. В колонку загружают элюент для сбора экстракта. Например, элюат может быть собран из первой колонки, в то время как дополнительное количество сырья загружается в одну или несколько последующих колонок.

Подходящие буферы для промывки и элюирования, имеющие характеристики в соответствии с настоящим изобретением, будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. В одном примере промывочный буфер содержит 20 мМ дигидрофосфат натрия, 145 мМ хлорида натрия и имеет pH 7,4. В одном примере промывочный буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеет pH 7,4.

Смола в хроматографии SMB может подвергаться множеству циклов (например, 50 циклов) уравнивания смолы, загрузки IgG, связывания, элюирования, стриппинга, дезинфекции и/или регенерации на каждую используемую партию плазмы или ее фракции. Многократные прогоны партий

(например, от 4 до 10 партий) могут быть выполнены с использованием хроматографии SMB. Общий срок службы смолы в хроматографии SMB может составлять от 200 до 500 циклов (если не больше), прежде чем смола станет непригодной для использования. Регенерацию смолы обычно проводят, чтобы
5 обеспечить возможность многократного использования смолы.

Периодическая противоточная хроматография (РСС)

В одном примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой периодическую противоточную хроматографию (РСС). Примеры установки и/или устройства РСС будут очевидны специалисту в данной области
10 техники и/или описаны в настоящей заявке. Концепция РСС предполагает использование нескольких колонок, содержащих твердый абсорбент (например, аффинную смолу), и параллельное выполнение стадий хроматографии квазинепрерывным образом. Буферы, используемые на этапах связывания, промывки и/или элюирования, текут противотоком по отношению к аффинной
15 смоле.

Пример установки РСС предполагает использование двух колонок. На первом этапе образец загружают в первую колонку выше ЕДС смолы, так что несвязанный продукт (например, IgG) прорывается через первую колонку и захватывается второй колонкой. На втором этапе первую колонку промывают, элюируют, очищают и/или повторно уравнивают независимо от загрузки
20 второй колонки дополнительным образцом. На третьем этапе во вторую колонку загружают дополнительный образец выше ЕДС смолы, так что несвязанный продукт прорывается через вторую колонку и захватывается первой колонкой. На четвертом этапе вторую колонку промывают, элюируют, очищают и/или
25 повторно уравнивают независимо от того, загружают ли первую колонку дополнительным образцом. Этапы процесса непрерывно циклически повторяют между двумя колонками.

Другой пример установки РСС предполагает использование нескольких колонок. Например, вариант описанной выше установки РСС может включать в
30 себя использование нескольких колонок для улавливания несвязанного продукта, что имитирует использование большой колонки.

Непрерывная противоточная тангенциальная хроматография (ССТС)

В одном примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой непрерывную противоточную тангенциальную хроматографию (ССТС). Примеры

установки и/или устройства ССТС будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Концепция ССТС предполагает использование аффинной смолы в виде суспензии, при этом суспензия непрерывно направляется через ряд статических смесителей и полволоконных мембран, которые отделяют жидкую фазу от смолы. ССТС обычно осуществляют при низком давлении.

Пример процесса ССТС включает в себя стадии связывания, первой промывки, второй промывки, элюирования, стриппинга и/или уравнивания. Другой пример процесса ССТС включает в себя этапы связывания, первой промывки, второй промывки, элюирования и/или уравнивания. Например, процесс ССТС не включает стадию стриппинга. Образец (например, плазму или ее фракцию) и аффинную смолу пропускают через статические смесители и полволоконные мембраны на стадии связывания. Примеси удаляются при протекании полволоконных мембран на этапе промывки, в то время как связанный со смолой продукт (т.е. IgG) удерживается мембраной. Полые волокна удерживают смолу и позволяют продукту проходить через нее на стадии элюирования. Смолы отгоняют и/или уравнивают, и процесс повторяют.

Непрерывная противоточная спиральная хроматография (CCSC)

В одном примере непрерывная аффинная хроматография представляет собой непрерывную противоточную спиральную хроматографию (CCSC). Примеры установки и/или устройства CCSC будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Концепция CCSC предполагает использование компактной сепарационной колонки с вращающимся змеевиком, установленной на вращающейся раме центрифуги. В настоящее время доступны две конструкции разделительной колонки: узел спирального диска и узел поддержки спиральной трубки.

Типичный процесс CCSC включает в себя спиральную разделительную колонку, вращающуюся вокруг центральной оси центрифуги и синхронно вращающуюся вокруг своей собственной оси (например, со скоростью от 1000 до 1200 об./мин.). Подвижную фазу можно пропускать через ротор центрифуги без вращающихся уплотнений, при этом большое количество неподвижной фазы сохраняется, в то время как две фазы смешиваются по длине колонки, обеспечивая высокоэффективное разделение растворенных веществ.

Смола для аффинной хроматографии

Настоящее изобретение обеспечивает способ очистки иммуноглобулина G (IgG) из плазмы или ее фракции с использованием смолы для аффинной хроматографии. Аффинная смола в соответствии с настоящим изобретением содержит лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG.

Подходящие смолы для аффинной хроматографии будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. В одном примере смола содержит лиганд фрагментов однодоменного [VНН] антитела верблюжьего происхождения. Специалисту в данной области техники должно быть известно, что лиганды на основе фрагментов однодоменных антител [VНН] верблюжьего происхождения способны специфически связываться со всеми подклассами IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Примерами смол являются смолы для аффинной хроматографии CaptureSelect[®] FcXP (Thermo Fisher), аффинная смола CaptureSelect[®] FcXL (Thermo Fisher), аффинная смола CaptureSelect[®] IgG-CH1 (Thermo Fisher) и агарозная аффинная смола CaptureSelect[®] FcXP (Thermo Fisher). Другие типичные смолы для аффинной хроматографии включают в себя аффинную смолу IgSelect[®] (Cytiva), аффинную смолу HiTrap[®] IgSelect[®] (Cytiva), агарозную аффинную смолу Pierce[®] Protein G (Thermo Fisher), и быстротекущую аффинную смолу с сефарозой 4 Protein G (Cytiva).

В одном примере смола для аффинной хроматографии содержит фрагмент однодоменного [VНН] антитела верблюжьего происхождения и матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола). Например, смолой для аффинной хроматографии является аффинная смола POROS[®] CaptureSelect[®] FcXP (Thermo Fisher). Матрица из сшитого поли(стирол-дивинилбензола) позволяет смоле выдерживать давление до 100 бар.

В одном примере смола для аффинной хроматографии содержит фрагмент однодоменного [VНН] антитела верблюжьего происхождения и матрицу на основе агарозы. Например, смолой для аффинной хроматографии является агарозная аффинная смола CaptureSelect FcXP (Thermo Fisher).

В одном примере процесс непрерывной аффинной хроматографии проводят при давлении в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5 бар. Например, процесс непрерывной аффинной хроматографии проводят при давлении в диапазоне от приблизительно 3 до приблизительно 4 бар. В одном

примере процесс непрерывной аффинной хроматографии осуществляют при давлении в диапазоне от приблизительно 3,25 до приблизительно 3,5 бар.

Буферы

Настоящее изобретение предлагает метод непрерывной аффинной хроматографии с использованием буферов, которые обеспечивают эффективное связывание IgG со смолой и сбор ее со смолы. Обычно плазма или ее фракция имеют нейтральный рН (рН около 7,4). Смолу уравнивают уравнивающим буфером и/или промывают промывочным буфером, диапазон буферности которого охватывает нейтральный рН. Подходящие промывочные буферы включают в себя буферные агенты, имеющие константу диссоциации (рКа) от 6,8 до 8,5 при 25 °С.

Типичным буферным агентом уравнивающего и/или промывочного буфера является дигидрофосфат натрия, где фосфорнокислый компонент дигидрофосфата натрия имеет три константы диссоциации (рКа: 2,16, 7,21 и 12,32). Фосфорная кислота имеет константу диссоциации примерно при рН буфера для элюирования и/или стриппинга, используемого в методе непрерывной аффинной хроматографии. Однако фосфорная кислота не имеет константы диссоциации между рН уравнивающего и/или промывочного буфера (более высокий рН) и буфера для элюирования и/или стриппинга (более низкий рН), используемого в методе непрерывной аффинной хроматографии. Это позволяет быстро переключаться между стадиями промывки и элюирования, а также стадиями стриппинга и уравнивания, обеспечивая более четкие пики и более короткие фазы хроматографии. Преимущество использования таких уравнивающих и/или промывочных буферов состоит в том, что можно использовать меньшие объемы буфера, тем самым увеличивая эффективность метода непрерывной аффинной хроматографии.

Другие подходящие буферные агенты уравнивающего и/или промывочного буфера включают имидазол (рКа: 7,0), Трис (рКа: 8,30), глицилглицин (рКа: 8,40), MOPS (рКа: 7,2), PIPES (рКа: 6,8), TES (рКа: 7,40), Бицин (рКа: 8,35), HEPES (рКа: 7,55), EPPS (рКа: 8,00), HEPPSO (рКа: 7,85), MOBS (рКа: 7,60), POPSO (рКа: 7,78), TAPSO (рКа: 7,61), Трицин (рКа: 8,05), TEA (рКа: 7,76).

Анализ состава IgG

Способы определения выхода, чистоты и распределения подклассов IgG будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке.

5 В одном примере чистоту определяют с помощью SDS-PAGE и MALDI-TOF-MS анализа пептидных отпечатков. Вкратце, очищенный IgG, препарат, обогащенный IgG, или фармацевтическую композицию, содержащую IgG, описанные в настоящей заявке, загружают в подходящий гель для электрофореза в SDS-PAGE (например, 8-16 % ТРИС-глицин) вместе с маркером размера белка и положительным контролем для IgG (например, Priviligen) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Белки разделяют по размеру, а интересующие белковые полосы выделяют, обрабатывают и анализируют с помощью MALDI-TOF-MS.

15 В другом примере примеси в обогащенном IgG препарате или содержащей IgG фармацевтической композиции, описанных в настоящей заявке, измеряют с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием антител, специфичных к примесям (например, IgA). Например, ELISA осуществляют с использованием коммерчески доступных методов. В одном примере чистоту, выход и/или распределение IgG по подклассам определяют с помощью нефелометрии. В одном примере чистоту IgG определяют посредством нефелометрии. В одном примере с помощью нефелометрии определяют выход IgG. В одном примере с помощью нефелометрии определяют распределение IgG по подклассам. Например, картины светорассеяния очищенного IgG, препарата, обогащенного IgG, или фармацевтической композиции, содержащей IgG, описанные в настоящей заявке, измеряют с помощью нефелометрии и сравниваются с профилями светорассеяния композиций с известным распределением подклассов IgG.

Стабильность плазмы и ее фракций

30 Стабильность плазмы или ее фракции при загрузке на описанную в настоящей заявке аффинную смолу можно определить путем оценки прокоагулянтной активности, протеолитической активности и размера частиц плазмы или ее фракции. Способы оценки прокоагулянтной активности, протеолитической активности и размера частиц будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке. Вкратце, плазму или ее фракцию замораживают/оттаивают в одном или нескольких циклах и хранят

при температуре от 2°C до 32°C (например, 2°C, 10°C, 18°C, 21°C, 28°C или 32°C) в течение 24 или до 48 часов и анализируют с использованием одного или нескольких методов, описанных ниже. В одном примере плазму или ее фракцию размораживают в одном или нескольких циклах при температуре 32°C, хранят в течение 24 или до 48 часов и анализируют с использованием одного или нескольких методов, описанных ниже. В другом примере плазму или ее фракцию размораживают в одном или нескольких циклах при температуре 32°C, хранят в течение 24 или до 48 часов и анализируют с использованием одного или нескольких методов, описанных ниже, а затем охлаждают и хранят при температуре 21°C. В одном примере плазму или ее фракцию размораживают при температуре 32°C и при температуре 21°C перед непрерывной аффинной хроматографией.

В одном примере прокоагулянтную активность в плазме или ее фракции можно определить с помощью анализа коагуляции *in vitro*, например, анализа активированного частичного тромбопластинового времени (NaPTT). Анализ NaPTT измеряет скорость, с которой один или несколько факторов свертывания крови (например, фибриноген, протромбин, проакселерин, антигемофильный фактор, фактор Стюарта-Пауэра, антецедент плазменного тромбопластина и фактор Гегемана) активируются или образуются в плазме или ее фракции, когда к анализу добавляют активаторы свертывания крови (например, диоксид кремния, каолин, эллаговую кислоту).

В одном примере протеолитическую активность в плазме или ее фракции можно оценить путем измерения активности тромбина, общих сериновых протеаз, калликреина, плазмина и FXa, например, с использованием коммерчески доступных наборов, таких как набор для анализа активности тромбина (S-2238), набор для общего анализа сериновой протеазы (S-2288), набор для анализа активности калликреина (S-2302), набор для анализа активности плазмина (S-2251) и активности FXa (S-2765).

В одном примере размер любых частиц в плазме или ее фракции оценивают с помощью визуализации микропотоков (MFI) и рассчитывают индекс полидисперсности. Расчет индекса полидисперсности будет очевиден для специалиста в данной области техники.

Дополнительные стадии очистки

Дополнительные стадии очистки могут быть выполнены до или после стадии непрерывной хроматографии. В одном примере дополнительные стадии очистки могут быть выполнены перед стадией непрерывной хроматографии. В одном примере дополнительные стадии очистки могут быть выполнены после 5 стадии непрерывной хроматографии.

В одном примере способ дополнительно включает в себя одну или несколько стадий, выбранных из группы, включающей в себя осаждение этанолом, фракционирование октановой кислотой, ионообменную хроматографию, вирусную инактивацию, вирусную фильтрацию и 10 ультрафильтрацию/ диафильтрацию. Дополнительные стадии очистки будут очевидны специалисту в данной области техники и/или описаны в настоящей заявке.

В одном примере способ дополнительно включает в себя осаждение этанолом. Например, холодный этанол можно использовать для выделения и 15 обогащения IgG путем удаления альбумина и α - и β -глобулинов из плазмы или ее фракций. Например, как описано в WO 2011/149472.

В одном примере способ дополнительно включает в себя иммуноаффинную хроматографию. Например, способ дополнительно включает в себя аффинную хроматографию изоагглютининов с использованием смолы Eshmuno анти-A и 20 анти-B. Например, для удаления изоагглютининов A и B можно использовать аффинную хроматографию изоагглютининов.

В одном примере способ дополнительно включает в себя фракционирование октановой кислотой. Октановая кислота может быть использована для удаления липидов и белков плазмы (кроме IgG). Например, как 25 описано в WO 2011/131787.

В одном примере способ дополнительно включает в себя ионообменную хроматографию. В одном примере ионообменная хроматография представляет собой анионообменную хроматографию. Например, анионообменную хроматографию можно использовать для удаления IgA, оставшегося IgM и 30 других компонентов плазмы (кроме IgG).

Анионообменник может представлять собой анионообменник на основе смолы, анионообменный мембранный адсорбер или анионообменник любого другого формата с положительно заряженной подложкой для улавливания отрицательно заряженных частиц. В одном примере анионообменник

представляет собой анионообменный мембранный адсорбер. В другом примере анионообменник представляет собой анионообменник на основе смолы. В следующем примере анионообменник представляет собой монолитный анионообменник.

5 В одном примере способ дополнительно включает анионообменную хроматографию с использованием анионообменника на основе смолы. Например, анионообменная хроматографическая смола является сильным анионообменником. В одном примере сильная анионообменная смола содержит матрицу, состоящую из матрицы поли(стирол-дивинилбензола). В одном
10 примере сильный анионообменник содержит кватернизованную полиэтилениминовую функциональную группу. Подходящие анионообменники на основе смолы будут очевидны специалисту и включают, например, POROS™ HQ 50.

В одном примере стадию анионообменной хроматографии осуществляют в
15 проточном режиме. В другом примере стадию анионообменной хроматографии проводят в режиме связывания и элюирования.

В одном примере стадия анионообменной хроматографии включает в себя буфер, выбранный из группы, включающей в себя цитрат натрия, 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES) буфер, дигидрофосфат натрия, Бис-
20 Трис, фосфат, *L*-гистидин и их комбинации. В одном примере стадия анионообменной хроматографии включает в себя буфер, содержащий MES буфер. В другом примере стадия анионообменной хроматографии включает фосфатный буфер.

В одном примере способ дополнительно включает в себя инактивацию
25 вируса. Например, инактивацию вируса можно осуществить, доведя раствор до низкого значения pH. Низкий pH может представлять собой pH от 2 до 4. В одном примере инактивацию вируса при низком pH проводят в присутствии каприлата. В другом примере вирусная инактивация может быть осуществлена путем приведения в контакт плазмы или ее фракции, или препарата,
30 обогащенного IgG, или фармацевтической композиции, содержащей IgG, с *n*-октил-β-*D*-глюкопиранозидом (OG), образуя таким образом смесь OG-IgG. В другом примере инактивацию вируса при низком pH осуществляют в присутствии *N*-оксида *N,N*-диметилмиристиламина (TDAO).

В другом примере вирусную инактивацию можно осуществить путем воздействия на плазму или ее фракцию, или обогащенный IgG препарат, или содержащую IgG фармацевтическую композицию на стадию инактивации растворителем-детергентом. Подходящие обработки растворителем-детергентом
5 будут очевидны специалисту в данной области техники и включают в себя, например, экологически чистые детергенты. Примеры экологически чистых детергентов, подходящих для использования в настоящем изобретении и, в частности, для использования при инактивации вирусов с липидной оболочкой, включают в себя *N*-оксид *N,N*-диметилмиристиламина (TDAO), полисорбат 80
10 (PS80), изооктилциклогексильный эфир полиоксиэтилена (10) (TRITON® X-100-reduced) и неионогенное поверхностно-активное вещество, полученное из глюкозы и спирта (например, составы Simulsol™). В одном примере детергентом является *N*-оксид *N,N*-диметилмиристиламина (TDAO). В одном примере детергентом является полисорбат 80. В другом примере детергентом является
15 изооктилциклогексильный эфир полиоксиэтилена (10) (TRITON® X-100-восстановленный). В другом примере детергент представляет собой неионогенное поверхностно-активное вещество, полученное из глюкозы и спирта.

В одном примере концентрация OG в смеси OG-IgG находится в диапазоне
20 от 25 мМ до 80 мМ. Например, концентрация OG в смеси OG-IgG находится в диапазоне от 25 мМ до 50 мМ, или от 50 мМ до 80 мМ, или от 30 мМ до 60 мМ. Например, концентрация OG в смеси OG-IgG составляет 25 мМ, или 30 мМ, или 35 мМ, или 40 мМ, или 45 мМ, или 50 мМ, или 55 мМ, или 60 мМ, или 65 мМ, или 70 мМ, или 75 мМ или 80 мМ.

25 В одном примере концентрация OG в смеси OG-IgG составляет 30 мМ.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG, или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с OG на срок до 15 минут. Например, плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в
30 контакт с OG в течение до 0,5 минуты, или 1 минуты, или 1,5 минут, или 2 минут, или 2,5 минут, или 3 минут, или 3.5 минут, или 4 минут, или 4,5 минут, или 5 минут, или 5,5 минут, или 6 минут, или 6,5 минут, или 7 минут, или 7,5 минут, или 8 минут, или 8,5 минут, или 9 минут, или 9,5 минут, или 10 минут,

или 10,5 минут, или 11 минут, или 11,5 минут, или 12 минут, или 12,5 минут, или 13 минут, или 13,5 минут, или 14 минут, или 14,5 минут или 15 минут.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре в диапазоне от 2 °С до 28 °С. Например, плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре в диапазоне от 2°С до 8°С, или от 2°С до 28°С, или от 2°С до 25°С, или от 2°С до 20°С, или от 2°С до 18°С, или от 2°С до 15°С, или от 2°С до 10°С. Например, плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре 2°С, или 3°С, или 4°С, или 5°С, или 6°С, или 7°С, или 8°С, или 9°С, или 10°С, или 11°С, или 12°С, или 13°С, или 14°С, 15°С, или 16°С, или 17°С, или 18°С, или 19°С, или 20°С, или 21°С, или 22°С, или 23°С, или 24°С, или 25°С, или 26°С, или 27°С или 28°С.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре 2°С.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре 8°С.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре 10°С.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре 18°С.

В одном примере плазму или ее фракцию, или препарат, обогащенный IgG или содержащую IgG фармацевтическую композицию вводят в контакт с ОГ при температуре 28°С.

В одном примере способ дополнительно включает в себя вирусную фильтрацию. Например, вирусные фильтрующие мембраны с размером пор 15-20 нм можно использовать для удаления микробов и вирусов из раствора, элюата или фармацевтической композиции. Типичные наночастилки включают Planova S20N (Asahi), Virosart HC (Sartorius) и Planova 20N (Asahi).

В одном примере способ дополнительно включает в себя ультрафильтрацию/диафильтрацию. Типичными мембранами для ультрафильтрации/диафильтрации являются кассеты Pellicon 2 (Millipore) или кассеты из полиэфирсульфона или Hydrosart (Sartorius).

5 Фармацевтические композиции

Очищенный IgG в соответствии с изобретением (син. активные ингредиенты) можно использовать для приготовления фармацевтических композиций для парентерального введения, такого как внутривенное введение или подкожное введение, для терапевтического и профилактического лечения.

10 Композиции для введения обычно включают в себя раствор очищенного IgG в соответствии с изобретением, растворенный в фармацевтически приемлемом носителе, таком как водный носитель. Можно использовать различные водные носители, например, забуференный физиологический раствор и т.п. Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые носители,
15 необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как агенты, регулирующие pH и буферные агенты, агенты, регулирующие токсичность, и тому подобное, например, ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и тому подобное.

Концентрация очищенного IgG согласно настоящему изобретению в этих
20 препаратах может широко варьироваться и может быть выбрана, главным образом, исходя из объемов жидкости, вязкости, массы тела и т.п. в соответствии с выбранным конкретным способом введения и потребностями пациента. Носители могут содержать незначительные количества добавок, повышающих изотоничность и химическую стабильность, например, буферы и
25 консерванты. Например, фармацевтическая композиция содержит пролин в качестве стабилизирующего агента.

Подходящие фармацевтические композиции в соответствии с изобретением обычно включают в себя некоторое количество очищенного IgG согласно
30 настоящему изобретению, смешанного с приемлемым фармацевтическим носителем, таким как стерильный водный раствор, для получения диапазона конечных концентраций в зависимости от предполагаемого применения. Методики получения широко известны в данной области техники, что подтверждается в Remington's Pharmaceutical Sciences, 16-е изд. Mack Publishing Company, 1980.

Например, концентрация IgG фармацевтической композиции составляет от 1 до 5 % мас./об., от 5 до 15 % мас./об., или от 8 до 12 % мас./об. Например, концентрация IgG фармацевтической композиции составляет 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, или 6 %, или 7 %, или 8 %, или 9 %, или 10 %, или 11 %, или 12 %, или 13 %, или 14 % или 15 % мас./об. Для внутривенного применения можно использовать 1 % мас./об. (т.е. 10 г IgG/л). Для внутривенного применения можно использовать 10 % мас./об. (т.е. 100 г IgG/л).

Для подкожного введения можно использовать более высокую концентрацию. Например, от 15 до 35 % мас./об., или от 20 до 30 % мас./об. В одном примере концентрация IgG фармацевтической композиции составляет 16 %, или 17 %, или 18 %, или 19 %, или 20 %, или 21 %, или 22 %, или 23 %, или 24 %, или 25 % или 26 % мас./об.

Способ применения

Как обсуждалось в настоящей заявке, в данном изобретении предложен способ лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования состояния у субъекта, включающий в себя введение субъекту IgG или фармацевтического состава.

В одном примере заболевание выбирают из группы, включающей в себя первичный иммунодефицит (ПИ), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП) и хроническую иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ХИТП).

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Аффинная смола

Для оценки подходящих смол для захвата IgG из плазмы или ее фракции были использованы смолы для аффинной хроматографии POROS[®] CaptureSelect[®], аффинная смола FcXP (Thermo Fisher) и агарозная аффинная смола CaptureSelect[®] FcXP (Thermo Fisher). Обе смолы для аффинной хроматографии содержат лиганд, способный связываться с доменом СН3 человеческого IgG, в частности, фрагмент однодоменного антитела [VHH] верблюжьего происхождения, и матрицу либо из сшитого поли(стирол-дивинилбензола), либо агарозы. Смолы для аффинной хроматографии упаковывали в колонки Tricorn от Cytiva (диаметр 5 мм) и хроматографию проводили на системе Äkta avant 25 (Cytiva).

Криообогащенную плазму (CRP) и криообедненную плазму (CPP) (приготовленная в CSL Behring) нагревали до 37 °С и фильтровали через бутылочный фильтр с размером пор 0,22 мкм. Смолы для аффинной хроматографии оценивали с использованием условий хроматографии и буферов, предоставленных Thermo Fischer, описанных в Таблице 1 ниже.

Таблица 1 Буферы для аффинной хроматографии, используемые для оценки смол FcXP для очистки IgG из CCP и CPP человека.

Фаза хроматографии	Буфер
Уравновешивание	10 мМ буферы лимонной кислоты, 150 мМ хлорида натрия, рН 7,4
Промывка колонки	10 мМ буферы лимонной кислоты, 150 мМ хлорида натрия, рН 7,4
Элюирование	20 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 4,0
Стриппинг колонки	100 мМ буфера лимонной кислоты, рН 2,0
Нейтрализация элюата	1 М исходной смеси Трис, разбавленной до 20 мМ в конечном образце

Очистка IgG из CRP и CPP с использованием аффинной смолы POROS® CaptureSelect® FcXP привела к более высоким выходам извлеченного IgG и несколько более высокой чистоте элюента по сравнению с использованием агарозной аффинной смолы CaptureSelect® FcXP. На основании этих первоначальных результатов была дополнительно оценена пригодность аффинной смолы POROS® CaptureSelect® FcXP для применения в непрерывной аффинной хроматографии.

Пример 2: Состав буфера

Недостатком промывочного буфера из таблицы 1 является то, что буферный агент лимонная кислота имеет три константы диссоциации (рKa1: 3,13, рKa2: 4,76, рKa3: 6,4) и не обеспечивает подходящего буфера при рН 7,4, необходимом для уравновешивания. Кроме того, сдвиг рН между промывкой и элюированием, а также стриппингом и уравновешиванием с использованием буферов, содержащих лимонную кислоту (как представлено в таблице 1), приводит к неэффективным изменениям рН и удлинению фаз во время хроматографии.

Для определения подходящих буферных композиций, позволяющих быстро регулировать рН во время непрерывной аффинной хроматографии, эксперименты, проведенные в примере 1, повторяли с использованием аффинной

смолы POROS® CaptureSelect® FcXP с использованием хроматографических буферов из таблицы 2 вместо таблицы 1.

Таблица 2 Буферы для аффинной хроматографии, используемые для оценки аффинной смолы POROS® CaptureSelect® FcXP для очистки IgG из CRP и CPP человека.

5

Фаза хроматографии	Буфер
Уравновешивание	20 мМ дигидрофосфат натрия буфер, 145 мМ хлорида натрия, рН 7,4
Промывка колонки	20 мМ дигидрофосфат натрия буфер, 145 мМ хлорида натрия, рН 7,4
Элюирование	20 мМ натрий-ацетатного буфера, рН 4,0
Стриппинг колонки	20 мМ дигидрофосфат натрия буфер, рН 2,5

10

Дигидрофосфат натрия, присутствующий в промывочном буфере, имеет три константы диссоциации (рКа1: 2,16, рКа2: 7,21 и рКа3: 12,32), которые соответствуют рН 7,4, необходимому для уравновешивания смолы. Установлено, что повышение концентрации буфера дигидрофосфата натрия до 20 мМ исключает эффекты недостаточного буферирования в ходе экспериментов. Тем не менее, в промывочном буфере можно использовать более низкие концентрации дигидрофосфата натрия.

15

Результаты показали, что использование дигидрофосфата натрия позволяет быстро переключаться между низким рН во время элюирования и стриппинга и высоким рН во время уравновешивания и промывки, давая более определенные пики и более короткие фазы при непрерывной аффинной хроматографии.

20

Никакой разницы в связывании IgG при рН 7,4 и 7,8 не наблюдали, что позволяет наносить на смолу CRP и CPP с рН, находящимся в этом диапазоне, без корректировки рН.

Пример 3: Высота слоя и скорость потока

25

Для определения условий, позволяющих сократить фазы загрузки и отсутствия загрузки, оценивали высоту слоя и скорости потока, используемые в процессе хроматографии. Эксперименты, описанные в примере 2, повторяли при различной высоте слоя смолы и с разными скоростями потока плазмы или ее фракции и элюирующего буфера, нанесенного на смолу.

Высота слоя 20 см показала значительно более высокую эффективность очистки IgG из плазмы или ее фракции по сравнению с более низкой высотой

слоя, что позволило сократить фазы без загрузки. Снижение скорости потока до 150 см/ч (время контакта 5 минут) во время элюирования не показало существенного эффекта по сравнению с элюированием при 2400 см/ч. Неожиданно было обнаружено, что скорость потока загрузки, при которой плазму или ее фракцию наносят на смолу, увеличивалась до 2400 см/ч. (время контакта 0,5 минуты) без значительного снижения связывания IgG.

Оптимизированные условия очистки IgG из плазмы или ее фракции, определенные в результате обширных экспериментов, обобщены в Таблице 3 ниже. Комбинация выбранных буферных композиций, смолы, высоты слоя и скоростей потока привела к уменьшению объема отходов, протекания и продукта во время каждой из фаз без загрузки (т. е. уравнивания, промывки, элюирования, стрип и повторного уравнивания).

Таблица 3: Оптимизированные условия для очистки IgG из CRP и CPP человека с использованием аффинной смолы POROS® CaptureSelect® FcXP. Высота слоя колонки диаметром 5 мм составляла примерно 20 см. Время контакта составляло 0,5 мин., что приводило к скорости потока до 2400 см/ч.

Фаза хроматографии	Вход	Объемы	Выход
Уравнивание	Уравнивание буфер	0.5 ОК	Отходы
Загрузка	Осветленная криообедненная плазма (с[IgG]= 7 мг/мл)	4.3 ОК	Поток
Промывка	Уравнивание буфер	1.5 ОК	Поток
Промывка 2	Элюирование буфер	0.5 ОК	Поток
Элюирование	Элюирование буфер	1.8 ОК	Продукт
Стриппинг	Буфер для стриппинга	1.8 ОК	Отходы
Повторное уравнивание	Уравнивающий буфер	2.5 ОК	Отходы

При использовании колонок с высотой слоя 20 см общий объем незагрузочных фаз составил 8,6 ОК, тогда как объем загрузки осветленной CRP составил 4,3 ОК. Соотношение незагруженного/загруженного ОК составило 2, что позволяло настроить SMB всего с тремя колонками. Аналогичный результат

наблюдали при высоте слоя колонки примерно 6 см. Общий объем незагрузочных фаз в экспериментах, проведенных в колонках с высотой слоя примерно 6 см, составлял 7 ОК, тогда как объем загрузки осветленной CPP составлял 3,8. Соотношение незагруженного/загруженного ОК составило 1,8, что позволяло настроить SMB всего с тремя колонками, вместо четырех колонок. Результаты показывают, что независимо от высоты слоя уменьшение объема незагрузочных фаз позволяет использовать меньшее количество колонок в способе очистки.

Кроме того, IgG был элюирован в 1,8 ОК, что давало коэффициент концентрации 2,4. Время цикла (исключая разгон насоса и промывку насоса) составляло примерно 6,5 минут.

Дальнейшее уплотнение возможно за счет перекрытия фаз элюирования и стриппинга, как и фаз промывки и элюирования. Увеличение концентрации буфера или pH во время повторного уравнивания приведет к дальнейшему уменьшению необходимого буфера, обеспечивая постоянное соотношение ОК без загрузки/загрузки менее 2, даже если количество загруженной плазмы или ее фракции уменьшается из-за старения смолы.

Пример 4: Профиль элюата

Чистота

Для качественного определения чистоты элюата примеров 2 и 3, проводили гель-электрофорез SDS-PAGE. Образцы (8 мкг и 16 мкг) IgG, очищенного от осветленной CPP с использованием смолы FcXP в соответствии с примерами 2 и 3 (FcXP), анализировали на геле с 8-16 % ТРИС-глицином SDS-PAGE в восстановленных и невосстановленных условиях (Фигура 1). Также был включен белковый маркер (M) See Blue Plus 2 Marker (Invitrogen). Гели SDS-PAGE окрашивали Кумасси. Чистота IgG из осветленной CPP, очищенного с использованием аффинной смолы POROS[®] CaptureSelect[®] FcXP, как определено посредством SDS-PAGE, составила 98,7 %.

Для определения профиля примесей в элюате примеров 2 и 3 проводили массовый отпечаток пептидов MALDI-TOF-MS. Видимые полосы (отмечены стрелками на Фигуре 1) были выделены и использованы для массового отпечатка пептидов MALDI-TOF-MS для определения идентичности белков на каждой полосе. Примеси были идентифицированы с помощью массового отпечатка пептидов MALDI-TOF-MS (отмечены стрелками A-F на Фигуре 1) и

суммированы в таблице 4. Остальные полосы (стрелки без обозначенных букв на Фигуре 1) были идентифицированы как IgG. Наиболее распространенными примесями в образцах FcXP были IgM, альбумин и аполипопротеин А-1 (стрелки В, С и F на Фигуре 1). Остальные три компонента системы комплемента представляли собой второстепенные примеси (стрелки А, D и E на Фигуре 1 и полосы А, D и E в Таблице 4).

Таблица 4: Примеси, присутствующие в элюате, элюированном из аффинной смолы POROS® CaptureSelect FcXP, идентифицированные с помощью MALDI-TOF-MS

Полосы	Примесь
А	Субкомпонент C1r
В	IgM
С	HSA
D	Субкомпонент C1r субъединицы В
Е	Субкомпонент C1q субъединицы С
F	Аполипопротеин А-1

10

Эксклюзионная ВЭЖХ показала, что среднее содержание мономеров и димеров IgG в элюате составляло 98,1 % с содержанием 0,9 % полимера и 1,0% фрагментов.

Для определения изоэлектрической точки (pI) примесей в элюате по сравнению с IgG проводили 2D-разностный гель-электрофорез (2D DIGE). Образцы очищенного IgG из осветленной CPP (элюат FcXP POROS®) загружали красителями Sci5 и Sci3 соответственно и загружали на 2D-SDS-PAGE. Разделение образцов по изоэлектрической точке проводили при pH от 3 до 10 с последующим разделением по размерам в присутствии SDS в восстанавливающих условиях (Фигура 2). В образцах элюата FcXP POROS® (Фигура 2) было обнаружено, что IgG имеет изоэлектрические точки между pH 7 и 9. В элюате было идентифицировано, что IgM и альбумин имеют pH примерно 6,5 (кружок на Фигуре 2), что ниже изоэлектрических точек IgG.

20

Результаты показывают, что удаление IgM и альбумина из элюата возможно с использованием стадии ионообменной очистки без потери значительных количеств IgG.

25

Распределение подклассов IgG

Чтобы определить, влияет ли аффинная смола, использованная при очистке IgG, на распределение подклассов IgG в элюате примеров 2 и 3, проводили

иммунонефелометрию. Распределение подклассов IgG определяли для CRP, CPP, очищенного IgG из CRP или CPP с использованием POROS® CaptureSelect® FcXP (Фигура 3). Распределение подклассов рассчитывали по относительной доле класса IgG по отношению к сумме всех классов ($IgGx/(IgG1+ IgG2+ IgG3+ IgG4)$).

Выход

Выход определяли с помощью иммунонефелометрии. По меньшей мере 95 % IgG было выделено в элюате из плазмы примеров 2 и 3, что достигало 96 %.

10 **Пример 5: Цикличность очистки**

Чтобы определить влияние цикличности очистки на аффинную смолу POROS® CaptureSelect® FcXP, последовательно выполняли несколько циклов очистки и определяли связывающую способность смолы. В различные моменты в течение нескольких циклов очистки определяли поведение прорыва чистого IgG и использовали его для расчета остаточной связывающей способности смолы. Утрата связывающей способности может быть связана со старением смолы.

CRP или CPP наносили на смолу (высота слоя 6 см или 20 см), чтобы обеспечить контакт плазмы со смолой в течение 0,5 минут для каждой фазы, и с течением времени определяли связывающую способность смолы. На фигуре 4 показано, что не было разницы в старении смолы при хроматографии SMB, выполненной с высотой слоя смолы 6 см и 20 см. Снижение связывающей способности имело линейную тенденцию со средним наклоном <5 % на 100 прогонов, демонстрируя лишь небольшое старение смолы даже после 100 прогонов. Результаты показывают, что аффинная смола POROS® CaptureSelect FcXP® пригодна для использования в установке для хроматографии SMB в условиях, описанных в примерах 2 и 3.

25 **Пример 6: Стабильность плазмы и ее фракций**

Оценивали стабильность CRP и CPP для использования в способе, описанном в настоящей заявке. CRP и CPP замораживали и размораживали до двух раз и/или фильтровали с использованием фильтра 0,22 мкм. Обработанные CRP и CPP хранили при 10°C, 18°C, или 28°C в течение 24 или 48 ч. Содержание IgG, а также распределение подклассов IgG в образцах определяли методом иммунонефелометрии. Результаты таблиц 5 и 6 показывают, что на содержание

IgG и распределение подклассов IgG CRP и CPP не оказывали влияние фильтрация, температура, время и замораживание/оттаивание.

Таблица 5: Содержание IgG CRP с фильтрацией и без нее, замораживанием/оттаиванием и хранением в установленное время и при заданных температурах.

5

Образец	Абсолютные значения IgG (г/л)	Распределение подклассов			
		IgG1 %	IgG2 %	IgG3 %	IgG4 %
Плазма свежая перед фильтрацией	5.48	54	32	3	11
Плазма свежая после фильтрации	5.54	54	32	3	10
Плазма 24 ч. 10°C	5.47	54	32	3	10
Плазма 24 ч. 18°C	5.38	54	32	3	11
Плазма 24 ч. 28°C	5.5	54	32	3	11
Плазма 48 ч. 10°C	5.35	54	32	3	11
Плазма 48 ч. 18°C	5.47	54	32	3	11
Плазма 48 ч. 28°C	5.59	54	32	3	10
Замораживание/оттаивание плазмы 1х	5.53	53	33	3	11
Замораживание/оттаивание плазмы 2х	5.58	54	33	3	10

Таблица 6: Содержание IgG CPP с фильтрацией и без нее, замораживанием/оттаиванием и хранением в установленное время и при заданных температурах.

Образец	Абсолютные значения IgG (г/л)	Распределение подклассов			
		IgG1 %	IgG2 %	IgG3 %	IgG4 %
CPP свежая перед фильтрацией	6.42	65	25	4	6
CPP свежая после фильтрации	6.5	65	25	4	6
CPP 24 ч. 10°C	6.51	65	26	3	6
CPP 24 ч. 18°C	6.64	65	26	3	6
CPP 24 ч. 28°C	6.58	65	25	4	6
CPP 48 ч. 10°C	6.46	65	25	4	6
CPP 48 ч. 18°C	6.46	66	25	4	6
CPP 48 ч. 28°C	6.52	66	25	3	6
Замораживание/оттаивание	6.53	66	25	4	6

Образец	Абсолютные значения	Распределение подклассов			
	IgG	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
	(г/л)	%	%	%	%
СРР 1х					
Замораживание/оттаивание СРР 2х	6.59	65	25	4	6

Для определения свертывания белков в плазме и СРР определяли прокоагулянтную активность с использованием анализа неактивированного частичного тромбoplastинового времени (NaPTT). Время коагуляции было установлено на уровне > 150 с в анализе NaPTT. Прокоагулянтную активность наблюдали в плазме и СРР при 28 °С в течение 24 или 48 часов (Фигура 5). Никакой прокоагулянтной активности не наблюдали в плазме и СРР, отфильтрованных, замороженных/размороженных или при температуре 10 °С или 18 °С в течение 24 или 48 часов.

Для определения протеолитической активности в плазме и СРР активность тромбина, общих сериновых протеаз, калликреина, пламина и FXa определяли с использованием анализов хромогенного субстрата (тромбин: S-2238; общие сериновые протеазы: S-2288; калликреин: S-2302; пламин: S-2251; и FXa: S-2765). Протеолитическую активность наблюдали в плазме и СРР при 28 °С в течение 24 или 48 часов (Фигура 6). Никакой протеолитической активности не наблюдали в плазме и СРР, отфильтрованных, замороженных/размороженных или при температуре 10 °С или 18 °С в течение 24 или 48 часов.

Стабильность CRP и СРР также оценивали путем определения изменений размера частиц в образце, как было определено с помощью визуализации микропотоков (MFI) и динамического светорассеяния (DLS), и а также рассчитывали индекс полидисперсности образцов. В таблицах 8 и 9 показано, что образцы имели широкую полидисперсность (>0,4). В таблицах 7 и 8 показано, что не было разницы в индексе полидисперсности образцов при 10 °С и 18 °С через 4 часа или 24 часа, но было явное увеличение через 48 часов. Индекс склонности плазмы существенно не отличался в зависимости от температуры и времени, что позволяет предположить, что образцы плазмы более стабильны во времени и температуре по сравнению с СРР.

Таблица 7: Анализ частиц СРР с фильтрацией и без фильтрации и хранением в заданное время и при заданных температурах.

Образец	Время (ч.)	Температура (°C)	Индекс полидисперсности
СРР перед фильтрацией	0		0.8022
СРР после фильтрации	0		0.5168
СРР	4	10	0.506
СРР	4	18	0.5216
СРР	4	28	0.5673
СРР	24	10	0.5268
СРР	24	18	0.5391
СРР	24	28	0.7055
СРР	48	10	0.8131
СРР	48	18	0.8005
СРР	48	28	0.667

Таблица 7: Анализ частиц СРР с фильтрацией и без фильтрации и хранением в заданное время и при заданных температурах.

5

Образец	Время (ч.)	Температура (°C)	Индекс полидисперсности
Плазма перед фильтрацией	0		0.5271
Плазма после фильтрации	0		0.5399
Плазма	4	10	0.4952
Плазма	4	18	0.5407
Плазма	4	28	0.4904
Плазма	24	10	0.5088
Плазма	24	18	0.548
Плазма	24	28	0.6498
Плазма	48	10	0.4935
Плазма	48	18	0.5778
Плазма	48	28	0.5153

Результаты показывают, что образование частиц происходит внутри CRP и CPP при хранении при более высоких температурах и в течение более длительных периодов времени. Подходящая температура для хранения плазмы или ее фракций может составлять от 10 °C до 18 °C в течение до 48 часов.

5 **Пример 7: Оценка инактивации вирусов с использованием *n*-октил- β -D-глюкопиранозида**

10 N-Октил- β -D-глюкопиранозид (OG) оценивали для определения его способности снижать содержание вирусов в CRP перед очисткой IgG. В размороженную и гомогенизированную CRP (50 мг/мл) и среду EMEM (контроль) добавляли вирус везикулярного стоматита (VSV) в разведении 1:20. Аликвоты среды VSV с добавлением CRP и среды EMEM с добавлением VSV перед добавлением OG собирали. OG добавляли к среде EMEM с добавлением VSV CRP и с добавлением VSV, так, чтобы конечная концентрация OG в смеси составляла 30 мМ, и перемешивали пипетированием в течение приблизительно 15 10 секунд. Смесь вместе со средой EDEM с добавлением VSV и плазмой, загрязненной VSV, без OG, инкубировали при 5 °C. Инкубированные образцы собирали через 15, 30 и 60 минут. Образцы разводили в 10-кратной среде для нейтрализации активности OG.

20 Аликвоты по 100 мкл обработанной OG CRP с добавлением VSV, обработанной OG среды EDEM с добавлением VSV, CRP с добавлением VSV, среды EDEM с добавлением VSV и контроля титровали (десятикратные серийные разведения до разведения 10^{-6}) на 150 мкл предварительно культивированной суспензии клеток почек африканской зеленой обезьяны (Vero-PH) в стандартных 96-луночных микропланшетах (Nunc, лунки с плоским дном). 25 В качестве отрицательных контролей использовали среду CRP и EDEM. В качестве положительного контроля использовали исходный вирус VSV, используемый для добавления, и контрольный исходный вирус с приемлемыми титрами VSV, достигнутыми на основе предыдущих результатов характеристики от исходного вируса VSV.

30 Планшеты инкубировали при 37 °C, 3-5 % CO₂ и исследовали на вирусспецифический цитопатогенный эффект (CPE) с помощью микроскопии в течение 7 дней. Клеточные культуры, титрованные отрицательным контролем, не должны были содержать CPE.

Титры инфекционности рассчитывали по методу Спирмана-Кербера и выражали как \log_{10} CCID50/мл (50 % инфекционная доза культуры клеток на мл). Если инфекционный вирус не был обнаружен с помощью микротитрования, например, начиная с разведения 1:10 титр вируса задается как $<1,5 \log_{10}$ CCID50/мл. Чтобы снизить предел обнаружения, 1 мл разведенных в соотношении 1:10 обработанных впоследствии клеток Vero-PH инокулировали в 4 колбы T25. Когда все 4 культуры T25 остаются отрицательными на инфекционный вирус, полученные титры инфекционности регистрируют как $<0,5 \log_{10}$ CCID50/мл.

Устойчивое снижение VSV наблюдали там, где конечная концентрация OG 30 мМ присутствовала в CRP, обработанной посредством OG с добавлением VSV, инкубированной при 5 °С. Коэффициент снижения \log_{10} (LRF) в этих условиях (т.е. конечная концентрация 30 мМ OG при 5 °С) составлял $\geq 5,3$ (Фигура 7). LRF представляет собой соотношение вирусной загрузки в предварительно обработанном исходном материале (например, CRP) и вирусной загрузки в обработанном впоследствии конечном материале (например, CRP, обработанной посредством OG) и учитывает как объем образца, так и титры вируса до и после обработки.

Пример 8: Оптимизация размораживания плазмы

Для оценки оптимальной температуры размораживания плазмы определяли температуру, при которой наблюдали криопреципитаты. Вкратце, криообогащенную плазму (CRP) после оттаивания постепенно нагревали от 15 °С до 38 °С, а при 20 °С, 25 °С, 28 °С, 30 °С, 32 °С и 37 °С фракцию CRP центрифугировали и взвешивали сгустки, зависящие от температуры. При ~ 30 °С, присутствовали только неспецифические агрегаты, а криопреципитат отсутствовал.

Для определения оптимальной температуры в каждом сгустке определяли активность фактора фон Виллебранда (vWF) – одного из основных компонентов криопреципитата. Как показано на Фигуре 8А и в Таблице 8, оттаивание при 32 °С приводит к устойчивому образованию сгустков и активности фактора Виллебранда в супернатанте.

Таблица 8: Анализ активности фактора Виллебранда в сгустках CRP при различных температурах

Образец (температура)	СВА:vWF
------------------------------	----------------

	(МО/мл)
Плазма фактора Виллебранда	0.080
SHPL	1.100
+2°C	<0.11
+20°C	1.098
+20-+37 °C	1.070
+25°C	1.370
+28°C	1.455
+30°C	1.338
+32°C	1.218
+37°C	1.385
+37-+60 °C (отрицательный контроль)	0.290

5 Для дальнейшего подтверждения размораживания плазмы при 32 °C было проведено исследование времени выдержки, как показано на Фигуре 8В и протеолитическая активность была определена с использованием анализа NaPTT в полученном элюате.

Как показано в Таблице 9, протеолитическую активность не наблюдали в течение 48 часов, когда элюат фильтровали при 32 °C.

Таблица 9: Протеолитическая активность после размораживания CRP при 32 °C по сравнению с 14 °C

Образец	NaPTT (Время свертывания крови (секунды))			
	Не разбавленный	Разбавленный 1:3	Разбавленный 1:10	Разбавленный 1:100
CRP при 0,5 °C	>380	288	282	286
CRP, размороженная при 37°C, до фильтрации	>380	318	298	296
CRP, размороженная при 37°C, после фильтрации	>380	35	295	297
CRP, размороженная при 32°C, до фильтрации	>380	327	305	309
CRP 14°C фильтрат t=0	>380	309	301	317
CRP 32°C фильтрат t=0	>380	353	330	331
CRP 32°C фильтрат - >21°C выдержка t=0	>380	369	351	350

Образец	NaPTT (Время свертывания крови (секунды))			
	Не разбавленный	Разбавленный 1:3	Разбавленный 1:10	Разбавленный 1:100
CRP 14°C фильтрат t=24	>380	276	266	267
CRP 32°C фильтрат t=24	>380	276	264	264
CRP 32°C фильтрат - >21°C выдержка t=24	>380	270	261	272
CRP 14°C фильтрат t=48	>380	338	292	285
CRP 32°C фильтрат t=48	>380	255	264	296
CRP 32°C фильтрат - >21°C выдержка t=48	>380	307	293	302

Образцы также анализировали на содержание твердых частиц с использованием динамического светорассеяния. Никакой разницы в индексе полидисперсности (PDI) не наблюдали между образцами с PDI<0,6 во всех образцах (данные не показаны).

Также оценивали мутность с течением времени и наблюдали видимую деградацию при всех температурах (т.е. 14 °C, 21 °C и 32 °C) через 48 часов. Через 24 часа не наблюдали видимой деградации при 14°C, по сравнению с большей частью при 32 °C. Для плазмы, хранившейся при температуре 32 °C, отчетливое увеличение давления цикл за циклом во время хроматографии также наблюдали через 48 часов по сравнению с 14 °C (данные не показаны).

Несмотря на видимую деградацию, влияния на содержание IgG не наблюдали. В частности, не наблюдали снижения содержания IgG с течением времени, когда образцы размораживали и хранили при более высоких температурах.

Пример 9: Оптимизация метода непрерывной аффинной хроматографии

Удаление стрип-фазы

Во время процесса SMB наблюдали увеличение противодавления отдельных колонок из-за денатурации накопленных белков на колонке в жестких условиях (т.е., pH 2,5) во время стрип-фазы. Соответственно, чтобы выяснить,

снижает ли удаление стрип-фазы увеличение противодавления, процесс SMB проводили без стрип-фазы.

Как показано на **Фигуре 9**, удаление стрип-фазы привело к уменьшению увеличения противодавления и стабилизации давления во время процесса SMB.

5 *Увеличение проводимости фазы промывки*

Проводимость фазы промывки проверяли, чтобы выяснить, можно ли снизить активность протеазы в элюате.

10 Как показано на **Фигуре 10**, увеличение концентрации хлорида натрия в промывочном буфере со 145 мМ до 500 мМ снижало активность протеазы в элюате ниже предела обнаружения. Увеличение проводимости промывочного буфера увеличивало элюирование дополнительных белков (например, компонентов системы комплемента), однако при использовании промывочного буфера с более высокой проводимостью не наблюдали никакого влияния на выход IgG и/или общую чистоту продукта (**Фигура 11**). Уровни чистоты были сопоставимы с коммерчески доступным Privigen по данным анализа Labchip и нефелометрии (**Фигуры 11В и 11С**).

Пример 10: Стадия анионообменной заключительной очистки

20 Оценивали использование анионообменной смолы POROSTM-HQ 50 в качестве стадии заключительной очистки. Смолу использовали в проточном режиме.

Первоначально смолу проверяли с использованием MES и фосфатных буферов на предмет влияния на истощение примесей.

25 Элюат FcXP подвергали УФ/ДФ в 10 мМ MES или фосфатном буфере с рН 6,0, 0 мМ NaCl перед загрузкой на колонку для анионообменной хроматографии. Проточные и постпромывные жидкости собирали и анализировали отдельно.

Как показано в **Таблице 10**, буфер MES и фосфатный буфер привели к приемлемому выходу IgG и приемлемому истощению примесей.

Фосфатный буфер при рН 6,0 (низкая проводимость) обеспечил наилучшие результаты с точки зрения разработки целей истощения примесей.

Таблица 10: Буферный скрининг

Буфер	pH в конце уравнивания перед загрузкой	pH	NaCl (мМ)	Выход в % IgG (Neph)		Коэффициент истощения (исключая PW)			Коэффициент истощения (с PW)		
				Без последующей промывки	С последующей промывкой	IgA (Neph)	IgM (Neph)	Альбумин (Neph)	IgA (цель 108)	IgM (цель 1153)	Альбумин (цель 541)
MES	5.2	6.0	20	86,9	93.4	273	805	117	228	305	90
MES	6.2	6.0	50	87,8	95.2	66	>1498	39	53	>1076	32
MES	6.7	6.6	25	82.1	88,5	360	518	321	252	225	200
MES	6.7	6.6	50	83.8	90.1	84	>1726	66	66	>1208	52
Фосфат	3	6.0	0	78.0		147	>1476	88			
Фосфат	4.6	6.0	50	84.1		40	1120	2			
Фосфат	6.56	6.6	50	75.5		77	498	2			

Пример 11: Исследование оптимизации анионообменной заключительной стадии уравнивающего и загрузочного буфера и исследование планирования экспериментов (DoE)

Исследование оценки буфера

Оцениваемые буферы и условия:

Ионное состояние буферного противоиона	Буферы	Условия
Анионный	Цитрат натрия	pH 6,0, 0 и 50 mM NaCl pH 6,6, 0 и 50 mM NaCl
Анионный	MES	pH 6,0, 0 mM NaCl pH 6,6, 0 mM NaCl
Анионный	Дигидрофосфат натрия	pH 6,6, 0 mM NaCl
Катионный	Бис-Трис	pH 6,0, 0 и 50 mM NaCl pH 6,6, 0 и 50 mM NaCl
Катионный	L-Гистидин	pH 6,0, 0 и 50 mM NaCl pH 6,6, 0 и 50 mM NaCl

Образцы загружали согласно Примеру 10, приведенному выше. Вкратце, элюат FcXP повторно забуферивали и загружали в RogosTM HQ50. Проточные и послепромывочные жидкости собирали и анализировали отдельно.

Цитратный буфер хорошо истощал IgA в широком диапазоне как NaCl, так и pH. Приемлемое истощение IgA было достигнуто в фосфате при низком уровне соли.

Фосфатный буфер хорошо истощал IgM в широком диапазоне как NaCl, так и pH.

Бис-Трис и гистидин хорошо истощали альбумин в широком диапазоне как NaCl, так и pH. Хорошее истощение альбумина по фосфатам при низком уровне соли.

Планирование экспериментов с фосфатным буфером

Оценивали следующие условия:

Фаза	Длина фазы (ОК)	Состав
Уравнивание	15	10 mM NaH ₂ PO ₄ + x mM NaCl, pH y
Загрузка		5-15 г/л IgG, различная загрузка
Последующая промывка	3	10 mM NaH ₂ PO ₄ + x mM NaCl, pH y

Реген. - высокое содержание соли	5	1 М NaCl, 10 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 6,2
Реген. – NaOH	5	0.5 М NaOH
Реген. – HAc	5	1 М HAc
Реген. – NaCl, pH 6,2	5	1 М NaCl, 100 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 6,2

х: 0-40 мМ

у: pH 5,8-6,6

Предварительные рекомендации по уравниванию и загрузке включают в себя 0 мМ NaCl и pH 6,2, при этом загружаемый материал в пилотном режиме имеет чистоту ~93,5 % и концентрацию примесей 40,4-71,6 мг/г IgG. В эксперименте BioSMB загружаемый материал имел чистоту ~97 %, концентрацию примесей/IgG 12,0-20,4 мг/г IgG и концентрацию 5-15 г/л IgG для наилучшего удаления примесей. Загрузка смолы составляла 25 - 42 мг примесей на мл смолы.

Предварительные рекомендации для условий после промывки включают 0 мМ NaCl и pH 6,0.

Пример 12: Заключительная стадия анионообменной очистки

MES и фосфатные буферы были дополнительно проверены на предмет влияния на удаление примесей на заключительной стадии анионообменной очистки POROSTM HQ 50. Процесс осуществляли, как описано в примере 10 выше с использованием MES буфера pH 6,0 с 20 мМ или 50 мМ NaCl, MES буфер с pH 6,6 с 25 мМ или 50 мМ NaCl и фосфатного буфера pH 6,2 с 0 мМ NaCl.

MES буфер и фосфатный буфер приводили к приемлемому выходу IgG и приемлемому истощению примесей в проточном режиме (без последующей промывки).

Буфер	pH	NaCl	IgM (мкг/г IgG)	IgA (мг/г IgG)	Альбумин (мг/г IgG)
MES	6.0	20 мМ	5.18	0.05	0.41
		50 мМ	≤ 2.73	0.22	1.26
	6.6	25 мМ	7,80	0.04	0.15
		50 мМ	≤ 2.32	0.17	0.74
Фосфат	6.2	0 мМ	≤ 3.07	0.07	0.43

Пример 13: Увеличение масштаба стадии хроматографии SMB FcXP

Установка из 4 колонок в режиме SMB с внутренним диаметром колонок 1 см была выполнена без стрип-фазы смолы и альтернативной фазы промывки при следующих условиях:

Фаза	Впуск	Длина фазы (ОК)	Скорость потока (см/ч.)	Время пребывания (мин.)
Загрузка продукта	Подача/загрузка (пул осветленной плазмы))	4	642	0.56
Промывка	Буфер 1	2.75	856	0.42
Предварительное элюирование	Буфер 2	0.6	856	0.42
Элюирование	Буфер 2	2.2	1286	0.28
Последующее элюирование	Буфер 1	0.7	1286	0.28
Уравновешивание	Буфер 1	3	1286	0.28

Буфер 1: 20 мМ NaH₂PO₄, 500 мМ NaCl, pH 7,4;

Буфер 2: 20 мМ уксусной кислоты, pH 4,0

После каждой партии все колонки регенерировали с использованием 20 % EtOH и 20 мМ NaOH и использовали для обработки следующей партии.

Выход IgG в элюате FcXP составил 98,3-99,1 %, с общим извлечением IgG во всех фракциях 99,4-100,3 %. Чистоту элюата FcXP также оценивали с помощью Labchip, при этом чистота продукта составляла 96,4-96,9 %.

В результате процесса очистки было получено 9,55-10,4 г/л IgG.

Примеси в элюате FcXP определяли, включая IgM (47,85-51,90 мг/л; 4,8-5,3 мг/г IgG), IgA (68,8-76,55 мг/л; 7-8 мг/г IgG) и альбумин (55,3-78,05 мг/л; 5,8-7,6 мг/г IgG).

Пример 14: Увеличенный в масштабе процесс с использованием криообогащенной плазмы

Объединенную криообогащенную плазму от 30 доноров размораживали и осветляли с помощью последовательных фильтров 1,2 мкм и 0,45 мкм+0,2 мкм перед использованием для последующей обработки.

Размороженную и отфильтрованную плазму очищали и обрабатывали согласно следующему процессу:

1. Хроматография FcXP SMB
2. Концентрация и обмен буфера посредством УФ/ДФ
3. Сдвиг pH и фильтрация
4. Анионообменная хроматография (с использованием POROSTM-HQ50)
5. Аффинная хроматография изоагглютининов
6. Инактивация вирусов
7. УФ/ДФ
8. Состав до 100 г/л IgG

Было проведено три отдельных эксперимента, при этом извлечение IgG на стадиях 1-6 составило 83-96 %, а общее извлечение благодаря способу - 81-94 %.

Процесс очистки привел к распределению подклассов IgG в конечном составленном нерасфасованном продукте 67-69 % IgG1, 24-27 % IgG2, 3-4 % IgG3 и 2-3 % IgG4.

Чистоту продукта после хроматографии изоагглютининов также оценивали с помощью Labchip, при этом чистота продукта составляла 97-98,5 %.

Проток POROS 50HQ и последующую промывку оценивали на наличие примесей, включая IgM (<1,86 - < 2,55 мкг/г IgG), IgA (0,109-0,111 мг/г IgG) и альбумин (0,59-0,74 мг/г IgG). Выход также был определен как 93-97 %.

Готовый нерасфасованный продукт также оценивали на наличие примесей, включая IgM (< 0,17 мг/л; < 1,74-<1,86 мкг/г IgG), IgA (8,46-8,76 мг/л; 0,089-0,093 мг/г IgG) и альбумин (62,75-67,60 мг/л; 0,64-0,74 мг/г IgG). Лиганд FcXP составлял <10 част. на млн. (ниже предела обнаружения).

Истощение изоагглютинина также оценивали после хроматографии FcXP SMB (титр Iso-A 1:16; титр Iso-B 1:32), после хроматографии POROS HQ50 (Iso-A титр 1:4; титр Iso-B 1:8) и после хроматографии изоагглютининов (титр Iso-A 1:0; титр Iso-B 1:0).

Последовательности

SEQ ID NO: 1 является аминокислотной последовательностью фрагмента VHH

QVQLQESGGGLVQAGDSLRLRISCRASGLTVNDLYMGWFRQAPGKEREFVGRVTP
GDNTDYTTYVDSVKGRFTISRDSAKNTVYLMNSLKLEDTAVYLCAGRRFGSS
EWDYWGQGTQVTVSS

SEQ ID NO: 2 является аминокислотной последовательностью CDR1
фрагмента VHH

GLTVNDLYMG

SEQ ID NO: 3 является аминокислотной последовательностью CDR2
фрагмента VHH

RVTPGDNTDYTTYVDSVK

SEQ ID NO: 4 является аминокислотной последовательностью CDR3
фрагмента VHH

RRFGSSEWDY

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ очистки иммуноглобулина G (IgG) из плазмы или ее фракции с использованием непрерывной аффинной хроматографии, включающий в себя связывание IgG со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG и сбор IgG.

2. Способ получения препарата, обогащенного иммуноглобулином G (IgG), из плазмы или ее фракции с использованием непрерывной аффинной хроматографии, причем способ включает в себя связывание IgG со смолой для аффинной хроматографии, содержащей лиганд, способный специфически связываться с доменом СНЗ человеческого IgG, и сбор IgG.

3. Способ по п. 1 или 2, где лиганд содержит фрагмент однодоменного [VНН] антитела верблюжьего происхождения.

4. Способ по одному из пп. 1 до 3, где смола содержит матрицу, выбранную из группы, включающей в себя сшитую поли(стирол-дивинилбензольную) матрицу и матрицу на основе агарозы.

5. Способ по одному из пп. 1 - 4, где лиганд содержит фрагмент антитела VНН, конъюгированный со сшитой поли(стирол-дивинилбензольной) матрицей.

6. Способ по одному из пп. 1 - 5, где способ дополнительно включает в себя промывку смолы промывочным буфером, имеющим рН от 5 до 10 и константу диссоциации (рКа) от 6,8 до 8,5 при 25 °С.

7. Способ по одному из пп. 1 - 6, где способ дополнительно включает в себя элюирование связанного IgG из смолы элюирующим буфером с рН от 3 до 5.

8. Способ по одному из пп. 1 - 7, где плазма или ее фракция контактирует со смолой в течение от 0,1 до 5 минут.

9. Способ по одному из пп. 1 - 8, где фракцию плазмы выбирают из группы, включающей в себя криобогащенную плазму, криобедненную плазму, супернатант I (SN I), фракцию Кона II (Fr II), фракцию Кона II+III (Fr II+III), фракцию Кона I+II+III (FrI+II+III), осадок Кистлера/Ничмана А (KN A), осадок Кистлера/Ничмана В (KN B), осадок супернатанта В Кистлера/Ничмана (KN B+1) и их комбинации.

10. Способ по одному из пп. 1 - 9, где плазму или ее фракцию размораживают при температуре по меньшей мере 32 °С.

11. Способ по одному из пп. 1 - 10, где плазма или ее фракция имеет температуру в диапазоне от 2 °С до 28 °С перед непрерывной аффинной хроматографией.

12. Способ по п. 11, где плазма или ее фракция имеет температуру 21 °С перед непрерывной аффинной хроматографией.

13. Способ по п. 11 или 12, где плазма или ее фракция находится при такой температуре в течение до 48 часов.

14. Способ по одному из пп. 1 до 13, где промывочный буфер содержит буферный агент, выбранный из группы, включающей в себя дигидрофосфат натрия, имидазол, Трис, глицилглицин, 3-морфолинопропан-1-сульфоновую кислоту (MOPS), пиперазин-N,N'-бис(2-этансульфоновую кислоту) (PIPES), 2-[(2-Гидрокси-1,1-бис(гидроксиметил)этил)амино]этансульфоновую кислоту (TES), бис[(2-гидроксиэтил)амино]уксусную кислоту (Бицин), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту (HEPES), сернистую кислоту, 4-(2-Гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновую кислоту (EPPS), N-(Гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-гидроксипропансульфоновую кислоту (HEPPSO), 4-(N-Морфолино)бутансульфоновую кислоту (MOBS), Пиперазин-N,N'-бис(2-гидроксипропансульфоновую кислоту) (POPSO), N-

[Трис(гидроксиметил)метил]-3-амино-2-гидроксипропансульфоновую кислоту (TAPSO), Трицин, тристаноламин (TEA) и их комбинации.

15. Способ по п. 14, где буферный агент находится в концентрации от 5 мМ до 200 мМ.

16. Способ по одному из пп. 1 - 15, где промывочный буфер дополнительно содержит хлорид натрия и/или двухвалентную соль в концентрации до 1000 мМ.

17. Способ по одному из пп. 1 - 16, где промывочный буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеет рН 7,4.

18. Способ по одному из пп. 1 - 17, где элюирующий буфер представляет собой или содержит фосфатный буфер и/или ацетатный буфер с рН от 3 до 5.

19. Способ по одному из пп. 1 - 18, где элюирующий буфер контактирует со смолой в течение до 5 минут.

20. Способ по одному из пп. 1 - 19, где способ дополнительно включает в себя уравнивание смолы уравнивающим буфером с рН от 7 до 8.

21. Способ по п. 20, где уравнивающий буфер содержит 20 мМ дигидрофосфата натрия, 500 мМ хлорида натрия и имеет рН 7,4.

22. Способ по п. 20 или 21, где смола уравновешена i) после стриппинга смолы или ii) без стриппинга смолы.

23. Способ по одному из пп. 1 - 22, где способ дополнительно включает в себя уравнивание смолы после стриппинга смолы уравнивающим буфером с рН от 7 до 8.

24. Способ по одному из пп. 1 - 23, где непрерывную аффинную хроматографию выбирают из группы, включающей в себя хроматографию с

псевдодвижущимся слоем (SMB), периодическую противоточную хроматографию (PCC), непрерывную противоточную тангенциальную хроматографию (CCTC) и непрерывную противоточную спиральную хроматографию (CCSC).

25. Способ по одному из пп. 1 - 24, где смола находится в виде суспензии, или смолу упаковывают в одну или несколько колонок, причем каждая колонка содержит одну или несколько зон.

26. Способ по п. 25, где зону выбирают из группы, включающей в себя зону уравнивания, зону связывания, зону промывки, зону элюирования или их комбинацию.

27. Способ по п. 25 или 26, где колонки соединены по текучей среде и разделены трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны.

28. Способ по одному из пп. 25 - 27, где смола упакована в ряд из трех колонок, причем каждая колонка представляет собой отдельную зону.

29. Способ по одному из пп. 1 - 28, где смола упакована в первую колонку и одну или несколько последующих колонок.

30. Способ по п. 29, где в первую колонку загружают IgG в концентрации выше емкости динамического связывания (ЕДС) смолы.

31. Способ по п. 30, где ЕДС смолы составляет по меньшей мере 5 мг IgG на мл смолы.

32. Способ по одному из пп. 29 - 31, где в одну или несколько последующих колонок загружают IgG в концентрации до ЕДС смолы.

33. Способ по одному из пп. 29 - 32, где в одну или несколько последующих колонок загружают IgG в концентрации до 40 мг IgG на мл смолы.

34. Способ по одному из пп. 1 до 33, где смола имеет общую высоту слоя от 2 см до 30 см.

35. Способ по одному из пп. 1 - 34, где способ дополнительно включает в себя регенерацию смолы.

36. Способ по одному из пп. 1 - 35, где способ дополнительно включает в себя дезинфекцию смолы.

37. Способ по одному из пп. 1 - 36, где способ дополнительно включает в себя одну или несколько стадий, выбранных из группы, включающей в себя осаждение этанолом, фракционирование октановой кислотой, ионообменную хроматографию, вирусную инактивацию, вирусную фильтрацию и ультрафильтрации/диафильтрацию.

38. Способ по п. 37, где стадия ионообменной хроматографии включает в себя анионообменной хроматографии с использованием сильной анионообменной смолы, работающей в проточном режиме.

39. Способ по п. 38, где сильная анионообменная смола содержит матрицу, состоящую из поли(стирол-дивинилбензольной) матрицы.

40. Способ по п. 38 или 39, где сильная анионообменная смола содержит кватернизованную функциональную группу полиэтиленimina.

41. Способ по п. 38 - 40, где стадия анионообменной хроматографии включает в себя промывочный буфер после загрузки, выбранный из группы, включающей в себя фосфатный буфер, натрий-цитратный буфер, буфер 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты, буфер уксусной кислоты, буфер бис-трис и L-гистидиновый буфер.

42. Способ по п. 41, где промывочный буфер после загрузки содержит фосфатный буфер с рН в диапазоне от 5,8 до 6,6.

43. Способ по п. 41 или 42, где промывочный буфер после загрузки дополнительно содержит хлорид натрия в концентрации от 0 мМ до 50 мМ.

44. Способ по одному из пп. 1 - 43, где из плазмы или ее фракции извлекается по меньшей мере 75 % IgG.

45. Способ по одному из пп. 1 - 44, где элюированный IgG имеет чистоту по меньшей мере 95 %.

46. Способ по одному из пп. 1 - 45, где способ дополнительно включает в себя включение IgG в фармацевтическую композицию.

47. Способ очистки иммуноглобулина G (IgG) из плазмы или ее фракции с использованием хроматографии с псевдодвижущимся слоем (SMB), способ включает в себя:

а) уравнивание смолы для аффинной хроматографии, содержащей матрицу из сшитого поли(стирол-дивинилбензола), и лиганд, способный специфически связываться с доменом СН3 человеческого IgG с 20 мМ фосфатным уравнивающим буфером, имеющим рН от 7 до 8;

б) связывание IgG из плазмы или ее фракции со смолой;

в) промывание смолы посредством 20 мМ фосфатного промывочного буфера, имеющего рН от 7 до 8; и

г) элюирование связанного IgG посредством 20 мМ ацетатного или фосфатного буфера, имеющего рН от 3 до 5;

при этом стадии а) - г) могут быть повторены на смоле для аффинной хроматографии и при этом смола для аффинной хроматографии упакована в ряд из двух или большего количества соединенных по текучей среде колонок, разделенных трубопроводами для текучей среды, содержащими впускной и выпускной клапаны, и при этом необязательно способ не включает в себя стриппинг смолы.

48. Фармацевтическая композиция, содержащая IgG, очищенный или полученный способом по одному из пп. 1 - 47.

49. Фармацевтическая композиция по п. 48, где фармацевтическая композиция содержит 100 мг/мл общего белка плазмы человека.

50. Фармацевтическая композиция по п. 48, где фармацевтическая композиция содержит 20 г/ 100 мл общего белка плазмы человека.

51. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 50, где фармацевтическая композиция имеет чистоту иммуноглобулина G (IgG) по меньшей мере 98 %.

52. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 51, где фармацевтическая композиция имеет номинальную осмоляльность 320 мОсм/кг.

53. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 52, где фармацевтическая композиция имеет рН от 4,6 до 5,0.

54. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 53, где фармацевтическая композиция имеет рН 4,8.

55. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 54, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит 250 ммоль/л L-пролина.

56. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 до 55, где содержание натрия в фармацевтической композиции составляет ≤ 1 ммоль/л.

57. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 56, где содержание IgA в фармацевтической композиции составляет $\leq 0,05$ мг/мл.

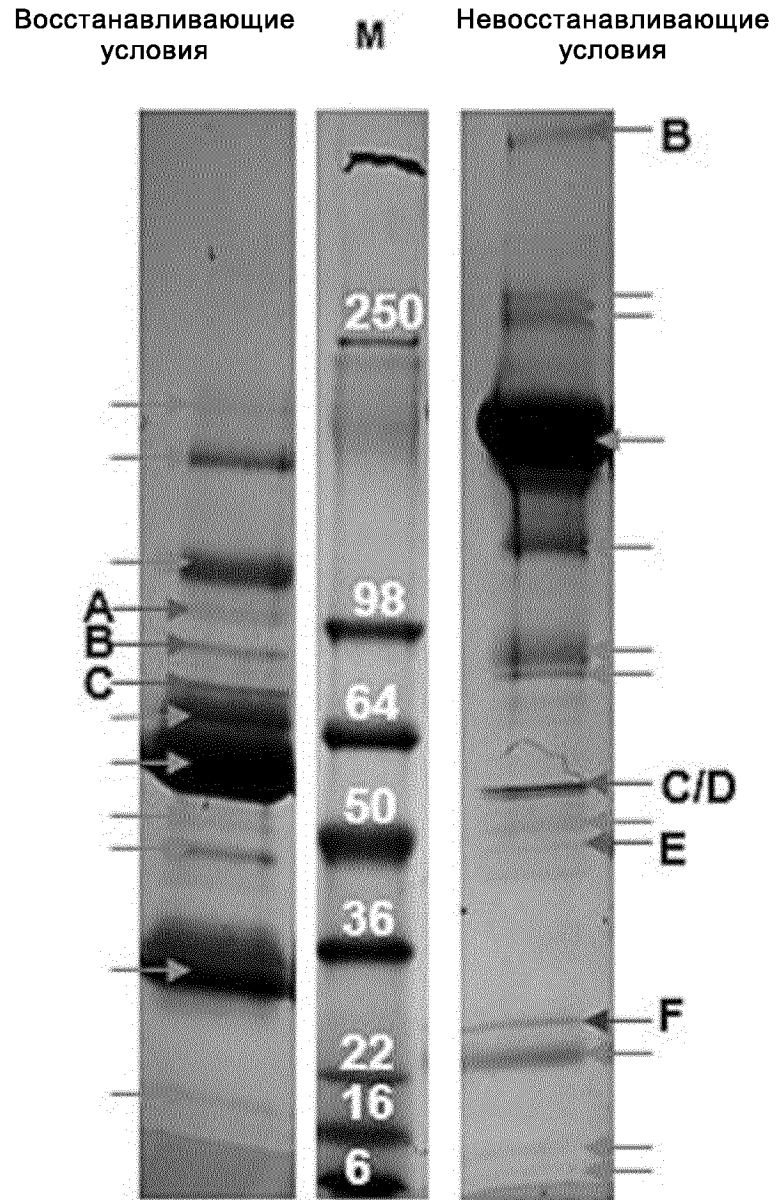
58. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 57, где уровень активатора прекалликреина (РКА) в фармацевтической композиции составляет ≤ 35 МО/мл.

59. Применение IgG, очищенного или полученного способом по одному из пп. 1 – 47, в изготовлении лекарственного средства для лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования заболевания у субъекта.

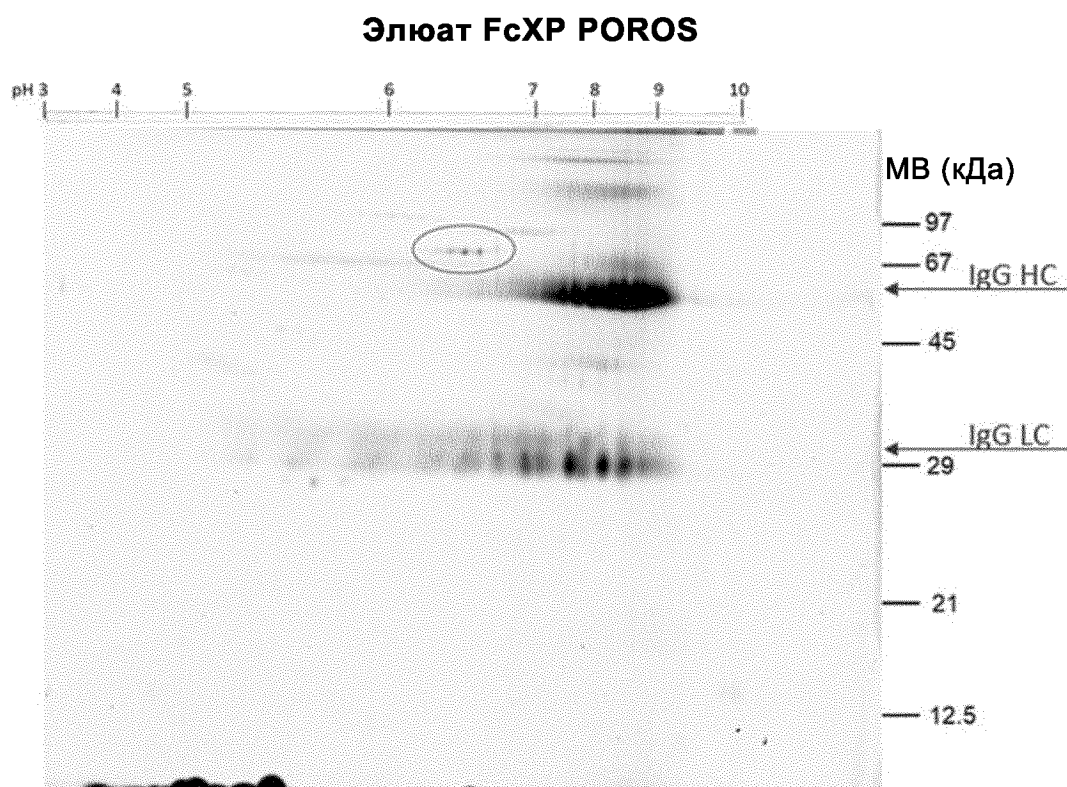
60. Фармацевтическая композиция по одному из пп. 48 - 58 для применения в лечении, предотвращении и/или замедлении прогрессирования заболевания у субъекта.

61. Способ лечения, предотвращения и/или замедления прогрессирования заболевания у субъекта, включающий в себя введение субъекту фармацевтической композиции по одному из пп. 48 - 58.

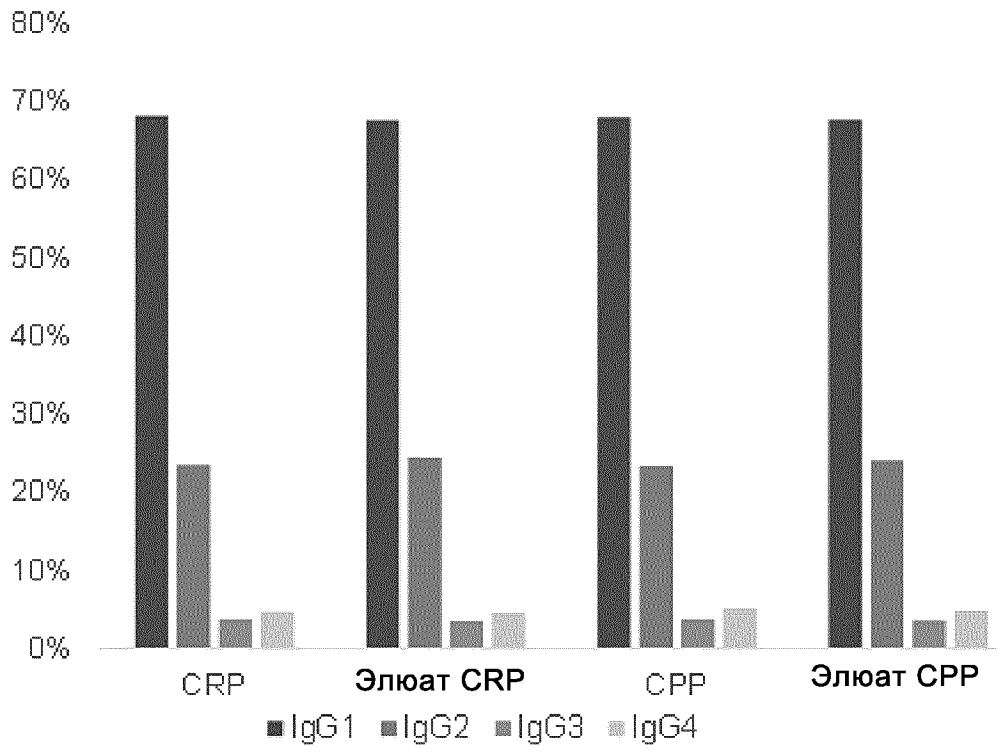
62. Применение по п. 59, или фармацевтическая композиция по п. 60, или способ по п. 61, где заболевание выбирают из группы, включающей в себя первичный иммунодефицит (ПИ), хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (ХВДП) и хроническую иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ХИТП).



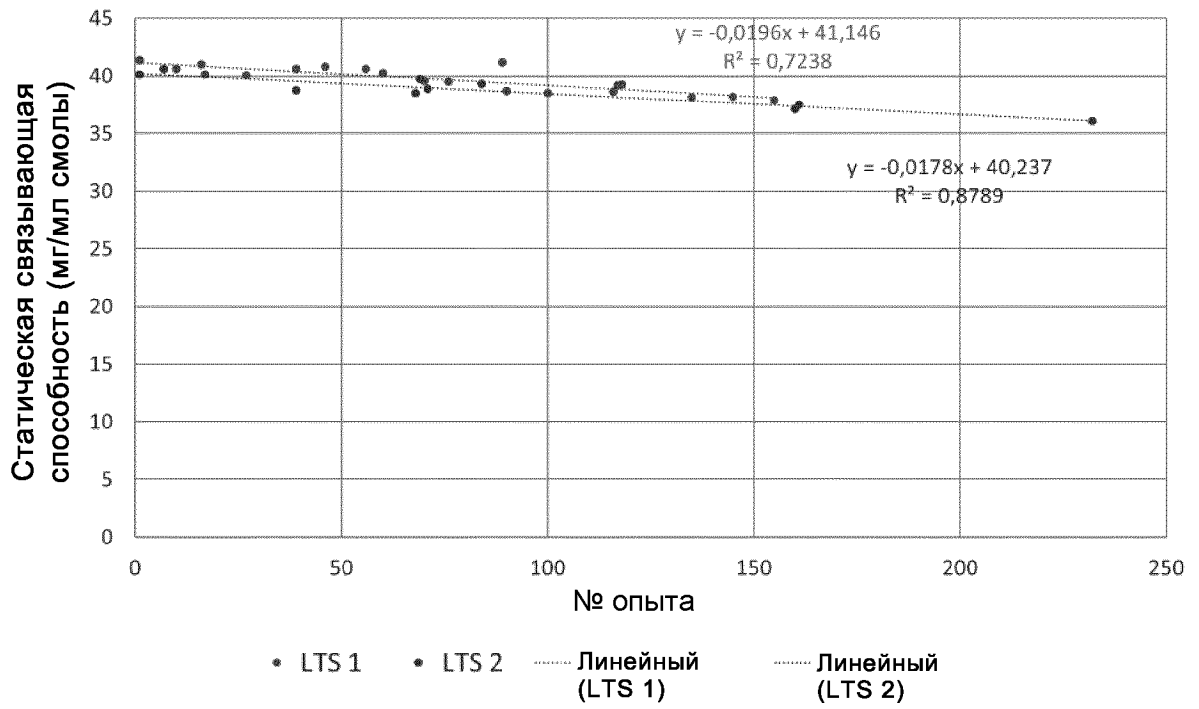
ФИГУРА 1



ФИГУРА 2

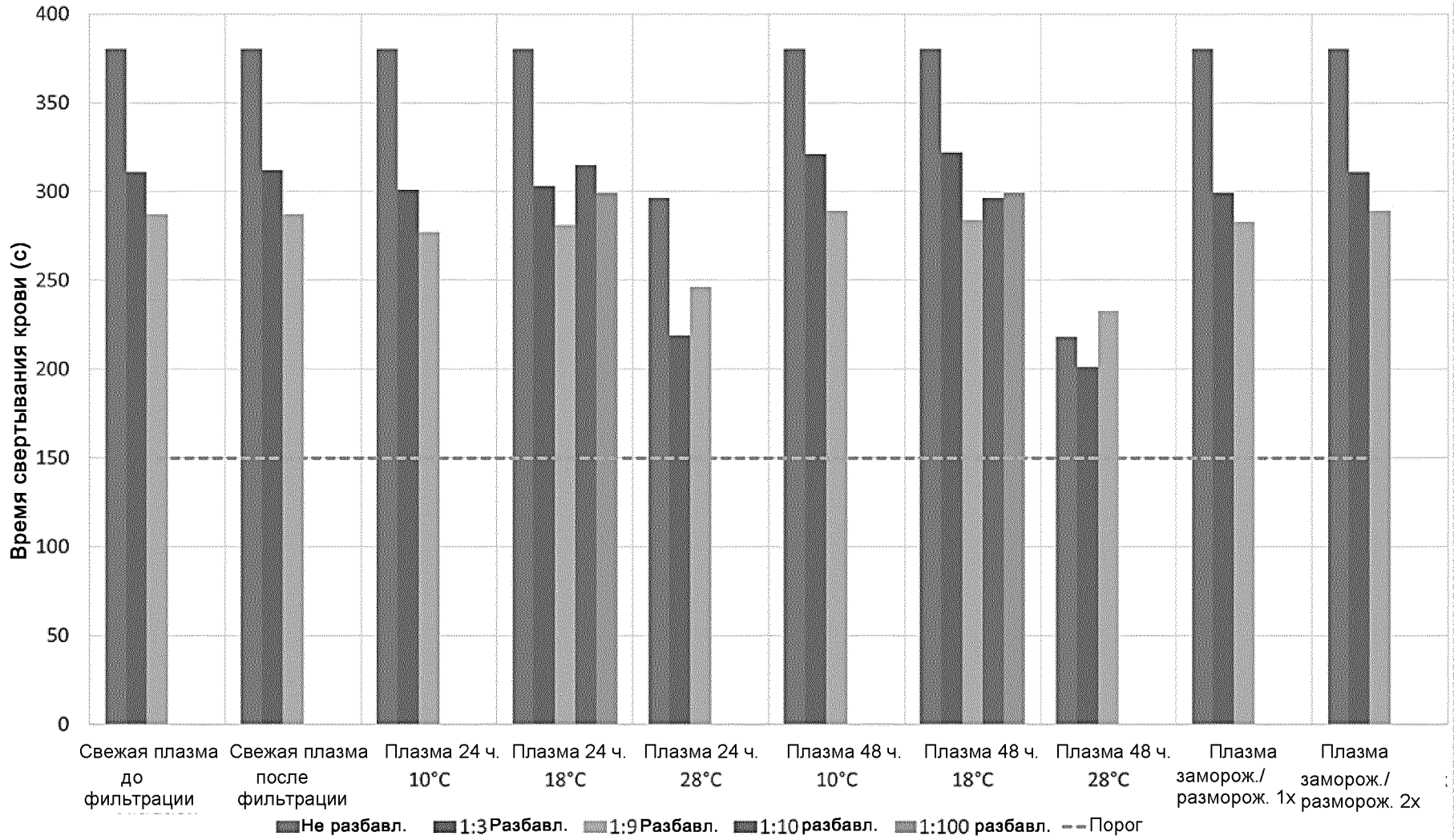


ФИГУРА 3

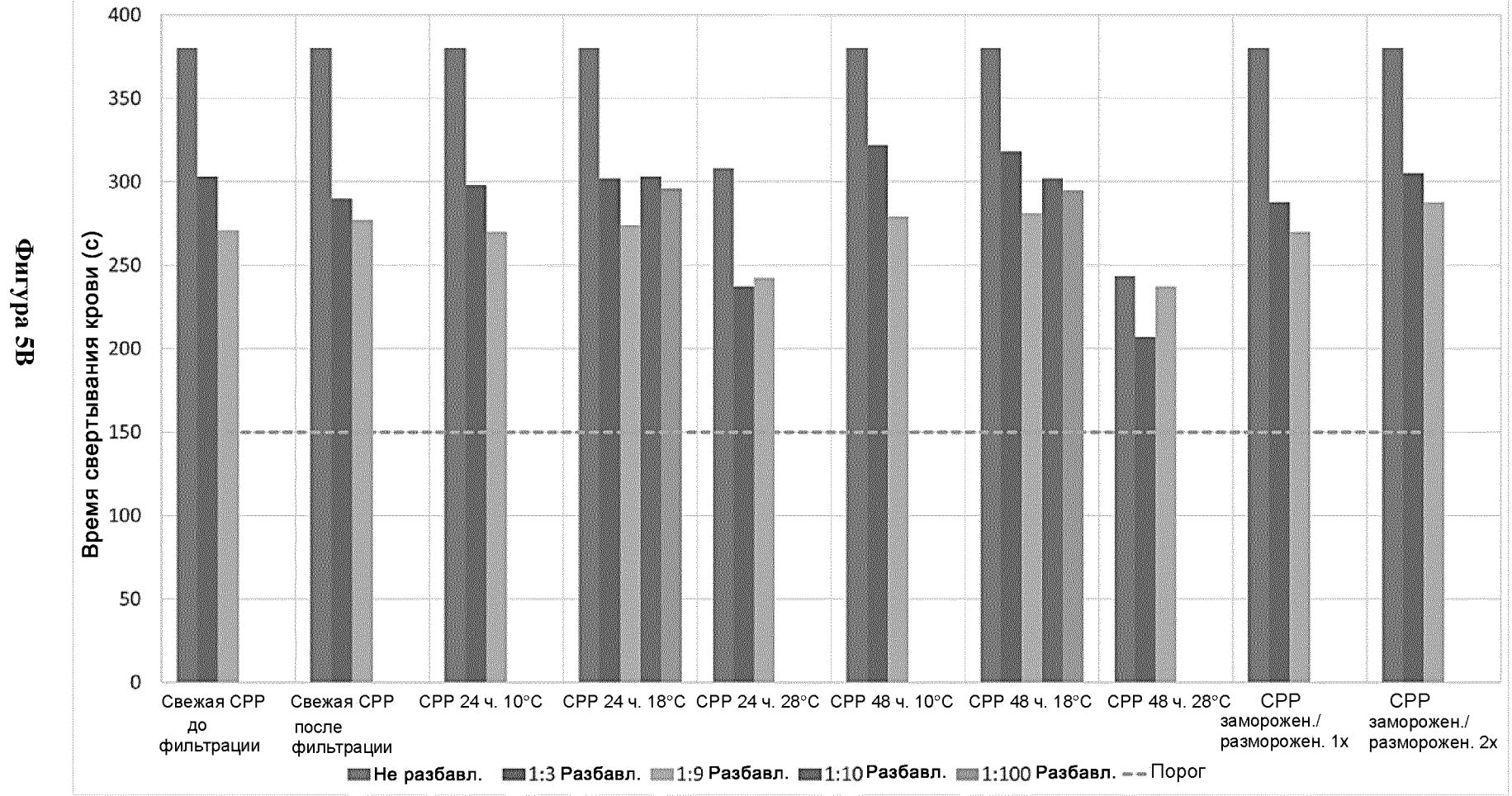


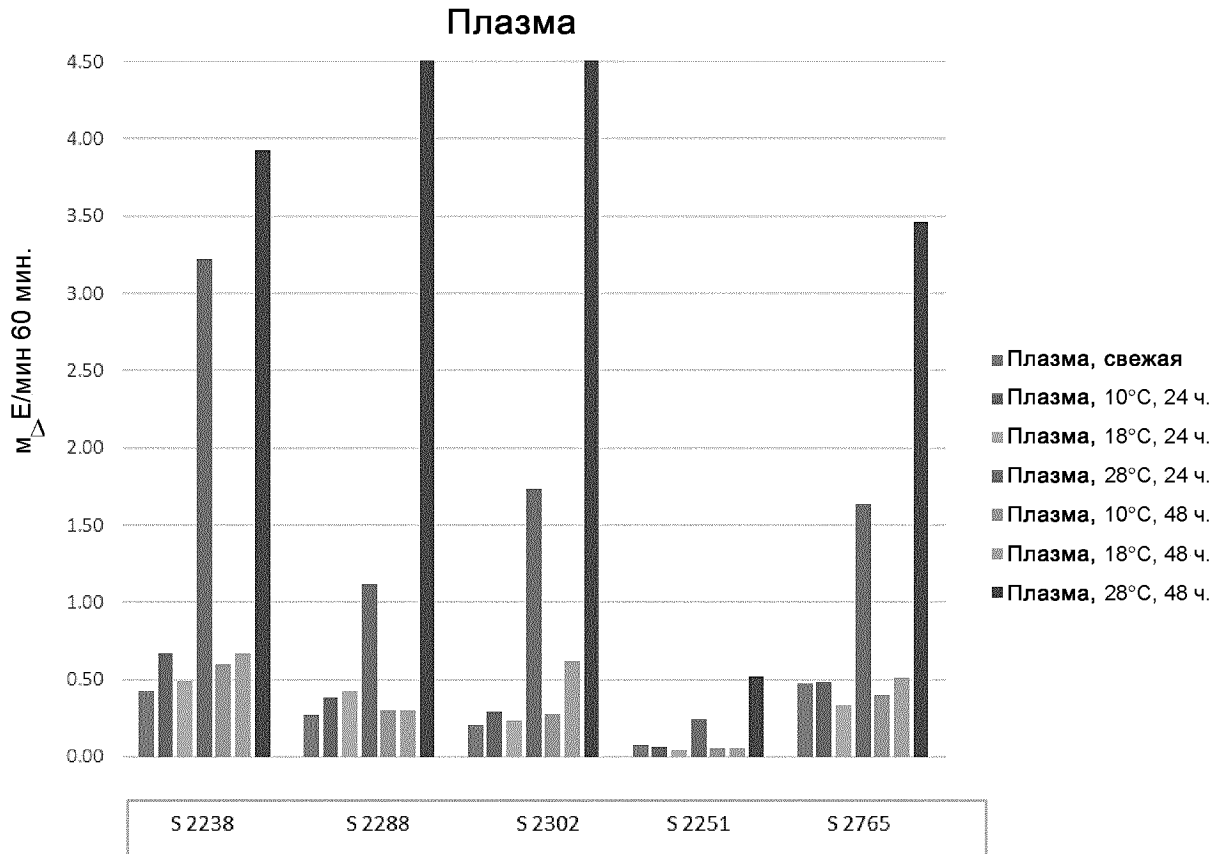
ФИГУРА 4

Плазма

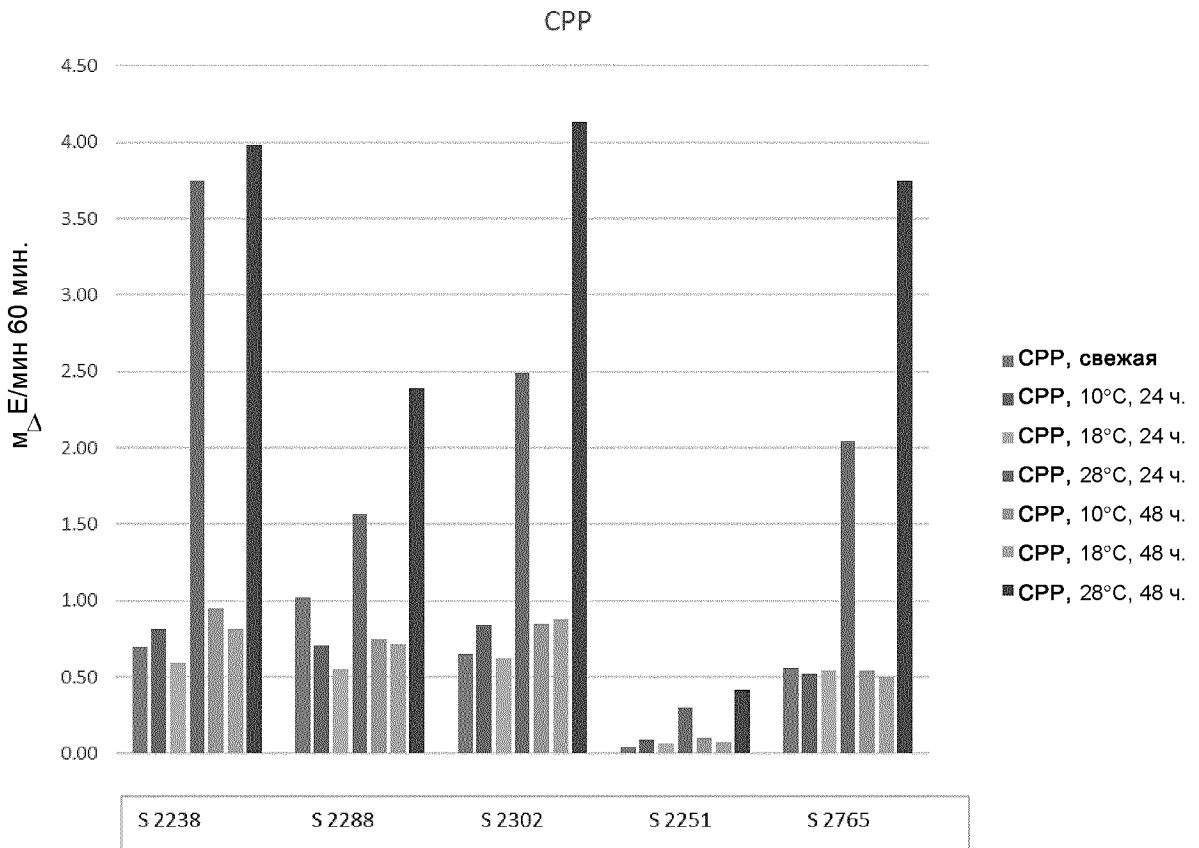


СРР

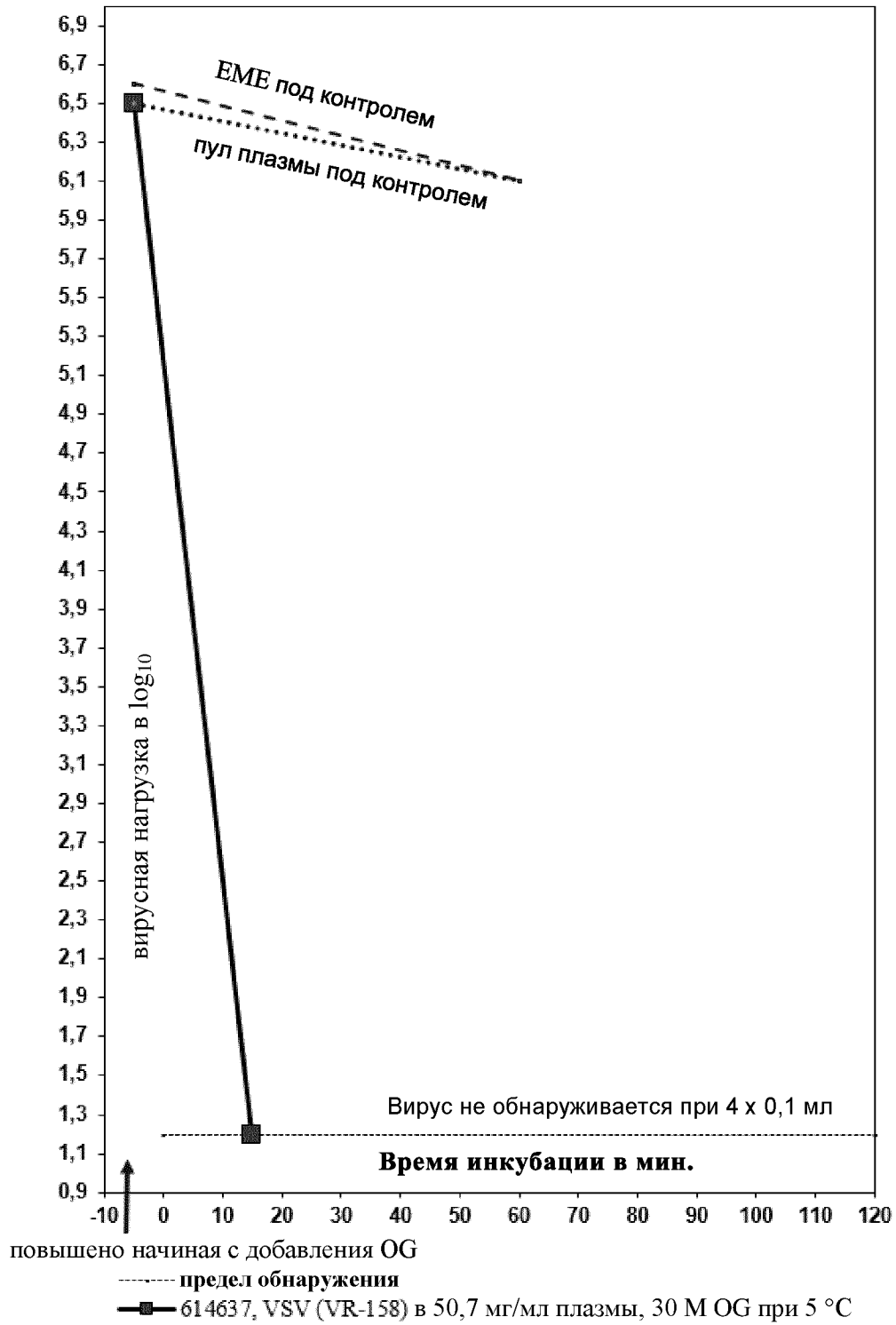




ФИГУРА 6А



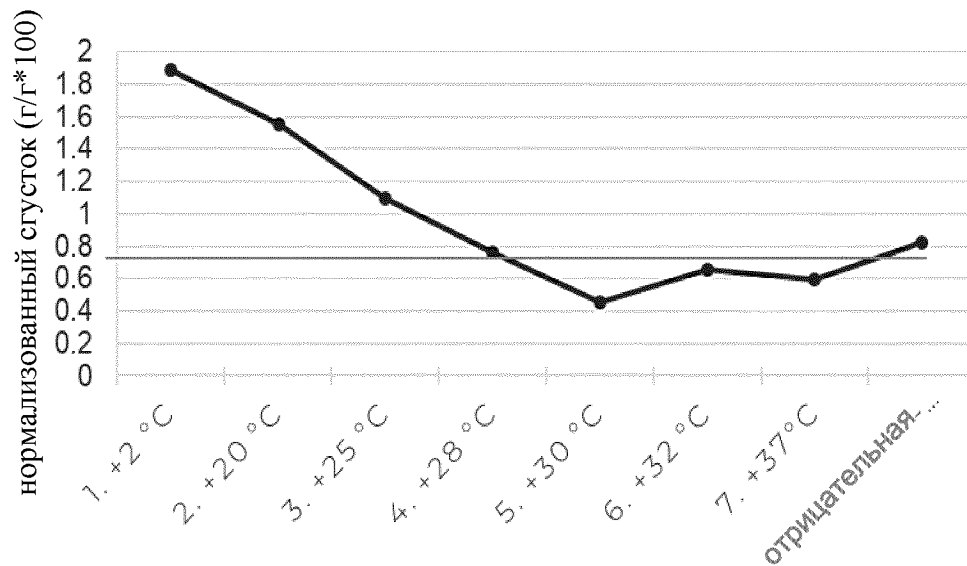
ФИГУРА 6В



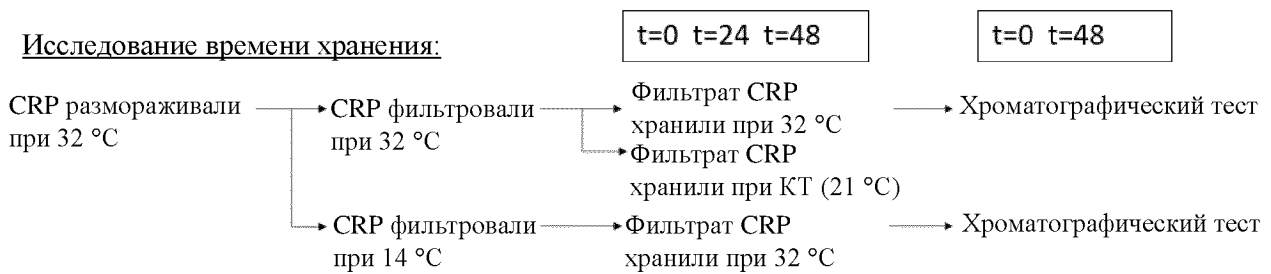
ФИГУРА 7

А

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ СГУСТКОВ CRP

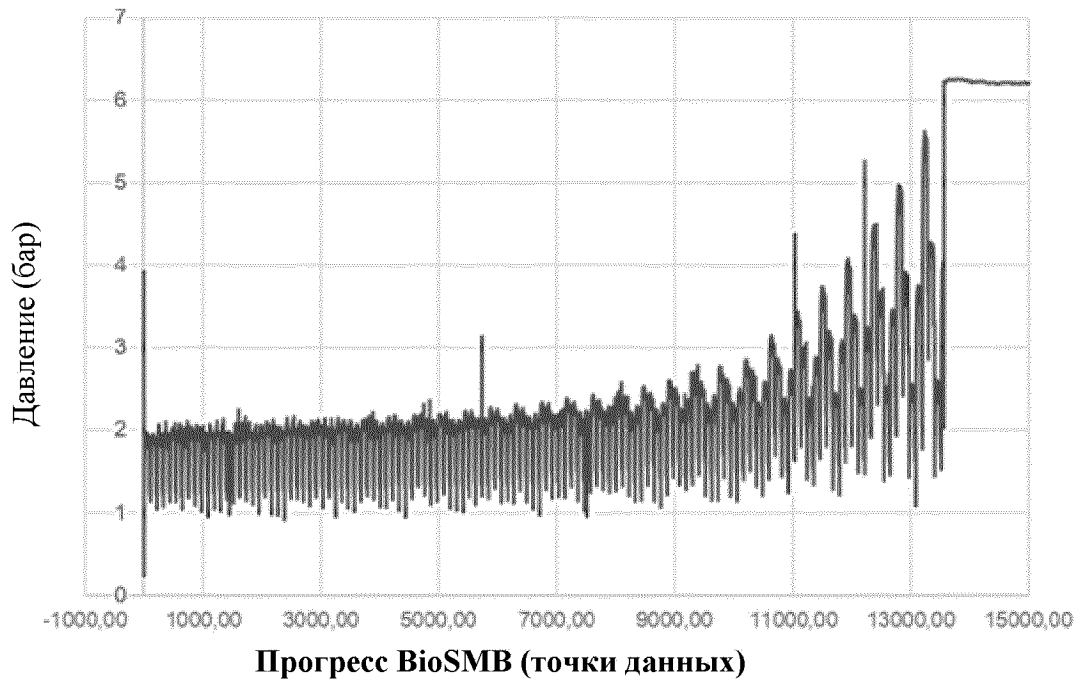


В

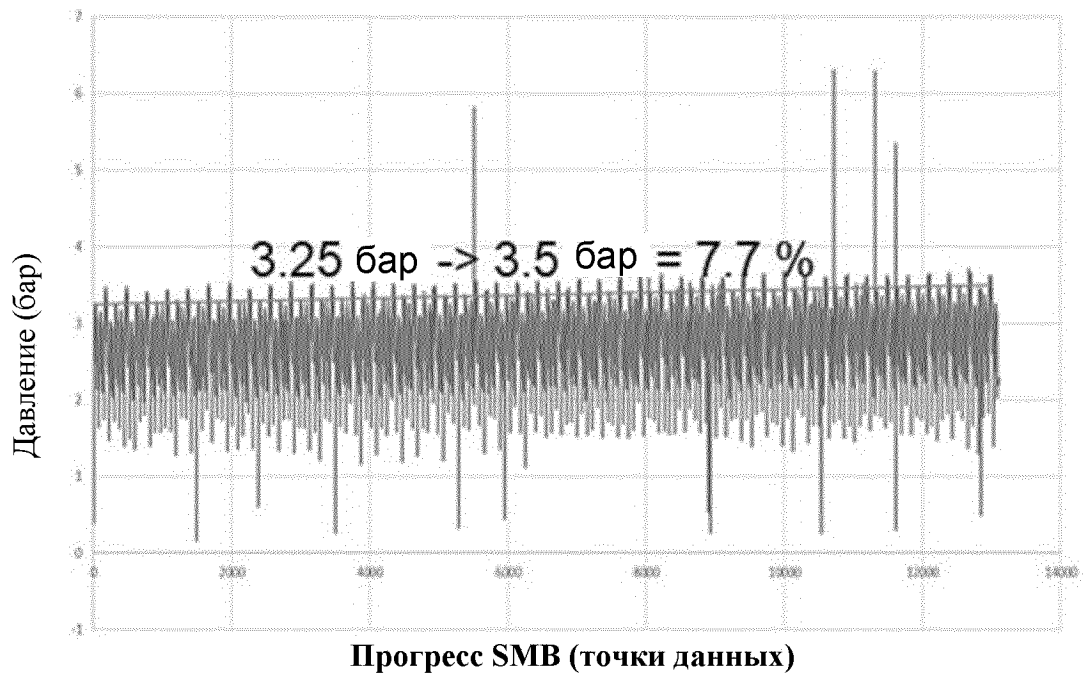
Исследование времени хранения:

ФИГУРА 8

А

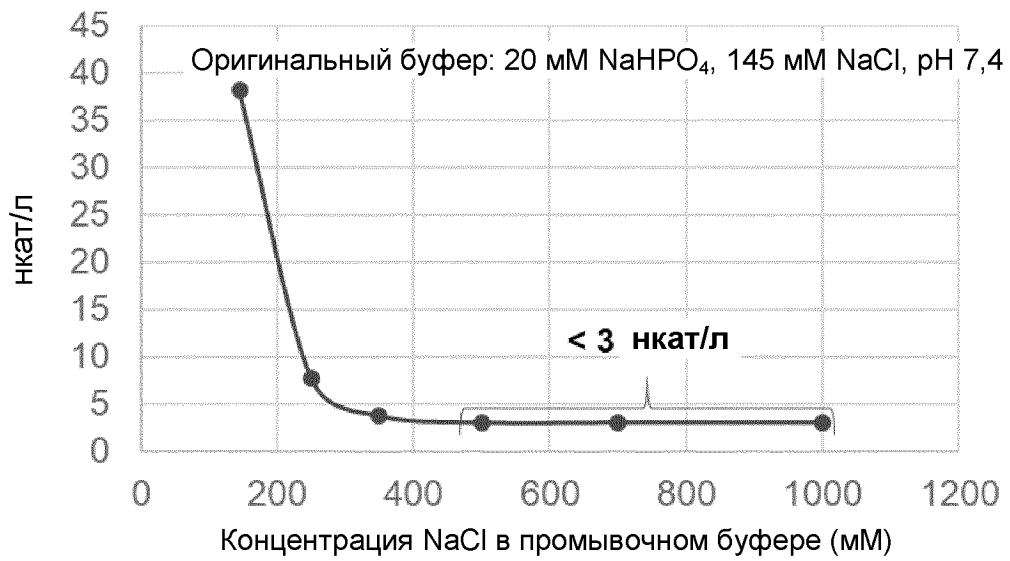


В

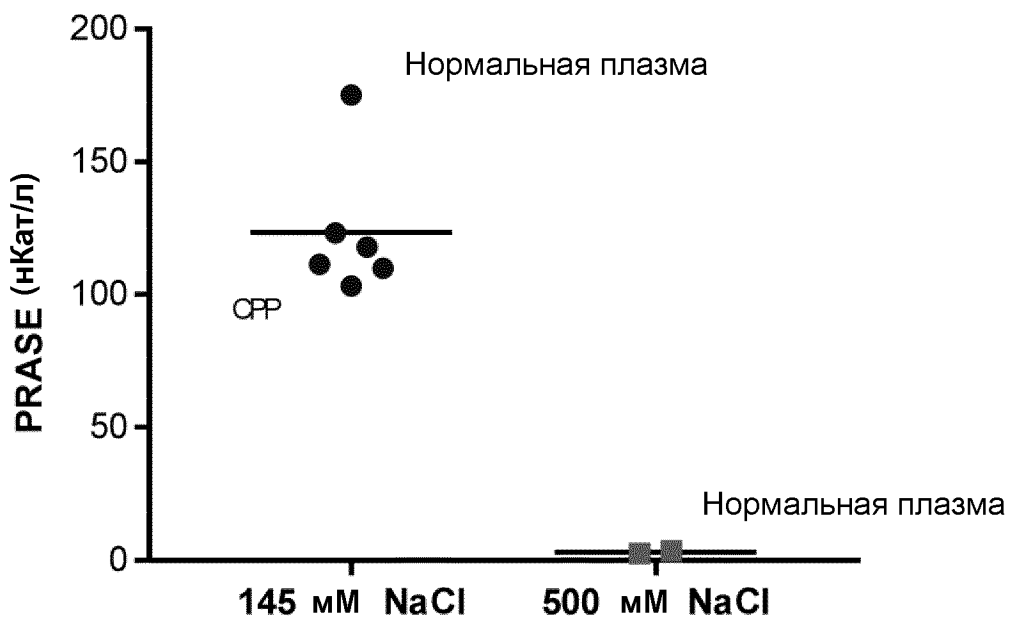


ФИГУРА 9

А

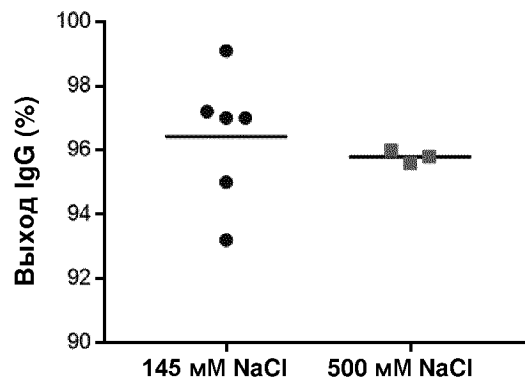


В

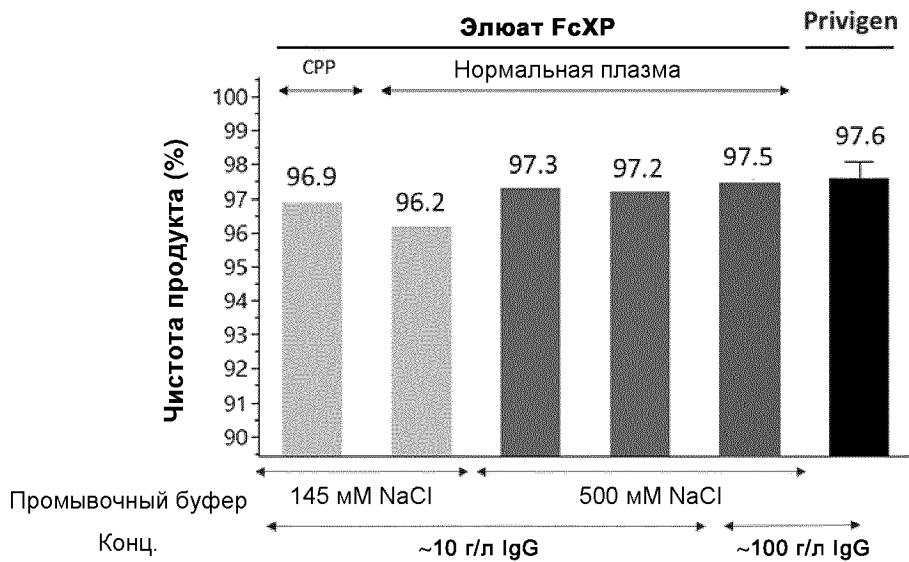


ФИГУРА 10

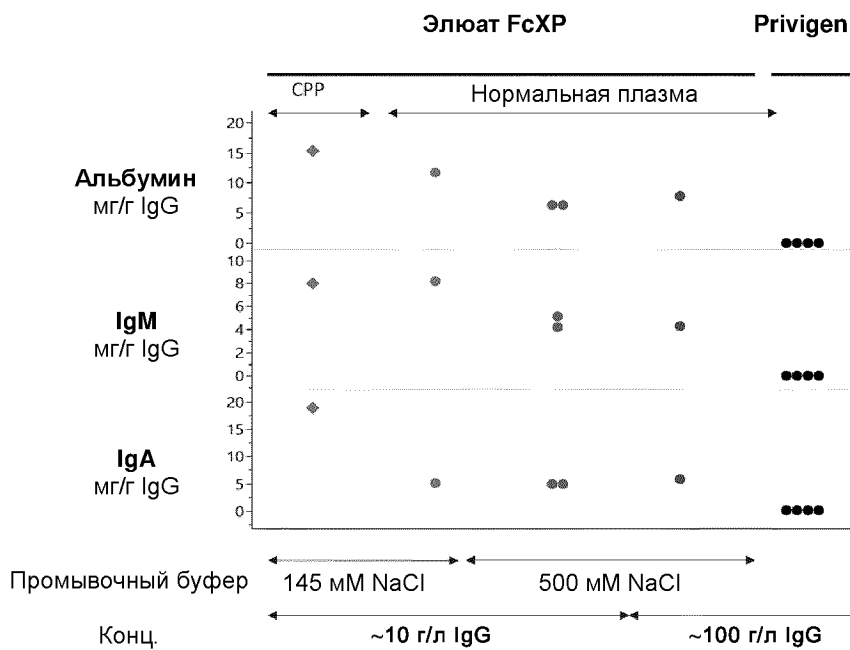
A



B



C



ФИГУРА 11