



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



ANTÔNIO EDSON DE SOUZA LUCENA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO
DE SOLUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA POLIVALENTE PARA USO
ENDOVENOSO COM DUPLA ETAPA DE INATIVAÇÃO VIRAL**

- RECIFE -

2010

ANTÔNIO EDSON DE SOUZA LUCENA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA METODOLOGIA PARA PRODUÇÃO DE SOLUÇÃO
DE IMUNOGLOBULINA POLIVALENTE PARA USO ENDOVENOSO COM DUPLA ETAPA
DE INATIVAÇÃO VIRAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na Área de Concentração: Produção e Controle de Qualidade de Medicamentos. Orientador: Prof^a. Ana Cristina Lima Leite

Lucena, Antônio Edson de Souza.

Desenvolvimento de uma nova metodologia para produção de solução de imunoglobulina polivalente para uso endovenoso com dupla etapa de inativação viral / Antônio Edson de Souza Lucena. – Recife : O Autor, 2009.

ix, 70 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2009.

Inclui bibliografia e apêndices.

1. Farmacologia. 2. Imunoglobulina. 3. Polietilenoglicol. 4. Cromatografia de troca iônica. 5. Ácido caprílico. I. Título.

615
615.1

CDU (2.ed.)
CDD (20.ed.)

UFPE
CCS2010-029



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 21 de dezembro de 2009.

Defesa de Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 21 de dezembro de 2009 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Ana Cristina Lima Leite
(Dept^o de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Assinatura: _____

EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto

(Dept^o de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: _____

EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Divaldo de Almeida Sampaio

(Faculdade de Ciências Médicas de Pernambuco - UPE)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À TODOS QUE CONSTROEM A HISTÓRIA DOS HEMODERIVADOS NO BRASIL

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco HEMOPE**, por minha formação profissional;

Ao **Instituto Nacional de Pesquisas Contra Dengue – INPEDE**, pelo suporte financeiro ao projeto;

À **Dra Cândida Mendes Cairutas** – Pela influência que teve em minha vida profissional; A minha orientadora, **Profª Ana Cristina Lima Leite**, pelo incentivo de ingressar nesse desafio; acadêmico;

Aos **colegas e amigos da GPH – HEMOPE** pela ajuda no desenvolvimento das atividades;

Aos **novos amigos**, pela alegria de fazer novos amigos;

À **Virgínia Florêncio**, pela amizade de duas décadas;

Ao meu irmão **Francisco** pela cumplicidade fraternal;

Aos **meus pais**, por tudo;

À **Esposa e filhos** pelo amor, carinho e suporte emocional

RESUMO

Obteve-se concentrado de imunoglobulina G intravenosa IgGIV, altamente purificado, utilizando-se polietilenoglicol associado a uma única etapa de precipitação por etanol, em substituição ao tradicional método descrito por Cohn-Oncley, que emprega, em três etapas, o mesmo álcool resfriado, como agente precipitante. A purificação da fração bruta contendo mais de 95% de imunoglobulina G foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com um trocador de cátion, a CM-Sephrose, como fase estacionária. Durante o processamento o produto foi submetido a dupla inativação viral sendo a primeira pela ação do caprilato de sódio, 30 mM a pH 5,1+/- 0,1 e a segunda por ação de mistura de solvente/detergente. O produto acabado foi formulado a 5% utilizando-se sucralose 10% como estabilizante. O rendimento da metodologia foi de 3,3g de IgG/L de plasma. A análise do produto acabado demonstrou atividade anti-complementar inferior a $1CH_{50}$. O valor percentual de polímeros e agregados em cinco lotes realizados foi inferior a 3%. O estudo da capacidade de neutralização demonstrou a presença de anticorpos anti-bacterianos e anti-virais em concentração pelo menos três vezes maior que o plasma de origem. O produto acabado apresentou conformidade com todos os requisitos de pureza dispostos na farmacopéia européia IV edição.

Unitermos: Hemoderivados, imunoglobulinas, polietilenoglicol, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica ácido caprílico ,CLAE.

ABSTRACT

Highly purified intravenous immunoglobulin G concentrate (IV IgG) was produced with the use of polyethylene glycol associated to a single-stage precipitation by ethanol, instead of the classic Cohn-Oncley process, which employs cold alcohol as the precipitating agent, in a three-stage process. Precipitation of crude fraction containing more than 95% of immunoglobulin G was performed by liquid chromatography with a cation exchanger, CM-Sepharose, as stationary phase. During the process, the product was subjected to two-stage viral inactivation. The first stage was performed by the action of sodium caprylate, 30 mM at pH 5.1 $\pm$ 0.1, and the second stage was performed by the action of a solvent-detergent mixture. The finished product was formulated at 5% with 10% sucralose as stabilizing agent. The process yields 3.3g of IgG/liter of plasma. The finished product analysis showed an anti-complementary activity lower than 1CH₅₀. Polymer and aggregate percent levels were lower than 3% in the five batches studied. The analysis of neutralizing capacity showed the presence of antibacterial and antiviral antibodies in at least three times higher concentrations than the levels found in source plasma. The finished product fulfilled all purity requirements stated in the 4th edition of the European pharmacopeia.

Uniterms: Blood derivatives, immunoglobulins, polyethylene glycol, ultrafiltration, ion exchange chromatograph, caprylic acid.

LISTA DE ABREVIATURAS

1 CH 50 :Unidade de Atividade de Anti-Complementar

ADE: antibody dependent enhancement

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

EP: Farmacopéia Européia

DEAE: Polímero de dietil aminoetil dextran

DO: Densidade Ótica

FDA: Food Drug Administration

Fab: Fração da imunoglobulina que se liga ao antígeno

Fc: Fração da Imunoglobulina que se liga ao complemento

HIV: Virus da imunodeficiência humana

Ig: Imunoglobulina

IgG: Imunoglobulina G

IgGIM: Imunoglobulina intramuscular

IgGIV: Imunoglobulina endovenosa

PEG: Polietilenoglicol

r.p.m. Rotações por minutos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 OBJETIVOS	5
2.1 Objetivo Geral	5
2.2 Objetivos Específicos	5
Capítulo I	6
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	7
4 Capítulo II	19
Artigo Submetido.....	19
Resumo.....	21
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados e Discussão.....	26
Conclusão.....	31
Abstract.....	32
Referências Bibliográficas.....	33
5 CONCLUSÕES	37
6 PERSPECTIVAS	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8 APÊNDICE	50
Recibo de submissão do artigo.....	51
Cópia do artigo traduzido para o inglês.....	52
Certificados de Apresentação de Trabalhos relacionados ao tema	68

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO:

Hemoderivados são medicamentos biológicos obtidos a partir do fracionamento industrial do plasma humano, submetidos aos processos de industrialização e normatização que lhe conferem qualidade, estabilidade, atividade e especificidade (ANVISA, 2000). Dentre esses produtos se destacam os concentrados de imunoglobulinas G para uso endovenoso, IgGIV que tiveram na última década uma crescente demanda mundial devido a novas indicações terapêuticas (BERGER, 2008), devendo passar das 100 toneladas até 2012 (ROBERT, 2006).

WORLDWIDE DEMAND FOR POLYVALENT INTRAVENOUS IMMUNE GLOBULIN (IVIG) 1986 - 2012 in Metric Tons

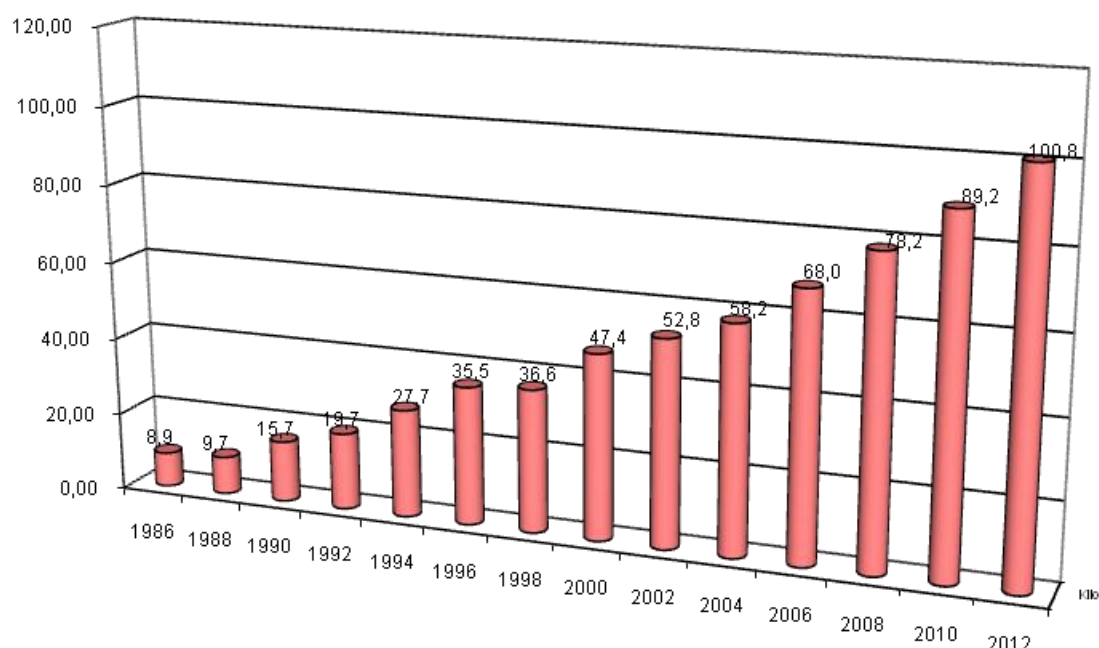


Figura 1: Projeção de consumo de IgGIV

Knezevic-Maramica-Kruskall (2003) mostram diversos protocolos clínicos que trazem as imunoglobulinas como suporte imunológico. Didaticamente poder-se-ia dividir as indicações clínicas em três grandes grupos:

- **Terapias de reposição:** Agamaglobulinemias congênitas e Hipogamaglobulinemia, imunodeficiência variável comum, imunodeficiência severa combinadas, síndrome de Wiskott Aldrich (NYDEGGER, 2004);
- **Imunomodulação:** Púrpura trombocitopênica idiopática em adultos ou crianças quando se deseja uma rápida elevação dos níveis de plaquetas circulantes, doença de kawasaki, Síndrome de Guillain Barre, transplante de medula óssea. (BERGER, 2008);
- **Neutralização de Antígenos:** Terapias combinadas com antibióticos ou antiretrovirais. (MOREL-NYDEGGER 1986).

Concentrados de imunoglobulinas G (IgG) são preparados quase que por unanimidade a partir do método descrito por Cohn (1946) ou por suas variantes (ROUSELL-MACCUE, 1990), que utilizam o etanol à frio em pelo menos três etapas da purificação. Apesar de ter um reconhecido poder de destruição de microorganismos patógenos eventualmente presentes no plasma (MORGENTHALER, 1989), a utilização de etanol provoca parcial desnaturação das proteínas plasmáticas causando um re-arranjo estrutural da molécula de IgG conhecida como agregados. Esses agregados protéicos precisam ser eliminados enzimaticamente, o que por No presente trabalho, desenvolvemos uma metodologia alternativa à esses métodos tradicionais. Em nossa variante muitas vezes podem alterar a eficácia da imunoterapia (KROEZ et al, 2003).

, para isolar os grupos de proteínas, trabalhamos com a combinação de dois agentes químicos não-desnaturantes: O ácido caprílico, o polietilenoglicol e apenas uma etapa de precipitação pelo etanol. A propriedade detergente do ácido caprílico sobre as membranas de vírus envelopados, descrita por (LUNDBLAD-SENG, 1991) também foi explorada, introduzindo ao hemoderivado, uma segunda etapa de inativação viral, a primeira, é a ação química da mistura de um polissorbato com o fosfato butílico, descrita por (HOROWITZ, 1995). O produto acabado foi formulado para ser estável na forma líquida onde empregamos com exclusividade o açúcar sucralose como estabilizante da formulação. As características do produto obtido atenderam aos requisitos de qualidade estabelecidos na Farmacopéia Européia e correspondem àquelas dos concentrados de IgG considerados de terceira geração.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS:

2.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver metodologia para purificação de imunoglobulina polivalente a partir de plasma sanguíneo de doadores saudáveis utilizando associação de precipitantes químicos que minimizem a desnaturação protéica

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar a eficiência da utilização conjunta de dois agentes precipitantes de proteínas: Polietilenoglicol e ácido octanóico para purificação de imunoglobulina bruta a partir de plasma humano;

- Determinar pontos de inserção na técnica a ser desenvolvida de metodologias adicionais de inativação viral;
- Determinar a metodologia de eliminação dos agentes de precipitação;
- Determinar a composição do tampão de formulação para o produto acabado;
- Realizar a caracterização bioquímica do concentrado obtido;
- Caracterizar a pureza do produto acabado obtido pela nova técnica utilizando o teste de eletroforese em gel de acetato de celulose;
- Caracterizar a integridade da molécula utilizando técnica de CLAE;
- Determinar a atividade anti-complementar do produto acabado;
- Pesquisar a presença de anticorpos antibacterianos e antivirais não-triados na doação de sangue.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ESTADO DA ARTE NA PREPARAÇÃO DE CONCENTRADOS DE IMUNOGLOBULINA G

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

3.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO:

O organismo humano vive em constante luta para manter o equilíbrio frente a uma flora que lhe é própria, além disso, é invadido continuamente por bactérias, vírus, fungos, parasitas em geral, ou ainda que por substâncias químicas ou biológicas com potencialidades para alterar o funcionamento de órgãos ou tecidos. A esse conjunto de agressores denominamos antígenos (HARLOW-LANE,1991)

A defesa do organismo contra os antígenos é feita pelo sistema imunológico ou imunitário e a capacidade do organismo resistir às agressões antigênicas é conhecida como imunidade (CHESTNUT-GREY, 1981). A imunidade se divide em dois tipos:

- Celular – Promovida por células especializadas tais como: Granulócitos, macrófagos, linfócitos T e B.;
- Humoral – Promovida pelos anticorpos (HARLOW-LANE, 1991).

Anticorpos são as proteínas produzidas por um organismo em resposta a invasão de moléculas estranhas. Eles são sintetizados inicialmente por plasmócitos, estado terminal da diferenciação dos linfócitos B e circulam no sangue e na linfa onde eles se fixam aos antígenos impedindo esses de desenvolverem ação antigênica. Quando o anticorpo se liga ao antígeno, forma-se uma nova estrutura chamada “complexo antígeno-anticorpo” que é eliminado da circulação por mecanismo de fagocitose do macrófago (AADERN, 1979).

Os anticorpos, também chamados de imunoglobulinas (Ig) constituem uma grande família de glicoproteínas que apresentam em comum, propriedades estruturais e funcionais. Do ponto de vista funcional, eles podem ser caracterizados por sua capacidade de se fixar às células ou às proteínas especializadas do sistema imunológico. A unidade funcional do anticorpo, corresponde a estrutura da imunoglobulina G, IgG, que pode ser representada como um “Y”, (figura 2), sendo formada de quatro polipeptídeos: duas cópias idênticas de um polipeptídeo denominado cadeia pesada e duas cópias idênticas de um polipeptídeo denominada de cadeia leve. As imunoglobulinas correspondem à fração gama da eletroforese e estão divididas em cinco classes IgG, IgM, IgA, IgE e IgD (tabela 1), em função do número de unidades em Y e do tipo de cadeias pesadas que os constituem (BERZOFSKY-BERKOWER, 1984).

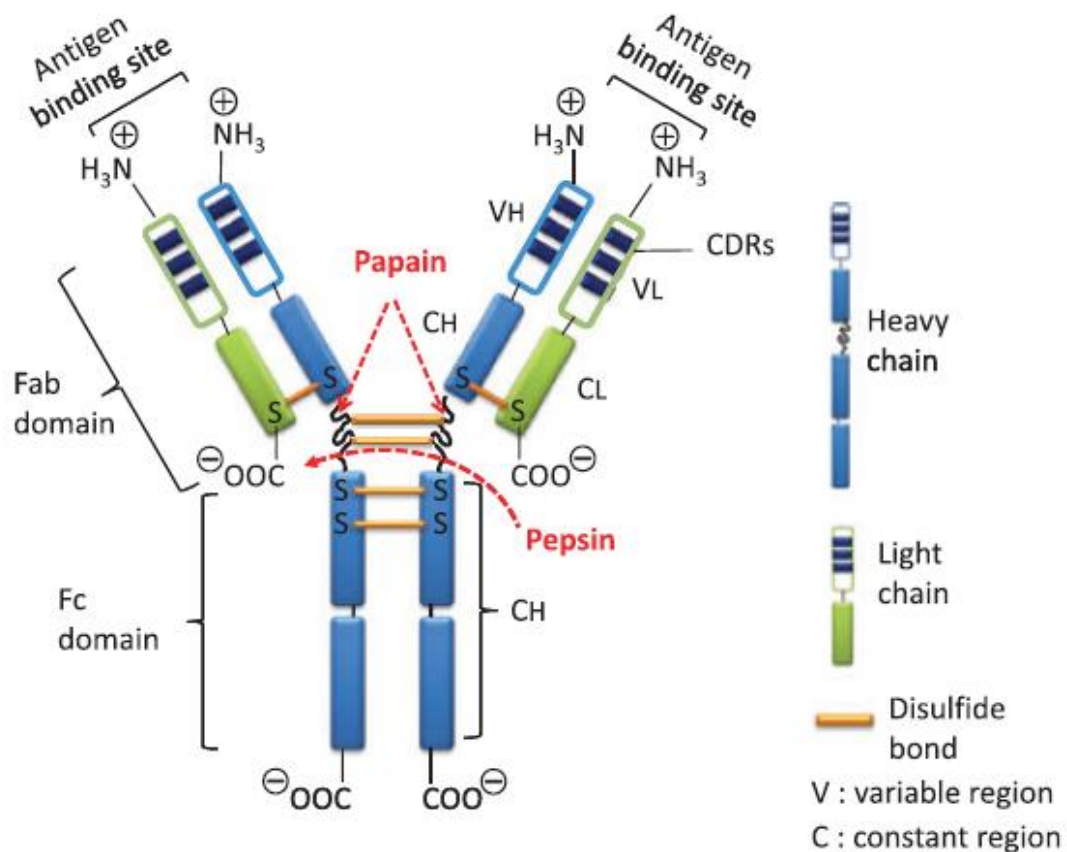


Figura 2: Estrutura da Imunoglobulina G.

As imunoglobulinas possuem especificidades quanto à função fisiológica que desempenham. (UNDERDOWN-SCHIFF, 1986). Apenas as IgG's conseguem atravessar a barreira placentária e a que possui maior capacidade de neutralizar patógenos, sendo portanto a melhor opção para purificação com finalidade medicamentosa.

Tabela 1: Características das Imunoglobulinas: Fonte (Underdown, 1986)

Imunoglobulina	Função Fisiológica
IgA	Encontrado em áreas de mucosas , como os intestinos , trato respiratório e trato urogenital , prevenindo sua colonização por patógenos .
IgD	Funciona principalmente como um receptor de antígeno nas células B. Suas funções são menos definidas do que as dos outros isotipos
IgE	Liga-se a alergenos e desencadeia a liberação de histaminas dos mastócitos , também estando envolvido na alergia . Também protege contra vermes parasitas .
IgM	Expressa na superfície das células B. Elimina patógenos nos estágios iniciais da imunidade mediada pelas células B antes que haja IgG suficiente.
IgG	Em suas quatro formas, proporciona a principal imunidade baseada em anticorpos contra os patógenos que invadem o corpo. É o único tipo de Ig que o bebê recebe da mãe.

3.2 ANTICORPOS COMO MEDICAMENTOS:

3.2.1 A Descoberta do Soro Terapêutico:

Von Behring e Kitasato (1890) demonstraram que o soro de coelhos imunizados com toxina tetânica continha atividade contra o veneno do tétano e que o soro de animais sensibilizados, quando injetados em coelhos saudáveis evitava que esses animais desenvolvessem o tétano após contaminação intencional com a toxina tetânica. Em 1901, Von Behring recebeu o primeiro prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por esse trabalho e dava-se início a soroterapia, ou seja, utilização de soro de animais sensibilizados com antígenos virais para tratar as doenças que esses antígenos causavam em humanos. Esse tipo de produto ficou conhecido como soro terapêutico ou soro curativo.

Wolff-Eisner (1910) publicou o livro “*Serum Therapy and Experimental Therapy*” um manual clínico que avaliou diversas práticas médicas utilizando soro curativo, que se tornara então, conduta terapêutica comum. Nessa época somente na Alemanha cinco empresas produziam soro terapêutico: Höchst-Farbwerke, Merck-Darmstadt, Behring-Höchst, Schering e Park-Davis (HOOPER, 2008). Os soros terapêuticos foram em seguida introduzidos na terapia anti-bacteriana para tratar infecções staphylocócicas, meningocócicas e streptocócicas. Diferentes animais foram utilizados para induzir a produção, em busca de um menor índice de reações transfusionais graves conhecidas como “doença do soro”. O material obtido de humanos convalescentes se mostrou superior em relação à segurança, pois não desenvolviam reações anafiláticas ou a “doença do soro”.

Gibson (1906) preparou um review que demonstrava uma ampla utilização de soro terapêutico na primeira década do século XX. Cency (1907) utilizou soro de humanos convalescentes para tratar o sarampo, posteriormente, Debrê (1923), descreveu sua experiência sob as mesmas condições para tratar a coqueluche, seguido por Regan (1925) para tratamento de rubéola e Bodian (1940) no tratamento da poliomielite. De fato, o tratamento com soro curativo salvou a vida de muitas pessoas no primeiro terço do século XX, no entanto, a composição dos grupos protéicos do soro terapêutico permanecia praticamente desconhecida. O primeiro trabalho apresentando proteínas séricas fracionadas com objetivo terapêutico foi descrito por Karelitz (1938) no qual o autor relata a profilaxia do sarampo utilizando a fração globulina obtida a partir do sangue placentário de adulto imunizado contra aquela doença. No citado trabalho a fração globulina foi isolada por precipitação com sulfato

de magnésio. Somente após o surgimento da técnica da eletroforese, apresentada com exclusividade por Tiselius e Kabat (1938) a comunidade científica tomou conhecimento de que os anticorpos estavam localizados na fração denominada *gama* do soro, originando o termo gama globulina, ou imunoglobulina - Ig.

3.2.2 Fracionamento do Plasma:

O primeiro método industrial para fracionamento plasmático foi descrito por Cohn et al (1946) esse trabalho teve o objetivo de atender a uma demanda do exército americano que se preparava para entrar na segunda guerra mundial e buscava uma alternativa ao plasma humano que era a terapêutica de escolha para tratar o choque hipovolêmico, mas que requeria uma logística muito grande para produção, estocagem e distribuição (DEGOWIN-HARDIN, 1941).



Figura 3: Carregamento de caminhão com plasma líquido a partir do laboratório de processamento de plasma da marinha americana.



Figura 4: Transporte marítimo de plasma durante a segunda guerra mundial.



Figura 5: Distribuição de plasma chegando a hospital na Bélgica outubro/1944.

O princípio da metodologia desenvolvida por Cohn (Figura 6) baseou-se em adicionar variadas concentrações de álcool ao soro ou plasma com o objetivo de diminuir a solubilidade das frações protéicas por redução da constante dielétrica, que é uma característica física do solvente. De acordo com esse princípio, a mistura álcool-água do plasma tem uma constante

dielétrica menor que a do plasma sem álcool o que faz os grupos protéicos perder a solubilidade e precipitarem à medida que se aumenta a concentração de álcool. Outros parâmetros que também influenciam na solubilidade protéica e são utilizados pelo autor em seu trabalho são o pH, força iônica e temperaturas baixas que têm o objetivo de evitar a desnaturação das proteínas além de inibir a contaminação bacteriana.

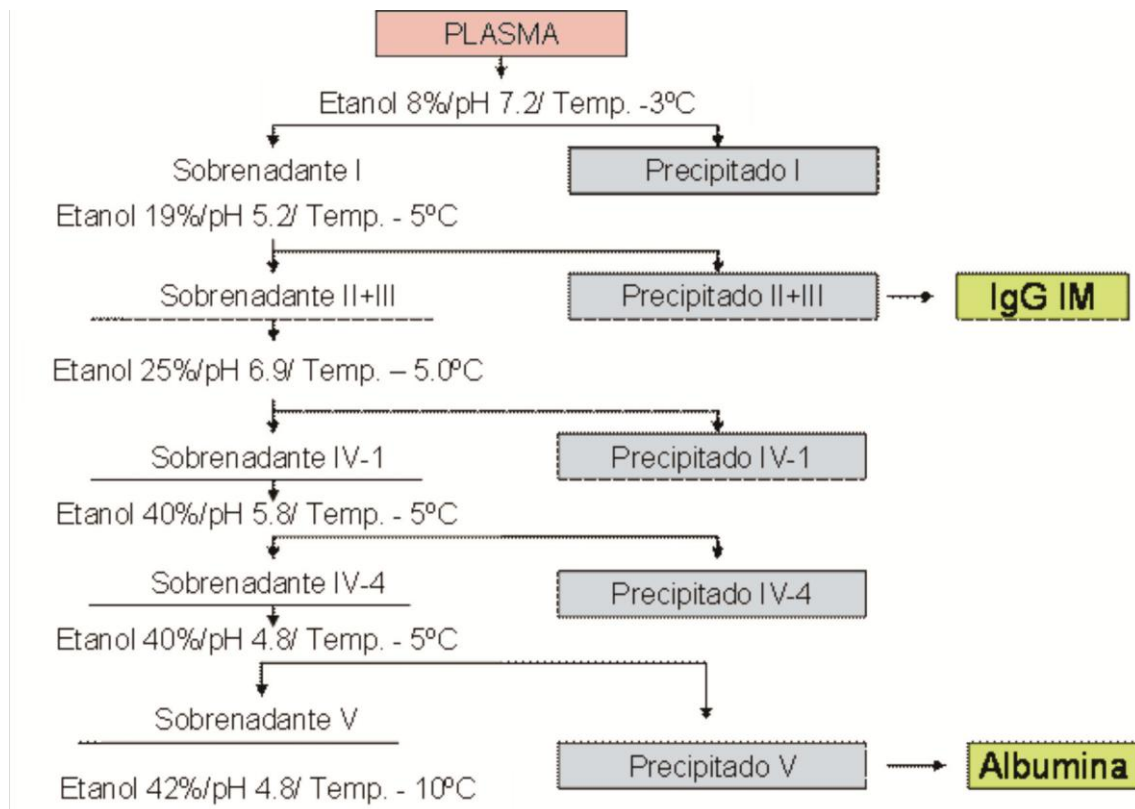


Figura 6: Fluxograma método de Cohn.

3.2.3 Imunoglobulinas Intramuscular - 1ª Geração:

Outros autores trabalharam no sentido de simplificar o método original de Cohn o que trouxe aperfeiçoamentos importantes. Kistler e Nistchmann (1962) obtiveram um concentrado de imunoglobulina para aplicação intramuscular ou subcutânea, composto em sua maior parte do subgrupo G, (IgG). Esse tipo de incremento tecnológico se espalhou por diversos países enquanto o produto final obtido por diversos fabricantes naquela época, apresentava em sua maioria o mesmo perfil, ou seja:

- Preservação do espectro e funcionalidade dos anticorpos em relação ao plasma matéria prima que lhes deu origem;
- Preservação da função Fc;
- Concentração de proteínas entre 150 a 180 mg/ml
- Concentrações de anticorpos 10 a 20 vezes maior em relação à concentração do plasma inicial.

A Transmissão de doenças virais era uma grande preocupação, sobretudo no que diz respeito a hepatite B, no entanto, Talbor e Gerety (1979) mostraram que não ocorreria transmissão de hepatite B através de concentrados de IgGIM mesmo se o plasma inicial estivesse contaminado com esse marcador. De fato, esse tipo de produto adquiriu a reputação de ser seguro, por não ter ocorrido registro de soro-conversão desde o início de sua produção.

Os primeiros produtos contendo concentrados de IgG foram produzidos para prevenção e tratamento de poliomielites, sarampo, coqueluche e hepatite A, à partir de plasma de pessoas sensibilizadas para essas doenças. Esses produtos logo sumiram do mercado devido ao desenvolvimento de vacinas eficazes (STIEHM,1988). Outros concentrados de imunoglobulinas hiperimunes tais como: anti-tétano, anti-D, anti-rábica, anti-hepatite B e anti-varicella zoster são comercializados até hoje.

Somente quando Bruton e Ogden, (1952) publicaram o clássico artigo sobre a agamaglobulinemia, é que as indústrias passaram a oferecer IgGIM poliespecífica, ou seja, sem a seleção prévia de doadores sensibilizados. Esses novos produtos eram purificados a partir do plasma de pelo menos 1000 doadores saudáveis. Essa terapia estava fundamentada na reposição de anticorpos aos portadores dessa doença de origem congênita.

Os concentrado de IgG poliespecíficas se mostraram eficazes tanto para o tratamento da agamaglobulinemia como para hipogamaglobulinemia (GITLIN-JANEWAY, 1956). Kim et al (1986) descreveu que a prevenção de infecções bacterianas portadores de hipogamaglobulinemia ou agamaglobulinemia até os anos sessenta era feita pela injeção de

repetidas doses de IgG IM várias vezes por semana e que apesar de eficaz, era um tratamento excessivamente doloroso para ser contínuo. Smith (1972), demonstrou que a aplicação IgG IM causava proteólise local, apresentava baixa absorção e conseqüentemente baixa biodisponibilidade.

3.2.4 Imunoglobulina G Endovenosa (IgGIV) Liofilizada - 2ª Geração:

Knezevic-Maramica-Kruskall (2003), descreveram as tentativas realizadas para administração de solução de IgG IM por via endovenosa e seus resultados desastrosos. Barandun et al (1962) relata que nesses casos aconteciam reações adversas com incidência entre 15 e 25%. Para elucidação do mecanismo desse tipo de reação, Debré et al (2004), relatou que foi de fundamental importância um estudo realizado por um grupo suíço constituído por Walter Hitzig, Alfred Hässig, Slivio Barandun e Henri Isliker no início dos anos sessenta sobre vias de administração de IgG, mostrando que 5% de voluntários saudáveis e aproximadamente 95% de pacientes com um tipo de imunodeficiência desenvolveram reações adversas imediatas das mais variadas tendo sido relatadas de dispnéia até choque circulatório. Ainda segundo esse autor, o grupo de pesquisadores supracitado mostrou evidências que os agregados – reorganização das partes hidrofóbicas da IgG - formados pelas moléculas que são clivadas durante a produção (devido a ação do etanol) eram os responsáveis pelas reações adversas pois essas novas estruturas teriam a capacidade de ativar o sistema de complemento sem a presença do antígeno provocando as alterações imunológicas.

Como fruto do trabalho do grupo suíço em 1984, a Cruz Vermelha Suíça obteve do FDA o registro do primeiro concentrado de imunoglobulina indicado para administração endovenosa nos Estados Unidos. O produto ficou conhecido como IgGIV (DEBRÉ ET. AL, 2004). Esse novo hemoderivado revolucionou a utilização dos concentrados de imunoglobulinas que tiveram suas indicações terapêuticas ampliadas devido a inexistência de fatores limitantes tais como dose . Uma vantagem adicional se obtém pelo imediatismo da resposta após a infusão, especialmente quando se busca a neutralização de bacteremia.

Segundo Teschner et al (2007) a primeira geração de IgGIV foi elaborada utilizando-se a pepsina para clivar enzimaticamente, os agregados que se formavam em uma solução obtida a partir da fração II de Cohn. A formação dos agregados foi explicada pela ação proteolítica do etanol em contato com as proteínas do plasma, potencializada pela reação exotérmica que acontece quando o álcool reage com a água existente no plasma. (TOUSCH ET. AL, 1989).

A solução do tratamento enzimático para eliminação dos agregados foi embasada em experiências anteriores, quando se tratava o soro terapêutico com a pepsina com o objetivo de diminuir as reações pós-transfusionais daquele produto (EIBL, 2008).

Radosevich e Burnouf (2009) mostraram em trabalho de revisão que muitos tratamentos enzimáticos foram utilizados na tentativa de obter moléculas que não ativassem o complemento sem a presença do antígeno. Esses autores citam metodologias que utilizaram além da pepsina, a plasmina, e a beta propiolactona como exemplos de enzimas utilizadas no fracionamento de plasma.

Teschener et al (2007) descreve ainda que concentrados de IgGIV tratados enzimaticamente, precisavam ser liofilizados, para que o produto final apresentasse estabilidade por pelo menos dois anos.

A literatura mostra que os primeiros concentrados de IgGIV não tinham etapas de inativação viral, fato justificado pela experiência de utilização dos concentrados IgG IM que como já foi ressaltado, eram produtos considerados seguros do ponto de vista de transmissão de patógenos. (WELLS ET AL, 1986). Lebing (2003), no entanto, mostra que ocorreram registros de soro conversão para hepatite C em pacientes que fizeram uso desse tipo de produto, levantando a suposição que a soroconversão se deveu à utilização de IgGIV sem inativação viral. Após o registro dessas evidências, o Conselho de Europa e posteriormente o FDA determinaram que fosse introduzido pelo menos uma etapa de inativação viral nos concentrados de IgGIV que estivessem com registros vigentes (FDA- CDC, 1986).

A segunda geração de IgGIV segundo Teschner et al (2007), foi caracterizada por uma estrutura molecular não clivada, com baixa possibilidade de ativar o sistema anticomplementar sem a presença de antígeno. Embora tivessem uma estabilidade maior em relação aos concentrados tratados enzimaticamente, a forma farmacêutica ainda era um líofilo. Esse tipo de produto era submetido a uma ou mais etapas de cromatografia líquida. Hoppe et al (1967) foram os primeiros a publicar um trabalho sobre um processo industrial para produção de imunoglobulina totalmente por cromatografia líquida. Tanaka et al (2000) usou as frações I + II + III de Cohn como material de partida e purificou a IgG utilizando Q-Sepharose e CM Sepharose (GE Healthcare, Usala Sweden) como trocador de íons para produzir um concentrado altamente purificado.

Em decorrência da correlação existente entre o uso do etanol na produção e a formação de agregados protéicos no produto acabado IgG, outros agentes precipitantes outrora estudados por Polson et al (1964) e Trejo et al (2003) começaram a ser novamente empregados associados à etapas de cromatografia líquida de troca iônica.

Falksveden (1970) descreveu a purificação de um concentrado de IgG para aplicação endovenosa utilizando Polietilenoglicol como agente precipitante. Na fase de pré-purificação o outor precipitou todas as globulinas com uma concentração de PEG entre 10% e 15%, o precipitado foi dissolvido em tampão ácido que solubilizou apenas as IgG. A solução obtida foi tratada por um estágio de cromatografia líquida. Utilizando como fase estacionária uma resina à base de dietil aminoetil dextran (DEAE).

Hirao et al (2002) descreve uma metodologia de purificação de IgG em que obtém uma solução a partir de uma fração II + III descrita por Conh (1946), em seguida trata essa solução com duas etapas precipitação utilizando PEG 4000. Na primeira etapa se separa os contaminantes e na segunda etapa precipitam-se as imunoglobulinas deixando um sobrenadante rico em albumina. Em seguida, o precipitado contendo a IgG é dissolvido e tratado por cromatografia líquida de troca iônica à base de compostos quaternários de amônio. Outros métodos de purificação utilizando polietilenoglicol estão bem descritos por Curling (1980).

O outro precipitante protéico que tem despertado o interesse da indústria de hemoderivados é o ácido octanóico. Chanutin-Curnish 1960 avaliaram a característica inerente aos ácidos graxos de cadeia curta ($C_6 - C_{12}$) em precipitar proteínas plasmáticas em meio ácido. A conclusão desse trabalho mostra que o ácido caprílico (C_8) apresentava a maior eficiência de precipitação entre os compostos testados, observaram também que as gamaglobulinas precipitavam menos que as alfas e betas globulinas. Esse trabalho foi básico para que surgissem vários métodos de purificação de IgG utilizando o ácido caprílico como etapa primária de produção de imunoglobulinas G. Lebin (2003) obteve um concentrado altamente purificado associando precipitação por ácido caprílico a outros processos de purificação. O autor extraiu proteínas contaminantes com 20 mM de ácido caprílico em pH ácido deixando as IgGs em solução, que após clarificada foram submetidas a dupla cromatografia de troca iônica, sendo a primeira um trocador de cátions e a outra, um trocador de ânion.

3.2.5. Imunoglobulinas Endovenosa Líquida com Molécula Intacta - 3ª Geração:

Atualmente observamos a chegada de novos concentrados de IgGs que poderiam ser considerados como os de terceira geração de acordo com a classificação da Teschner et al (2007). Esses produtos têm como característica estabilidade na forma líquida e condições de estocagem sob temperatura ambiente além de apresentações com um teor protéico maior. Tenold (2003) solicitou patente de um produto de maior concentração de ativo que os

convencionais 10% ao invés de 5% e pH, (4,25) enquanto que Hirao et al (2002) formulou seu produto com pH 5 a 6 e tem glicina como estabilizante. Essa nova geração traz uma ou mais etapas de inativação viral.

No presente trabalho, desenvolvemos uma metodologia alternativa ao tradicional método descrito por Conh (1946), para produção de solução injetável de IgG. A técnica tradicional, ainda empregada na maioria das indústrias de hemoderivados, utiliza o etanol à frio em pelo menos três etapas de precipitação protéica para purificação do mesmo produto. Em nossa variante, para isolar os grupos de proteínas, trabalhamos com a combinação de três agentes químicos não desnaturantes: O ácido caprílico, o polietilenoglicol e apenas uma etapa de precipitação pelo etanol. A propriedade detergente do ácido caprílico sobre as membranas de vírus envelopados, descrita por (LUNDBLAD-SENG, 1991) foi explorada, introduzindo ao hemoderivado, uma segunda etapa de inativação viral, a outra, foi a ação química da mistura de um polissorbato com o fosfato butílico (HOROWITZ ET AL, 1985) . O produto acabado foi formulado para ser estável na forma líquida onde empregamos com exclusividade o açúcar sucralose como estabilizante da formulação.

CAPÍTULO II

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

Desenvolvimento de nova metodologia para produção de solução de imunoglobulina polivalente para uso endovenoso com dupla etapa de inativação viral

Desenvolvimento de nova metodologia para produção de solução de imunoglobulina polivalente para uso endovenoso com dupla etapa de inativação viral

Antônio Edson de Souza Lucena ^{1,2*}, Divaldo de Almeida Sampaio^{3,4}, Ednaldo Rosas da Silva³, Virgínia Florêncio de Paiva³, Ana Cláudia Santiago³; Ana Cristina Lima Leite^{2,3}

¹ *Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia (HEMOBRÁS), SCN Quadra 01 – Projeção “E” Central Park 15º Andar, CEP 70711-903 – Brasília-DF.* ² *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPE, Recife-PE.* ³ *Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE), Secretaria de Saúde do Governo do Estado de Pernambuco, Recife-PE.* ⁴ *Departamento de Medicina Clínica da FCM/Universidade de Pernambuco.*

Correspondence:

Antonio Edson de Souza Lucena, Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia – HEMOBRÁS, SCN Quadra 01 – Projeção “E” Central Park 15º Andar CEP 70711-903 – Brasília-DF e-mail: antonio.edson.lucena@hotmail.com

RESUMO:

Obteve-se concentrado de imunoglobulina G intravenosa IgGIV, altamente purificado, utilizando-se polietilenoglicol associado a uma única etapa de precipitação por etanol, em substituição ao tradicional método descrito por Cohn-Oncley, que emprega, em três etapas, o mesmo álcool resfriado, como agente precipitante. A purificação da fração bruta contendo mais de 95% de imunoglobulina G foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com um trocador de cátion, a CM-Sepharose, como fase estacionária. Durante o processamento o produto foi submetido a dupla inativação viral sendo a primeira pela ação do caprilato de sódio, 30 mM a pH 5,1+/- 0,1 e a segunda por ação de mistura de solvente/detergente. O produto acabado foi formulado a 5% utilizando-se sucralose 10% como estabilizante. O rendimento da metodologia foi de 3,3g de IgG/litro de plasma. A análise do produto acabado demonstrou atividade anti-complementar inferior a 1CH₅₀. O valor percentual de polímeros e agregados em cinco lotes realizados foi inferior a 3%. O estudo da capacidade de neutralização demonstrou a presença de anticorpos anti-bacterianos e anti-virais em concentração pelo menos três vezes maior que o plasma de origem. O produto acabado apresentou conformidade com todos os requisitos de pureza dispostos na farmacopéia européia IV edição.

UNITERMOS

Hemoderivados, imunoglobulinas, polietilenoglicol, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica, CLAE.

INTRODUÇÃO

Hemoderivados são medicamentos biológicos obtidos a partir do fracionamento industrial do plasma humano, submetidos a processos de industrialização e normatização que lhe conferem qualidade, estabilidade, atividade e especificidade (RDC 46, 2000). Dentre esses produtos se destacam os concentrados de imunoglobulinas G para uso endovenoso, IgGIV que tiveram na última década uma crescente demanda mundial devido a novas indicações terapêuticas (GARCIA LLORET-MCGHEE-CHATILA, 2008) devendo passar das 100 toneladas até 2012 (ROBERT, 2006).

Martha (2004) fez uma revisão bibliográfica sobre a história da terapia de reposição com imunoglobulinas desde a descoberta do poder dos anticorpos em neutralizar antígenos descritos por Kitassato em 1890 até os dias atuais. Também foi relatada, a vantagem terapêutica dos concentrados de IgGIV de moléculas íntegras em relação aos produtos modificados enzimaticamente (BERGER, 2008).

Os primeiros trabalhos que relatavam a obtenção de concentrados contendo moléculas intactas datam dos anos 90. Foi demonstrada uma metodologia de produção de IgGIV completamente desenvolvida por cromatografia líquida (TANAKA ET AL, 1998). Embora os processos de cromatografia líquida tenham um espaço consolidado na indústria de purificação protéica, as técnicas de precipitação para isolamento primário de material biológico continuam a despertar o interesse dos pesquisadores, sobretudo devido ao baixo custo (CHANG, 2000 e BUCHACHER, 2006).

De fato, agentes químicos capazes de alterar a solubilidade das proteínas plasmáticas, sem causar sua desnaturação, têm sido muito utilizados em laboratórios de pesquisa para purificação de pequenas quantidades de proteínas. (LEBING, 2003). Os polióis, especialmente o polietilenoglicol (PEG), tem despertado o interesse da indústria de hemoderivados já faz algum tempo. Curling (1980) apresentou um esquema de fracionamento plasmático utilizando o polietilenoglicol como agente precipitante. O autor concluiu que o PEG apresentava consideráveis vantagens de utilização, em relação ao etanol, podendo vir a ser amplamente utilizado na produção de hemoderivados, em um futuro próximo. Recentemente o polietilenoglicol foi empregado em fracionamento de plasma humano para obter uma fração bruta de

imunoglobulina que foi posta em solução e tratada posteriormente por duas etapas de cromatografia de troca iônica (TESCHNER, 2007).

Outro agente precipitante muito utilizado na purificação de produtos biológicos é o ácido octanóico. Chanutin e Curnish, (1960) avaliaram a característica inerente aos ácidos graxos de cadeia curta ($C_6 - C_{12}$) em precipitar proteínas plasmáticas em meio ácido. Os autores concluem que o ácido caprílico (C_8) apresentava a maior eficiência de precipitação, entre os compostos testados, e que as gamaglobulinas precipitavam menos que as alfas e beta globulinas. Esse trabalho foi um ponto de partida para vários outros métodos de purificação de IgG, utilizando o ácido caprílico como etapa primária de produção de imunoglobulinas G.

A obtenção de um concentrado altamente purificado, associando precipitação por ácido caprílico a outros processos de purificação, foi relatada por Lebing e colaboradores (2003). Foram extraídas proteínas contaminantes com 20 mM de ácido caprílico em pH ácido deixando as IgGs em solução, que após clarificada foram submetidas a dupla cromatografia de troca iônica, sendo a primeira um trocador de cátions e a outra, um trocador de ânion (LEBING ET AL, 2003).

Diante das evidências encontradas na literatura e considerando a necessidade de se estabelecer tecnologias para a produção de hemoderivados no Brasil, objetivou-se, com o presente trabalho, desenvolver metodologia alternativa à técnica do etanol a frio para produção de concentrado de imunoglobulina G. Para este fim foi testado a combinação de dois agentes químicos não desnaturantes na precipitação das frações protéicas, i.e., o ácido caprílico e o polietilenoglicol, associado à apenas uma etapa de precipitação etanólica. A propriedade detergente do ácido caprílico descrita por Lundblad (1991) foi também explorada para inativação dos vírus envelopados.

MATERIAL E MÉTODOS:

Os resultados da análise dos parâmetros de qualidade de três lotes experimentais estão apresentados em forma de média aritmética. Todos os insumos farmacêuticos utilizados no processo de produção tinham grau de pureza para atender aos requisitos farmacopéicos. Todas as técnicas utilizadas para realização dos ensaios de pureza do produto em processo e produto acabado são farmacopéicas. A concentração de proteínas foi dosada pelo método de biureto quando em controle de processo e através

do método de kjeldhal para o produto acabado. A pureza dos concentrados obtidos foi avaliada por eletroforese em gel de agarose seguindo o procedimento farmacopéia européia (EP). A integridade da molécula foi avaliada por CLAE com coluna de 600 x 75 mm segundo monografia (monografia 2.2.29 EP 5ª edição). A quantificação de IgA e IgM foi realizada por ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”). A medida da atividade anti-complementar foi realizada de acordo com monografia específica (2.6.17 EP 5ª edição). O produto acabado apresentou-se não-reagente para teste de ELISA na pesquisa de anticorpos triados para doação de sangue, tais como anti-HIV₁ e anti-HIV₂ além de anticorpos contra antígenos de superfície da hepatite B. Foram detectados por hemaglutinação presença de anticorpos anti-bacterianos. Foram detectados ainda por teste ELISA presença de anticorpos antivirais não-triados no hemocentro. A Figura 1 sumariza todas as etapas de purificação e preparação do concentrado de imunoglobulinas.

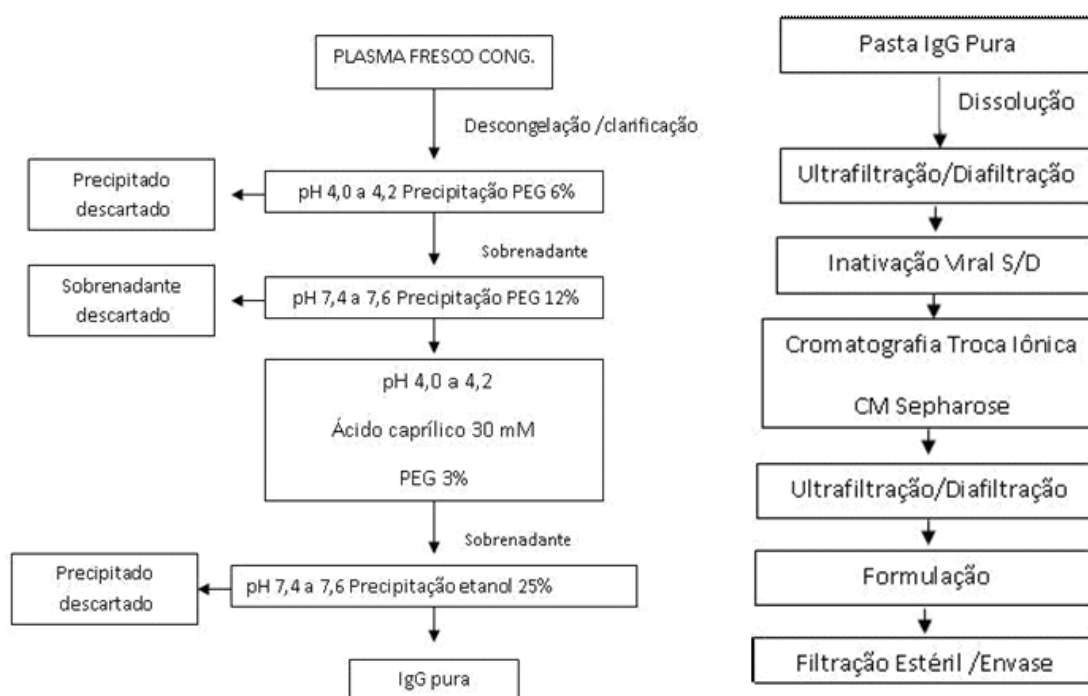


Figura 1: Fluxograma de produção da IgGIV 5% utilizado neste trabalho.

Obtenção de Pasta Bruta de Imunoglobulina G (IgG):

O material de partida utilizado foi o plasma fresco congelado obtido a partir de doadores voluntários oriundos da região metropolitana do Recife – PE, tendo sido disponibilizados a essa pesquisa segundo os critérios do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco – HEMOPE. O plasma selecionado aleatoriamente foi descongelado a + 4°C e clarificado por centrifugação a 12.000 rpm. A pasta de crioprecipitado recuperada foi desprezada e o sobrenadante tratado. A primeira precipitação foi obtida por ajuste do pH para 4,1 +/- 0,1 utilizando-se ácido acético 0,5M e adição de polietilenoglicol q.s.p 6% m/v. Após 6 horas sob homogeneização lenta o precipitado formado foi separado por centrifugação. O sobrenadante teve o pH ajustado para 7,5 +/- 0,1 e foi acrescido polietilenoglicol q.s.p. 12% m/v uma pasta bruta rica imunoglobulina G foi obtida e separada por centrifugação.

1ª Inativação Viral e Obtenção da Pasta Pura de IgG:

A pasta bruta de IgG foi dissolvida em água para injetável em quantidade equivalente a seis vezes o seu peso (Kg/L) e teve o pH ajustado para 5,1 +/- 0,1. Foi adicionado ácido caprílico q.s.p. 30 mM. A suspensão foi mantida sob constante agitação em temperatura de 25°C +/- 1°C por 1 hora como primeira etapa de inativação viral (Lundblad, 1991). Adicionou-se polietilenoglicol q.s.p. 3% m/v formou-se um precipitado que fora descartado por centrifugação. O sobrenadante foi filtrado, tendo sido obtida uma solução hialina. O pH dessa solução foi ajustado para 7,3 +/- 0,1 e em seguida abaixou-se a temperatura para próximo de 0°, quando se iniciou a adição etanol q.s.p. 25%. O aumento da concentração alcoólica seguiu concomitantemente com o resfriamento da suspensão de forma que ao final da adição do etanol a temperatura do produto em processo estava próxima a – 5° C. Depois de atingida a zona de frio ótima, entre – 5°C e -7°C, iniciou-se a precipitação das imunoglobulinas, que durou 8 horas. O precipitado formado, IgG pura, foi recuperado por centrifugação.

2ª Inativação Viral, Purificação Cromatográfica e Formulação:

Dissolveu-se a pasta de IgG pura em água para injetável em quantidade equivalente a seis vezes seu peso (Kg/L), ajustou-se o pH para 4,5 +/- 0,2 utilizando-se HCl 0,5 N e realizou-se uma filtração clarificante com 0,65µm de porosidade absoluta. Uma solução límpida foi obtida.

Para reduzir a força iônica, diafiltrou-se solução de IgG com uma quantidade de água para injetável igual a duas vezes o volume de dissolução, em seguida, a concentração protéica foi ajustada para 5%. A diafiltração e o ajuste da taxa de proteína foram realizadas com sistema Pellicon – Millipore de 30KD.

A solução com baixa força iônica foi submetida ao processo de inativação viral por ação da mistura solvente/detergente empregando-se 0,3% (m/m) de Tri-n-butilfosfato e 1% (m/m) Tween 80 sob temperatura de 25°C (HOROWITZ, 1992)

Uma purificação final foi realizada por cromatografia líquida de troca iônica tendo a CM Sepharose FF como fase estacionária. O sistema foi equilibrado por quatro volumes de tampão NaCl 0,02 M pH 4,0. A amostra foi injetada na razão de 1,5 vezes o volume da coluna por cada ciclo. A eliminação da mistura de solvente detergente se deu por lavagem da fase estacionária utilizando-se dez vezes o volume da coluna de tampão glicina 0,01 M pH 7,0. A IgG foi eluída com sete volumes de tampão glicina 0,1 M mais NaCl 0,15 M e pH 9,0

O eluato teve seu pH ajustado para 4,1 a 4,3 utilizando-se tampão de ácido clorídrico 0,1M e procedeu-se uma diafiltração contra 3 volumes do tampão de sucralose 10%. A taxa de proteínas foi ajustada para 5%. Novamente utilizou-se um sistema Pellicon – Millipore, dessa vez com 10KD de poder de corte. A solução foi filtrada em filtros esterilizante e envasada de forma asséptica

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A tradicional utilização de métodos que utilizam etanol em todas as etapas de fracionamento plasmático pode ser justificada pelas diversas características que lhes são próprias tais como, baixo peso molecular, volatilidade diminuída quando resfriado, reconhecido poder bacteriostático e possibilidade de reaproveitamento através da ré-

destilação. No entanto, o polietilenoglicol (PEG) apresenta uma contundente característica quando se objetiva a preservação estrutural da molécula de IgG, que é não ter ação desnaturante frente a essa molécula. No presente trabalho foram utilizados os dois tipos de álcool em busca de um resultado sinérgico, a purificação bruta foi realizada pela ação do PEG e o etanol foi empregado na última fase do processo. O resultado da fração bruta de IgG mostrou uma pureza de 95% enquanto o produto acabado 100% da fração plasmática purificada correspondia à fração gama. As subclasses de IgG mostraram-se divididas de forma idêntica ao plasma humano, sendo o concentrado obtido potencialmente eficaz para o uso em qualquer situação que requeira neutralização direta de antígenos, inclusive através da barreira placentária (GREY, 1964). Não foi detectada a presença de outras gama-globulinas de peso molecular próximo ao da IgG, tais como IgM e IgA, sendo essa última apontada pelos autores como possível responsável por reações anafiláticas ligadas ao uso de imunoglobulinas. (ULLMAN, 1989)

A metodologia apresentada permite a utilização em escala industrial, pois pode ser incorporada às outras tecnologias, sem prejuízo da recuperação dos fatores de coagulação, ou da albumina. O rendimento médio da técnica foi de 3,3 gramas de IgG pura para cada litro de plasma fracionado.

A inserção de uma etapa de precipitação etanólica para separar as imunoglobulinas se mostrou vantajosa quanto ao aspecto de eliminação do agente precipitante por ultrafiltração. O fluxo da ultrafiltração mostrou-se superior na técnica combinada PEG-etanol (45 l/hora) quando comparada à técnica de purificação, utilizando-se, apenas, o polietilenoglicol (32 l/hora). Uma etapa de precipitação por etanol na concentração final de 25% é também vantajosa para o processo combinado, por ser considerada como uma fase de redução viral (MORGENTHALER, 1989).

Foram introduzidos a esta metodologia dois processos de inativação viral, através de técnicas validadas. A primeira foi a ação do ácido caprílico 30mM a pH 5,1 que sob esse ambiente apresenta poder detergente sobre a membrana lipídica de vírus envelopados. (PARKKINEN 2007). A segunda metodologia de inativação viral foi a ação da mistura de um polissorbatos e o tri-butilfosfato (solvente/detergente), que também age sobre o envelope lipídico viral. Existe ainda a possibilidade de se adicionar uma etapa de redução viral através da nanofiltração, visando eliminação de vírus não-envelopados como o parvovírus B19 e o HVA. (KREIL, 2006)

A medida da atividade complementar mostra que o produto acabado poderia ser bem administrado pela via endovenosa sem ativação indevida do sistema complementar (US FDA 2008). A inexistência de agregados devido à purificação pelo polietilenoglicol confere estabilidade à molécula dispensando tratamentos enzimáticos e ou ácidos que modificariam a estrutura da molécula. A solução límpida obtida é indicativa dessa estabilidade. Quando quantificada, a área percentual do cromatograma que corresponde aos agregados foi de 0,5% (Figura 2).

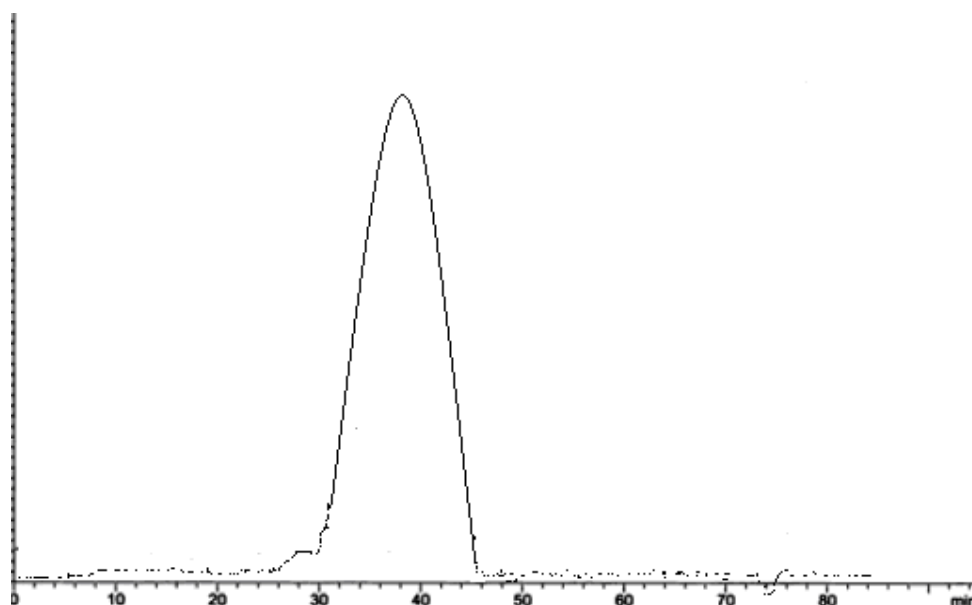


Figura 2: Cromatograma mostrando a inexistência de agregados e que o pico principal correspondente a área de monômeros corresponde a 99,5%.

Depois de submetida a 57°C por 50 horas não houve modificação do aspecto físico da solução em comparação à mesma solução que não fora submetida a essa temperatura no mesmo tempo. A pureza da solução de IgGIV foi confirmada por eletroforese em gel, onde se comparou plasma de partida com a solução obtida. (Figura 3).

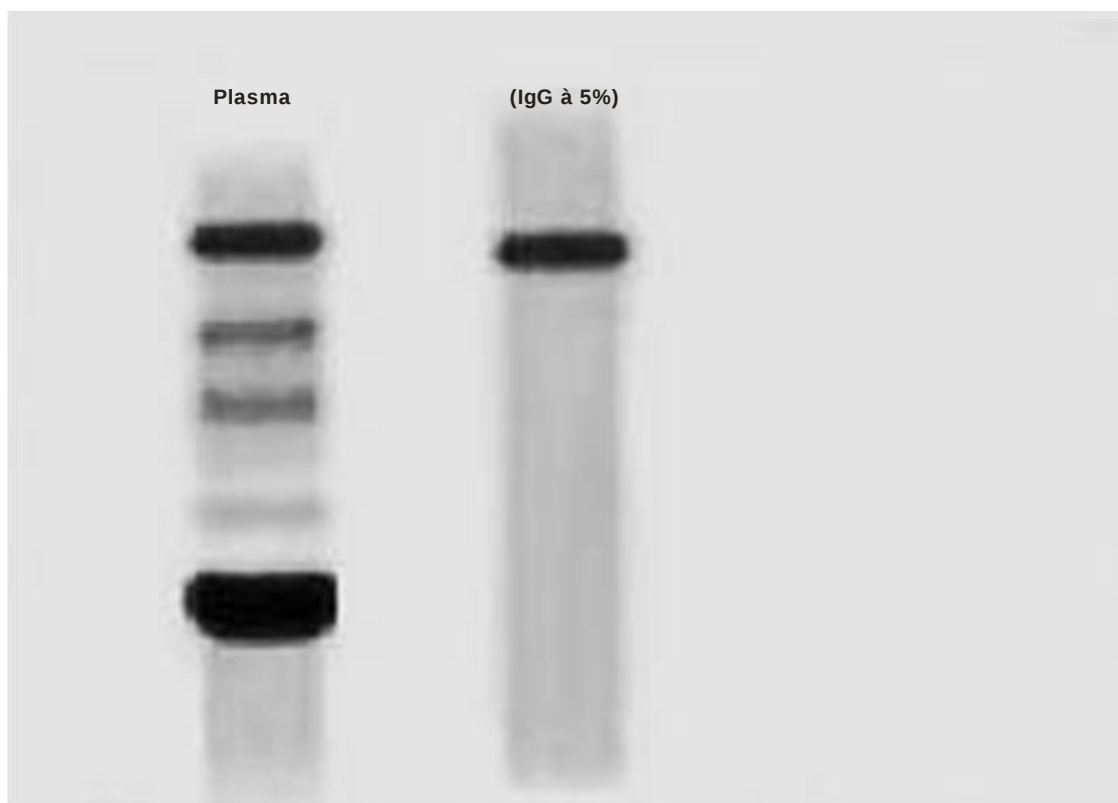


Figura 3: Eletroforese da amostra de plasma fresco e do produto acabado (IgG à 5%).

O produto acabado apresentou-se não-reagente para teste de ELISA, na pesquisa de anticorpos triados para doação de sangue, tais como anti-HIV₁ e anti-HIV₂, além de anticorpos contra antígenos de superfície da hepatite B. Foi detectada, por hemaglutinação, presença de anticorpos anti-bacterianos. Foi detectada, ainda por teste ELISA, presença de anticorpos antivirais não-triados no hemocentro. Considerando-se que o plasma de partida utilizado na produção fora oriundo de uma zona endêmica para dengue (CORDEIRO, 2007), detectou-se no produto acabado altos títulos de IgG anti-dengue (DO média de 35, positivo para DO>10). Um aprofundamento desse estudo se faz necessário para que se possa identificar a presença de mais de um subtipo do vírus no concentrado de IgG que potencialmente poderia causar o fenômeno de ADE (antibody dependent enhancement) se o produto fosse indicado para casos de dengue (FIGUEIREDO, 1999). Os resultados estão dispostos na Tabela I.

Tabela 1: Caracterização Bioquímica/Imunológica da solução de IgGIV à 5%.

Caracterização Protéica		
Análise	Valores normais	Resultado
Conc. Protéica	50 mg/ml +/- 10%	52 mg/ml
Composição Protéica (pureza)	Mínimo 95% IgG	100 % IgG
Distribuição de subclasses	Em percentual	Em percentual
IgG₁	65 – 70	64
IgG₂	20 – 25	22
IgG₃	7 – 10	8
IgG₄	3 – 6	6
pH	4,0 a 7,4	4,52
IgA	-	Não detectável
IgM	-	Não detectável
Atividade	≤ 1 CH₅₀	≤ 1 CH₅₀
Anticomplementar	Ausente	Ausente
Anticorpos anti-HIV1	Ausente	Ausente
Anticorpos anti-HIV2	Ausente	Ausente
Anticorpos anti-HBSAg		
Anticorpos anti-streptococcus	-	Presente
Anticorpos anti-parvovírus	-	Presente
Anticorpos anti-rubeola	-	Presente
Anticorpos anti-dengue	-	Presente
Quantificação de agregados	≤ 3%	0,5%
Estabilidade a 57°C/50h	Não gelifica	Não gelifica

CONCLUSÃO:

A tecnologia desenvolvida apresentou um bom rendimento para produção de IgG intacta – 3.3g/litro de plasma. O método desenvolvido no presente trabalho tem potencialidades para apresentar maior produtividade do que o método de Cohn-Oncley, tendo em vista que o tempo de precipitação das frações pelo etanol é maior do que o das frações obtidas pelo polietilenoglicol. Também possibilita a inserção de diversas tecnologias de paralelas que visam melhorar o processo de purificação do produto acabado, bem como permite a incorporação deste método a outras metodologias de fracionamento de plasma. Vale ressaltar que a estabilidade térmica obtida sob condições de 57°C por 50 horas permite o desenvolvimento de mais uma etapa de inativação viral. Certamente, o método aqui descrito pode contribuir para que centros de fracionamentos desenvolvam, ou aprimorem, suas técnicas de obtenção de concentrados de IgGIV com moléculas intactas e subclasses preservadas ampliando o leque de indicações, bem como as chances do sucesso terapêutico.

A new manufacturing process to produce a liquid and hyperimmune intravenous immunoglobulin using two steps of viral inactivation

ABSTRACT:

In order to improve the traditional Cohn-Oncley's method that uses cold ethanol at least three steps as precipitating agent, here we describe a new manufacturing process to produce intravenous immunoglobulin G (IgGIV) highly concentrated and purified using polyethylene glycol followed by a single step of precipitation with ethanol. The purification of the crude fraction containing more than 95% of immunoglobulin G was performed using liquid chromatography with an ion-exchanger CM Sepharose as stationary phase. During this manufacture, the product was submitted to a double viral inactivation, firstly by the treatment with sodium caprylate (30 mM, pH 5.1 ± 0.1) followed by the treatment with mixtures of solvent / detergent. The final product was a sucralose-stabilized formulation containing 5% of protein, yielding 3.3 g of IgG per liter of plasma and of low aggregate and dimer contents in this preparation (less than 3%). Analyses of the final product disclosed anti-complementary activity (CH_{50}) lower than 1. Furthermore, measurement of its neutralization capacity showed the presence of anti-bacterial and anti-viral concentration in at least three times greater than the plasma source. In summary, the final product, prepared from this new manufacturing process, showed purity, functional integrity and stability in accordance to European Pharmacopoeia IV edition.

Uniterms: blood products, immunoglobulin, polyethylene glycol, ultrafiltration, ion-exchange chromatography, HPLC.

AGRADECIMENTOS:

Este projeto foi financiado pelo INCT-MCT em Dengue (processo: # 573876/2008-8) e PPSUS-FACEPE (processo: # APQ-1380-4.00/08) e recebeu contrapartida da Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (HEMOPE). Os autores agradecem aos órgãos financiadores, bem como à Gerência de Produção do HEMOPE, ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e ao Centre Regionale de Transfusion Sanguine de Bordeaux (França), pelo suporte técnico, científico e de recursos humanos para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

BARANDUN, S.; KISTLER, P.; JEUNET, F.; ISLIKER, H. Intravenous administration of human gamma globulin. *Vox Sang*, v.7 p.157-174, 1962.

BERGER, M. Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.*, v.28, p.413-437, 2008.

BOACKLE J.R; JOHNSON, J.B.; CAUGHMAN, B.G. An IgG primary sequence exposure theory for complement activation using synthetic peptides *Nature*, v.282, p.742-743, 1979

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 46, de 18 de Maio de 2000 (DOU 19/05/00) - Normatiza os processos de produção e controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano. Available at: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Accessed on: 25 sep. 2009.

BUCHACHER, A.; IBERER, G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma – aspects of yield and virus safety. *Biotechnol. J.*, v.1, p.148-163, 2006.

CHANG, C. E.; EO, H.G.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.K.; SHIN, J.S.; LAH, Y.K.; PARK, C.W.; JUNG, J.T.; HUH, J.W.; LEE, S.M. Human intravenous immunoglobulin preparation and virus inactivation by pasteurization and solvent detergent treatment. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, v. 30, p.177-197, 2000.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L. J. R.; MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J. N.; MELIN, M.; TAYLOR, H. L. Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.*, v.68, 459-475, 1946.

CORDEIRO, T. M.; SILVA, M. A.; BRITO, A.A.C.; NASCIMENTO, M.J.E.; MAGALHÃES, F.C.M.; GUIMARÃES, F.G.; SILVA, L.N.; CARVALHO, F.M.E.; MARQUES, A. T. E. Characterization of a dengue patient cohort in Recife. *Brazil Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 77, p.1128-1134, 2007.

CURLING, J. M. Methods of plasma protein fractionation. London. Academic Press, 1980. 205 p.

EUROPEAN PHARMACOPÉIA, 5th edition, Ed Main 2007

FIGUEIREDO, L.T.M. Pathogenesis of dengue virus infections. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.32, p.15-20, 1999.

GREY, H. M.; KUNKEL, H.G. H. Chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gamma-globulin. *J. Exp. Med.*, v.120, p.253-66, 1964.

HARLOW, E.; LANE, D. Anticorps, un manuel de laboratoire. Paris: Éditions Pradel, 1991. 725 p.

HOROWITZ, B.; WIEBE, M.E.; LIPPIN, A.; STRYKER M.H. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion*, v.25, p.516-22, 1985.

IMBACH P., (Ed.). Immunotherapy with intravenous immunoglobulins. London: Academic Press, 1991. 180p.

LEBING, W.; REMINGTON, K.M.; SCHREINER, C; PAUL, H.I. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography. *Vox Sang.*, v.84, p.193-201, 2003.

LUNDBLAD, J. L.; SENG, R. L. Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate. *Vox Sang.*, v. 60, p.75-81, 1991.

KREIL, T.R.; WIESER, A.; BERTING, A.; SPRUTH, M.; MEDEK, C.; PÖLSLER, G.; GAIDA, T.; HÄMMERLE, T.; TESCHNER, W.; SCHWARZ .H-P.; BARRETT, P. N. Removal of small nonenveloped viruses by anti-body-enhanced nanofiltration during manufacture of plasma derivatives. *Transfusion*, v.46, p.1143-1151, 2006.

KROEZ, M, KANZY, E-J, GRONSKI, P, DICKNEITE, G. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals*, v.31, p.277-286, 2003.

MARTHA, M.; EIBL, M.D. History of immunoglobulin replacement – immunology *Allergy Clinic N. Am.*, v 28, p.737-764, 2008.

MORELL, A., NYDEGGER, U. E., (Eds.). Clinical use of intravenous immunoglobulins. London: Academic Press, 1986. 320 p.

MORGENTHALER, J.J. Effect of ethanol and viruses. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.*, v.56, p.109-21, 1989.

ONCLEY, J. L.; MELIN, M.; RICHERT, D. A.; CAMERON, J. W.; GROSS, P.M. Jr: The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-lipoprotein into subfractions of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, v.71, p.541-550, 1949.

PARKKINEN, J. A process for the manufacture of virus safe immunoglobulin. US PATENT 0244305 Oct. 18, 2007

ROBERT, P. Global demand for plasma products In: INTERNATIONAL PLASMA PROTEIN CONGRESS, Prague, 2006 Proceedings. Zeist The Netherland Medical Forum Intenational B.V 2006 p 39-68

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5 CONCLUSÕES

A tecnologia desenvolvida apresentou um bom rendimento para produção de IgG intacta – 3.3g/litro de plasma. Esta metodologia tem potencialidades para apresentar maior produtividade do que o método de Cohn-Oncley, tendo em vista que o tempo de precipitação das frações protéicas pelo etanol é maior do que o dessas frações obtidas pelo polietilenoglicol. Outra vantagem é a diminuição em torno de cinquenta por cento da demanda de carga da cadeia do frio, reduzindo custos de instalação e operacionais de uma unidade fabril.

O método se mostrou apto ao acoplamento de tecnologias suplementares de purificação. A etapa de cromatografia líquida de troca iônica utilizada para eliminação da mistura solvente/detergente é um exemplo dessas possibilidades. Outra tecnologia passível de ser acrescida ao processo é a nanofiltração para remoção viral, que se apresenta como uma tendência de utilização na produção de hemoderivados (BURNOUF 2007).

Os agentes precipitantes foram eliminados por ultrafiltração, não tendo sido registrados problemas operacionais, ratificando os resultados encontrados por Martinache e Henon (1980).

O produto acabado foi formulado em pH ácido (4,0 a 4,5) tendo sido utilizado carboidrato, sucralose a 10% para obtenção da isotonicidade do meio. Nessas condições a solução apresentou estabilidade térmica quando submetida à ambiente adverso de temperatura 57°C por 50 horas. Esse resultado nos encoraja a estudar a inserção de mais uma etapa de inativação viral pelo aquecimento da solução a 60 ° C por 10 horas.

A caracterização imunológica do produto acabado mostrou-se satisfatória quanto aos requisitos farmacopéicos de requerer a presença de anticorpos contra vírus e bactérias. A presença de anticorpos anti-dengue, mostra que o plasma oriundo de uma zona endêmica para essa patologia, que esteja destinado a ser matéria prima para produção de concentrados de imunoglobulinas, é um assunto que deve ser aprofundado.

Entendemos que os objetivos traçados nesse projeto foram atendidos à contento. Entendemos ainda que esta nova metodologia pode contribuir para o desenvolvimento ou aprimoramentos de técnicas de obtenção de concentrados de IgGIV com moléculas intactas e subclasses preservadas ampliando o leque de indicações, bem como as chances do sucesso terapêutico.

6 PERSPECTIVAS

- 6.1. Avaliar a possibilidade de acrescentar mais uma etapa de inativação viral por aquecimento a 60°C por 10 horas, considerando solução permaneceu sem gelificação, quando submetida à temperatura de 57°C por 50 horas;
- 6.2. Avaliar a substituição do estabilizante ora utilizado por outro açúcar comumente empregado na formulação de hemoderivados, tais como: Manitol, xilitol, sacarose, glucose ou maltose. Nessa etapa devem ser comparados todos os requisitos de qualidade que demonstrem a integridade da molécula. A cristalografia pode ser utilizada para tentar identificar possíveis interações da molécula de IgG com o estabilizante da formulação;
- 6.3. Acrescentar uma etapa de redução viral por nanofiltração, tecnologia que permite filtrar partículas virais entre 15 e 45 nanômetros, avaliando todos os parâmetros de qualidade e produtividade;
- 6.4. Realizar estudos de neutralização de anticorpos “in vivo”. Utilizar modelos animais para avaliar, por exemplo, a capacidade que tem o concentrado em prevenir um camundongo de uma infecção viral ou bacteriana;
- 6.5. Avaliar a cinética de precipitação protéica utilizando PEG esterilizado por radiação gama. Em estudos anteriores constatamos que o processo de precipitação sofre aceleração quando se utiliza o PEG sob essa condição. Nesse ponto devemos avaliar doses de 15, 20, 25 e 30 Kilogrades. Todos os parâmetros de qualidades têm que ser avaliados;
- 6.6. Selecionar plasma de doadores que contenham altos títulos de anticorpos contra dengue para:
Produzir concentrados de IgG hiperimunes, anti-dengue, e a partir daí:
 - Avaliar a capacidade de neutralização das diversas cepas da dengue (vírus dos tipos: 1, 2 e 3) através de hemaglutinação direta;
 - Desenvolver modelos animais para experimentação da eficácia de imunoterapia passiva contra dengue aplicando o concentrado de IgG hiperimune anti-dengue;
 - Desenvolver modelos animais para estudo do fenômeno ADE
- 6.7. Identificar que tipo de contaminação protéica/química existe nos efluentes oriundos dessa metodologia de produção hemoderivados e avaliar/desenvolver métodos de descontaminação para descarte no meio-ambiente;

- 6.8.** Realizar estudos de estabilidade de curta e longa duração para avaliar por quanto tempo essa formulação permanece estável, se existe formação de agregado e que tipo modificação estrutural acontece no decorrer dos anos. Para responder a todas as perguntas, além de todos os parâmetros de qualidade deve ser empregada a técnica de cristalografia ou outra equivalente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AADEN, L.A. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.* 1979 123: 2928-2929.

BARANDUN S, KISTLER P, JEUNET F, ISLIKER H. Intravenous administration of human gamma-globulin. *Vox Sang.* 1962;7:157–174

BERGER, M. Principles of and Advances in Immunoglobulin Replacement Therapy for Primary Immunodeficiency *Immunol Allergy Clin N Am* 28 (2008) 413–437.

BERZOFKY, J.A.; BERKOWER, I.J. Antigen-antibody interaction In: *Fundamental immunology* (ed. W.E. Paul), pp 595-644. Raven Press, New York.

BEHRING, V.E.A.; KITASATO, S.U. über das Zustandekommen der Diphtherie-immunität und der Tetanus-immunität bei Tieren. *Dtsch Med Wochenschr* 1890 16: 1113-4.

BODIAN, D. Neutralization of three immunological types of poliomyelitis virus by human gamma globulin. *Proc Soc Exp Biol Med* (1940) 72:259-261.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 46, de 18 de Maio de 2000 (DOU 19/05/00) - Normatiza os processos de produção e controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano. Available at: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

BRUTON M. C., OGDEN C, Agammaglobulinemia. *Pediatrics* (1952) Vol 9, n° 6 (june) 1952 pp 722-728.

BURTON, M. et al., Immunoglobulin Purification from Human Plasma Fractions, paper presented at the Production and Economics of Biopharmaceuticals conference (IBC, San Diego, CA, 14–15 November 2001.

BURNOUF, T. Modern Plasma Fractionation *Transfusion Medicine Reviews*, Vol 21, n° 2 (April) 2007 pp 101-107.

CLAMAN, H.N.; CHAPERO, E.A.; TRIPLET, R.F. Thymus-marrow cell combinations-synergism in antibody production. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*(1966) 122:1167.

CHESTNUT, R.W.; GREY H. M. Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *J. Immunolo.* 1981: 15: 1075-1079.

CENCI, F. Alcune esperienze di sieroimmunizzazione e sieroterapie nel morbillo *Riv Cli e Pediatrica* 1907:5:1017-25.

CHANUTIN, A.;CURNISH, R. R. The precipitation of plasma proteins by short-chain fatty acids. *Arch Biochem Biophys* 1960. 89:218–220.

COHN, E.J. et al Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc* 1946; 68:459–475.

CURLING, J. M. Methods of plasma protein fractionation. London. Academic Press, 1980. 326 p.

DEBRÉ, R. Prevention de la coqueluche par l'injection de serum de coquelucheux prelevé a la quatrieme semaine de la maladie, *Bul.l Acad. Med.* Paris 89 (1923): 348-351.

DEBRE M.; CLAIRICIA, M.; BONNAUD, F. JUBIN O. THIEBAUX- BOUCARD D Feasibility of administering Tegeline (R) at home. *Presse Medicale* 2004;33:682–88.

DE GOWIN, E.L.; HARDIN, R.C. Plan for colletion, transportation and administration of whole blood and plasma in warfare. *War Med* (1941) 1:326-341.

EIBL, M. M. History of Immunoglobulin Replacement *Immunol Allergy Clin N Am* 28 (2008) 737–764

FDA an CDC: Safety of therapeutic immune globulin preparations with respect to transmission of human T-lymphotopic virus Type III/lyphadenopathy-associated virus infection. *MMWR*, 35: 231-233, 1986.

FALKSVEDEN, L.G. Method for fractionating plasma proteins Patent Sweden, no. 348942, 1970.

FIGUEIREDO, L.T.M. Pathogenesis of dengue virus infections. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.32, p.15-20, 1999.

GIBSON, R.B. The concentration of antitoxin for therapeutic use *J. Biol Chem* 1906 1:161-70.

GITLIN, D. JANEWAY, C.A. Agammaglobulinemia congenital, acquired, and transient forms. *Progr Hematol* (1956) 1: 318-329,

HARLOW, E.; LANE, D. Anticorps un manuel de laboratoire. Paris: Éditions Pradel, 1991. 725 p.

HIRAO, Y.; HASHIMOTO, M.;KITAMURA, T.; UEMURA, Y. Room temperature storable immunoglobulin preparation for intravenous injection. Patent US, 6485725, 2002.

HOROWITZ, B. WIEBE, M. E., LIPPIN A STRYKER M. H. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-nveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion* 1985;25:516–22

HOPPE, H. KREBS H. J., MESTER T., HENNING W., HERSTELLUNG V. Production of anti-Rh gamma globulin for preventive immunization. *Munch Med Wochenschr* 1967; **34**:1749–1752.

HOOVER, J.A. Intravenous immunoglobulin Evaluation of Commercial IgGIV Preparations
Immunol Allergy Clin N Am 28 (2008) 765–778.

KARELITZ, S. Prophylaxis against measles with the globulin fraction of immune adult serum. *Am J Dis Child* (1938)55:768–75.

KIM, K.S.; WASS, C.A.; KANG, J.H. Functional activities of various preparations of human intravenous immunoglobulin against type III group B Streptococcus. *J Infect Dis* 1986; 153:1092–1097.

KISTLER, P.;NITSCHMANN, H.S. Large scale production of human plasma fraction. *Vox Sang* 1962 7:414-424.

KNEZEVIC-MARAMICA, I.; KRUSKALL, M.S. Intravenous immune globulins: an update for clinicians. *Transfusion* 2003; 43:1460–80.

KREIL, T.R. Removal of small nonenveloped viruses by anti-body-enhanced nanofiltration during manufacture of plasma derivatives. *Transfusion*, v.46, p.1143-1151, 2006.

KROEZ, M.; KANZY, E.J.; GRONSKI, P.; DICKNEITE, G. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals* 2003; 31:277–286.

LEBING, W. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography *Vox sanguinis* (2003) 84, 193–201.

LUNDBLAD, J.L.; SENG R.L. Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate. *Vox Sang* 1991; 60: 75-81.

MARTINACHE, L.; HENON, M. P. Concentration and Desalting by Ultrafiltration in: *Methods of Plasma Protein Fractionation* Academic Press London (1980) 223-225pp 326 p.

MORELL, A.; NYDEGGER, U.E. Clinical use of intravenous immunoglobulins. London: Academic Press, 1986 180 p.

MORGENTHALER, J.J. Effect of ethanol and viruses. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.* 1989,56:109-21.

NYDEGGER, U.E. Immune Complexes. In: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, et al., editors. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. Vol. 1. Philadelphia: Saunders, 2004.

PARKKINEN, J. A process for the manufacture of virus safe immunoglobulin. US PATENT 0244305 Oct. 18, 2007

POLSON, A. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim Biophys Acta* 1964; 82:463–475

RADOSEVICH, M.; BUNOUF, T. Intravenous Immunoglobulin G: Trend in production, methods, quality control and quality assurance *Vox Sang.*(2009) DOI: 10.1111/j.1423-0410.2009.01226.x

REGAN, J.C. Serum prophylaxis of epidemic parotitis. *J. Am Med Assoc* (1925) 84: 279-280

ROBERT, P. Global demand for plasma products. In: INTERNATIONAL PLASMA PROTEIN CONGRESS, Prague, 2006 Proceedings. Zeist The Netherlands. Medical Forum International B.V 2006 p.39-68.

ROUSELL, R.H.; MCCUE, J.P. Antibody Purification From Plasma in: Blood Separation and Plasma Fractionation,(1990) pp 307-304

STIEHM, E.R. Human gamma globulins as therapeutic agents. *Adv Pediatr* 1988 35:1 – 72.

SMITH, G.N.; GRIFFITHS, B.; MOLLISON, D. Uptake of IgG after intramuscular and subcutaneous injection. *Lancet* 1972;1(7762):1208–12

TABOR, E.; GERETY, R.J. Transmission of hepatitis B by immune serum globulin. *Lancet* 1979 2:(8133)1293-99

TESCHNER W., BUTTERWECK H. A, AUER W., MUCHITSCH E. M., WEBER, A., LIU S. L, SCHWARZ, P. A new liquid intravenous gammaglobulin product (IgGIV10%) highly by state-of-the-art process. *vox sanguinis*, 2007; 92;42-55

TANAKA, K.; SAWATANI, E.; DIAS, G.A.; SHIGUEOKA, E.M.; CAMPOS, T.C.X.B.; NAKAO, H.C.; ARASHIRO, F. High quality human immunoglobulin G purified from Cohn fractions by liquid chromatography. *Braz JMed Biol Res* 2000; **33**:27–30.

TENOLD, R.A. Intravenously injectable immune serum globulin. Patent US, 4396608, 2003

UNDERDOWN, B.; SCHIFF, J. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface *Annu Rev Immunol*(1986) **4**: 389-417.

TISELIUS, A.; KABAT, E.A. Electrophoresis of immune serum. *Science* 1938;87:416–7

TOUSCH, D.; ALLARY, M.; SAINT- BLANCARD, J.; BOSCHETTI, E.Preparative Purification of IgG From Human Plasma Alcohol Precipitate In: *Biotechnologie des proteines du plasma . Colloque INSERM* vol 175. 1989 pp229-236 557p.

TREJO, S. R., .HOTTA J.A., LEBING W., STENLAND C., STORMS R.E, LEE D.C., LI H, PATTEWAY S., REMINGTON K. M. Evaluation of virus and prion reduction in a new intravenous immunoglobulin manufacturing process. *Vox Sang* 2003; **84**:176–187

UNITED STATES BLOOD SUBSTITUTES REPORT NO. 18, Committee on Medical Research, Office of Scientific Research and Development, subject: Testing of Immune Serum Globulin (Human) in the Prophylaxis of Measles, 21 Apr. 1944.

WELLS, M. Inactivation and partition of human T-cell lymphotropic virus type III during ethanol fractionation plasma. *Transfusion*, 26: 210-213, 1986.

WOLFF-EISNER, A. Handbuch der serumtherapie und experimentellen therapie: ein handbuch für klinik und praxis. München: J.F. Lehmanns Verlag; 1910. 120p.

APÊNDICES

8 APÊNDICES:

8.1 Recibo de Submissão do Artigo ao Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.

8.2 Cópia do artigo traduzido para o inglês:

8.3 Certificados de apresentação de trabalhos relacionados ao estudo no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009 (HEMO 2009)

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

RECIBO

Nº de Registro: 111/09

Acusamos o recebimento do trabalho para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

AUTORIA: LUCENA, A. E. S.; SAMPAIO, D. A.; SILVA, E. R.; PAIVA, V. F.; SANTIAGO, A. C.; LEITE, A. C. L.

Título do artigo: “A new methodology for polyvalent intravenous immunoglobulin solution production with a two-stage process of viral inactivation”

São Paulo, 12 de novembro de 2009.

Profa. Elizabeth Igne Ferreira

Editoria Científica

**A new methodology for polyvalent intravenous immunoglobulin solution production
with a two-stage process of viral inactivation**

Antônio Edson de Souza Lucena^{1,2*}, Divaldo de Almeida Sampaio^{3,4}, Ednaldo Rosas da Silva³, Virgínia Florêncio de Paiva³, Ana Cláudia Santiago³; Ana Cristina Lima Leite^{2,3}

¹Brazilian Blood Derivatives and Biotechnology Company (HEMOBRÁS), ²Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences Department of Pharmaceutical Sciences Federal University of Pernambuco -UFPE, ³Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco, HEMOPE, Health Bureau of Pernambuco State Government, ⁴Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco

***Correspondence:**

A. E. S. Lucena

Empresa Brasileira de Hemoderivados e Biotecnologia – HEMOBRÁS

SCN Quadra 01 – Projeção “E” - Central Park 15º Andar

70711-903 – Brasília-DF, Brasil

E-mail: antonio.edson.lucena@hotmail.com

Highly purified intravenous immunoglobulin G concentrate (IV IgG) was produced with the use of polyethylene glycol associated to a single-stage precipitation by ethanol, instead of the classic Cohn-Oncley process, which employs cold alcohol as the precipitating agent, in a three-stage process. Precipitation of crude fraction containing more than 95% of immunoglobulin G was performed by liquid chromatography with a cation exchanger, CM-Sephacrose, as stationary phase. During the process, the product was subjected to two-stage viral inactivation. The first stage was performed by the action of sodium caprylate, 30 mM at pH 5.1 $\pm$ 0.1, and the second stage was performed by the action of a solvent-detergent mixture. The finished product was formulated at 5% with 10% sucralose as stabilizing agent. The process yields 3.3g of IgG/liter of plasma. The finished product analysis showed an anti-complementary activity lower than 1CH₅₀. Polymer and aggregate percent levels were lower than 3% in the five batches studied. The analysis of neutralizing capacity showed the presence of antibacterial and antiviral antibodies in at least three times higher concentrations than the levels found in source plasma. The finished product fulfilled all purity requirements stated in the 4th edition of the European pharmacopeia.

Unit terms: Blood derivatives, immunoglobulins, polyethylene glycol, ultrafiltration, ion exchange chromatography, HPLC.

Obteve-se concentrado de imunoglobulina G intravenosa IgGIV, altamente purificado, utilizando-se polietilenoglicol associado a uma única etapa de precipitação por etanol, em substituição ao tradicional método descrito por Cohn-Oncley, que emprega, em três etapas, o mesmo álcool resfriado, como agente precipitante. A purificação da fração bruta contendo mais de 95% de imunoglobulina G foi realizada utilizando-se cromatografia líquida com um trocador de cátion, a CM-Sepharose, como fase estacionária. Durante o processamento o produto foi submetido a dupla inativação viral sendo a primeira pela ação do caprilato de sódio, 30 mM a pH 5,1+/- 0,1 e a segunda por ação de mistura de solvente/detergente. O produto acabado foi formulado a 5% utilizando-se sucralose 10% como estabilizante. O rendimento da metodologia foi de 3,3g de IgG/litro de plasma. A análise do produto acabado demonstrou atividade anti-complementar inferior a 1CH₅₀. O valor percentual de polímeros e agregados em cinco lotes realizados foi inferior a 3%. O estudo da capacidade de neutralização demonstrou a presença de anticorpos anti-bacterianos e anti-virais em concentração pelo menos três vezes maior que o plasma de origem. O produto acabado apresentou conformidade com todos os requisitos de pureza dispostos na farmacopéia européia IV edição.

Unitermos: Hemoderivados, imunoglobulinas, polietilenoglicol, ultrafiltração, cromatografia de troca iônica, CLAE.

INTRODUCTION

Blood derivatives are biologic medicines produced from industrial fractionation of human plasma, subjected to industrialization and normatization processes that confer quality, stability, activity, and specificity (RDC 46, 2003). Among these products, intravenous immunoglobulins G concentrates, IV IgG, play a prominent role, with a growing world demand in the last decade due to their new therapeutic applications (Lloret, 2008). This demand is expected to reach 100 tons by 2012 (Robert, 2006).

Martha (2004) has carried out a literature review of the history of immunoglobulin replacement therapy since the discovery of antibody capacity to neutralize antigens, described by Kitasato in 1890 up to the contemporary period. The therapeutic advantage of intact molecules from IV IgG concentrates has also been reported in comparison to enzymatically modified products (Berger, 2008).

The first papers reporting the production of concentrates containing intact molecules were published in the 1990s. A methodology of IV IgG production fully developed by liquid chromatography has also been described (Tanaka, 1998). Although liquid chromatography processes have an established role in the protein purification industry, precipitation techniques for primary isolation of biological material continue to attract the interest of researchers, mainly because of their low cost (Chang, 2000 and Buchacher, 2006)

Indeed, chemical agents capable of altering plasma protein solubility, without causing their denaturation, have been frequently used in research laboratories for the purification of small quantities of proteins. (Lebing, 2003). Polyols, mainly polyethylene glycol (PEG), have for many years attracted the interest of the blood derivative industry. Curling (1980) presented a plasma fractionation method using polyethylene glycol as a precipitating agent. Curling concluded that PEG presented considerable advantages of use, when compared to ethanol, and it may shortly be widely used in the production of blood derivatives. Polyethylene glycol has recently been employed in human plasma fractionation for the production of a crude fraction of immunoglobulin which was kept in a solution, and was then treated with a two-stage ion exchange chromatography (Teschner, 2007).

Octanoic acid is another precipitating agent frequently used in the purification of biological products. Chanutin & Curnish (1960) assessed the inherent characteristics of short-chain fatty acids ($C_6 - C_{12}$) for plasma protein precipitation in acid medium. The authors concluded that, among the compounds tested, caprylic acid (C_8) presented higher precipitation efficiency. They also concluded that gamma globulins induced less precipitation than alpha-globulins and beta-globulins. This paper was a starting point for the development of several

other IgG purification methods, using caprylic acid as a primary stage in the production of immunoglobulins G.

Lebing and cols. (2003) reported the production of a highly purified concentrate, associating precipitation by caprylic acid to other purification processes. Contaminant proteins were extracted with caprylic acid 20 mM in acid pH, placing the IgGs in solution, which were then subjected to double ion exchange chromatography after clarification, the first with a cation exchanger, and the second one with an anion exchanger (Lebing et al, 2003).

Due to the evidence found in the literature and the need to establish new technologies for the production of blood derivatives in Brazil, the aim of the present paper was to develop an alternative methodology to the classic method of cold ethanol for the production of a solution containing immunoglobulin G concentrate. In order to achieve this goal, a combination of two non-denaturing chemical agents (caprylic acid and polyethylene glycol) was tested in the precipitation of protein fractions. Detergent action of caprylic acid, described by Lundblad, (1991) was also assessed in the inactivation of enveloped viruses.

MATERIALS AND METHODS

Arithmetic mean values from results of the analysis of the quality parameters within three experimental batches were computed. All techniques employed during purity assays for the product in process and for the finished product are according to the Pharmacopeia. Biuret method was used in protein content determination during process control, while Kjeldahl method was employed for the finished product. Purity of the concentrates obtained was assessed by agarose gel electrophoresis according to the guidelines of the European Pharmacopeia (EP). Molecular integrity was assessed by HPLC with 600 x 75mm columns, according to EP monograph (2.2.29 EP monograph, 5th edition). IgA and IgM quantification was performed by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Anti-complementary activity was determined according to its specific monograph (2.6.17 EP monograph, 5th edition). ELISA test for the finished product was non-reactive during the research of antibodies screened for blood donation, such as anti-HIV₁ and anti-HIV₂, and also antibodies against hepatitis B surface antigens. The presence of antibacterial antibodies was detected by hemagglutination. The presence of antiviral antibodies not screened in the blood center was also detected by ELISA test. Figure 1 shows all steps for purification and preparation of immunoglobulin concentrates.

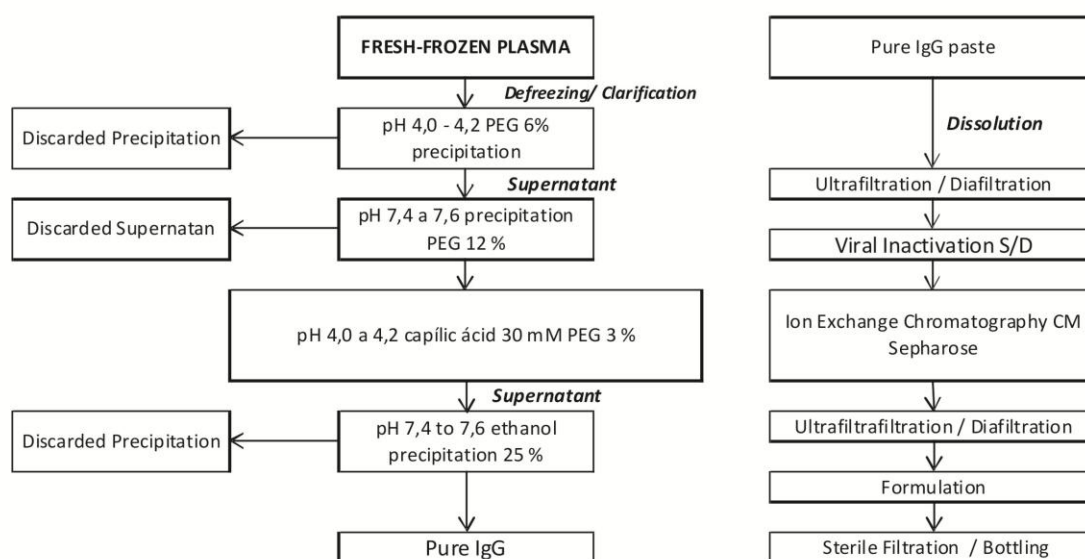


Figure 1: Flow chart showing purification and production of IV IgG 5% used in the present study.

Production of Immunoglobulin G (IgG) Crude Paste

The starting material was fresh frozen plasma (FFP), which was thawed at + 4°C and then clarified by centrifugation at 12.000 rpm. Cryoprecipitate paste recovered was discarded, and supernatant was treated. The first precipitation was obtained by pH adjustment to 4.1 $\pm$ 0.1, with acetic acid 0.5M and the addition of polyethylene glycol q.s.p 6% m/v. After 6 hours under slow homogenization, the precipitate was separated by centrifugation. Supernatant pH was adjusted to 7.5 $\pm$ 0.1, and polyethylene glycol q.s.p. 12% m/v was added; some immunoglobulin G-rich crude paste was obtained and separated by centrifugation.

1st Viral Inactivation and Production of IgG Pure Paste

IgG crude paste was dissolved in water for injection into a quantity equivalent to six times its weight (Kg/L), and its pH was adjusted to 5.1 $\pm$ 0.1. Caprylic acid q.s.p. 30 mM was then added. The suspension was kept under constant agitation at 25°C $\pm$ 1°C for 1 hour, as the first viral inactivation step (Lundblad, 1991). Polyethylene glycol q.s.p. 3% m/v was added, with the formation of a precipitate, which was discarded by centrifugation. Supernatant was filtered, and a hyaline solution was obtained. Its pH was adjusted to 7.3 $\pm$ 0.1, and then temperature was lowered to close to 0°, and the addition of ethanol q.s.p. 25% started. The increase of alcohol concentration took place concomitantly with suspension cooling, so that

the product in process temperature was close to -5°C at the end of ethanol addition. After reaching optimum cold temperature, between -5°C and -7°C , immunoglobulin precipitation started, and it took 8 hours. The precipitate formed, made up of pure IgG, was recovered by centrifugation.

2nd Viral Inactivation, Chromatographic Purification and Formulation

IgG pure paste was dissolved in water for injection into a quantity equivalent to six times its weight (Kg/L), and its pH was adjusted to 4.5 ± 0.2 with HCL 0.5N, and a clarifying filtration was performed with absolute porosity values of $0.65\mu\text{m}$. A limpid solution was obtained.

In order to reduce ionic force, IgG solution was diafiltered with water for injection into a quantity equivalent to twice its dissolution volume, followed by protein concentration adjustment to 5%. Diafiltration and protein level adjustment were performed with 30KD Millipore Pellicon System.

The solution with low ionic force was subjected to viral inactivation process by action of solvent-detergent mixture with Tri-n-butyl phosphate 0.3% (m/m) and Tween 80 1% (m/m) at 25°C (Horowitz, 1992).

A final purification process was performed by ion exchange liquid chromatography with CM Sepharose FF as stationary phase. The system was balanced by four volumes of NaCl 0.02 M buffer pH 4.0. The sample was injected at 1.5 times the column volume in each cycle. Solvent-detergent mixture elimination was performed by washing of stationary phase with ten times the column volume of glycine buffer solution 0.01 M at pH 7.0. IgG was eluted with seven volumes of glycine buffer solution 0.1 M plus NaCl 0.15 M at pH 9.0

Eluate pH was adjusted to 4.1–4.3 with hydrochloric acid buffer solution 0.1M, and a diafiltration was performed against 3 volumes of sucralose buffer solution 10%. Protein levels were adjusted to 5%. Again, Millipore Pellicon System was used, with cutting power of 10KD. The solution was filtered by sterilizing filters and was then packaged aseptically.

RESULTS AND DISCUSSION

The traditional use of methods that employ ethanol in all plasma fractionation steps may be justified by several specific features such as low molecular weight, reduced volatility when cooled, known bacteriostatic property, and recovery possibility due to redistillation. Polyethylene glycol (PEG), however, has a very prominent feature related to preservation of IgG molecular structure: it has no denaturizing action against IgG. In order to reach a synergic result, two types of alcohol were used in the present study: PEG was used for crude purification, and ethanol was used in the last step of the process. IgG crude fraction had 95% purity, the gamma fraction in the finished product was 100% pure. IgG subclasses were distributed identically to human plasma, and the concentrate obtained was potentially effective for use in any situation requiring direct neutralization of antigens, including placental barrier transposition (Grey, 1964). Other gamma-globulins such as IgM and IgA, with molecular weight close to IgG, were not detected. The latter was considered by the authors as the possible culprit for anaphylactic reactions related to the use of immunoglobulins. (Ullmann, 1989)

The methodology presented here can be used in factory-size production, because it can be linked to other technologies, with no loss in the recovery of coagulation factors and albumin. The average yield of the technique was 3.3 grams of pure IgG for each liter of fractionated plasma.

Inclusion of an ethanol precipitation step to immunoglobulin separation showed advantages in relation to the elimination of precipitating agent by ultrafiltration. Ultrafiltration flow was higher in the PEG-ethanol combined technique (45 l/hour) when compared to purification technique using polyethylene glycol only (32 l/hour). The introduction of an ethanol precipitation step in 25% final concentration also brings advantages to combined process, because it is considered a step in viral reduction (Morgenthaler, 1989).

Two viral inactivation processes were introduced into the methodology, both using validated techniques. The first one was the action of caprylic acid 30mM at pH 5.1, which has a detergent action on the lipid membrane of enveloped virus. (Parkinnen, 2007). The second methodology for viral inactivation was the action of polysorbate and tri-butyl phosphate (solvent/detergent) mixture, which also acts on viral lipid envelope. There is also the possibility of introducing a viral reduction step by nanofiltration, aiming at the elimination of non-enveloped virus such as parvovirus B19 and HVA. (Kreil, 2006)

Complementary activity measurements show that the finished product could be injected by intravenous infusion without any undue activation of the complement system (US FDA 2008). The absence of aggregates due to purification by polyethylene glycol gives stability to the molecule, with no need for treatment with enzymes and/or acids that would change molecular structure. The limpid solution obtained reflects such stability. When quantified, the percentage area of the chromatogram corresponding to the aggregates was 0.5% (Figure 2).

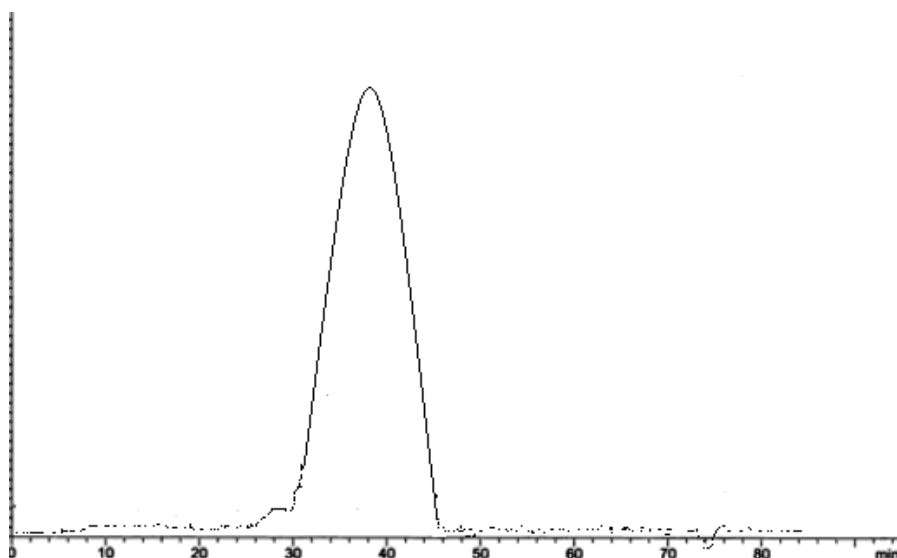


FIGURE 2: Chromatogram showing the absence of aggregates and also showing that monomer area main peak is 99.5%.

After being subjected to 57°C for 50 hours, no changes were observed in the physical features of the solution when compared to the same solution not subjected to such temperature for 50 hours. Purity of IV IgG solution was confirmed by gel electrophoresis, when starting plasma was compared to the obtained solution (Figure 3).

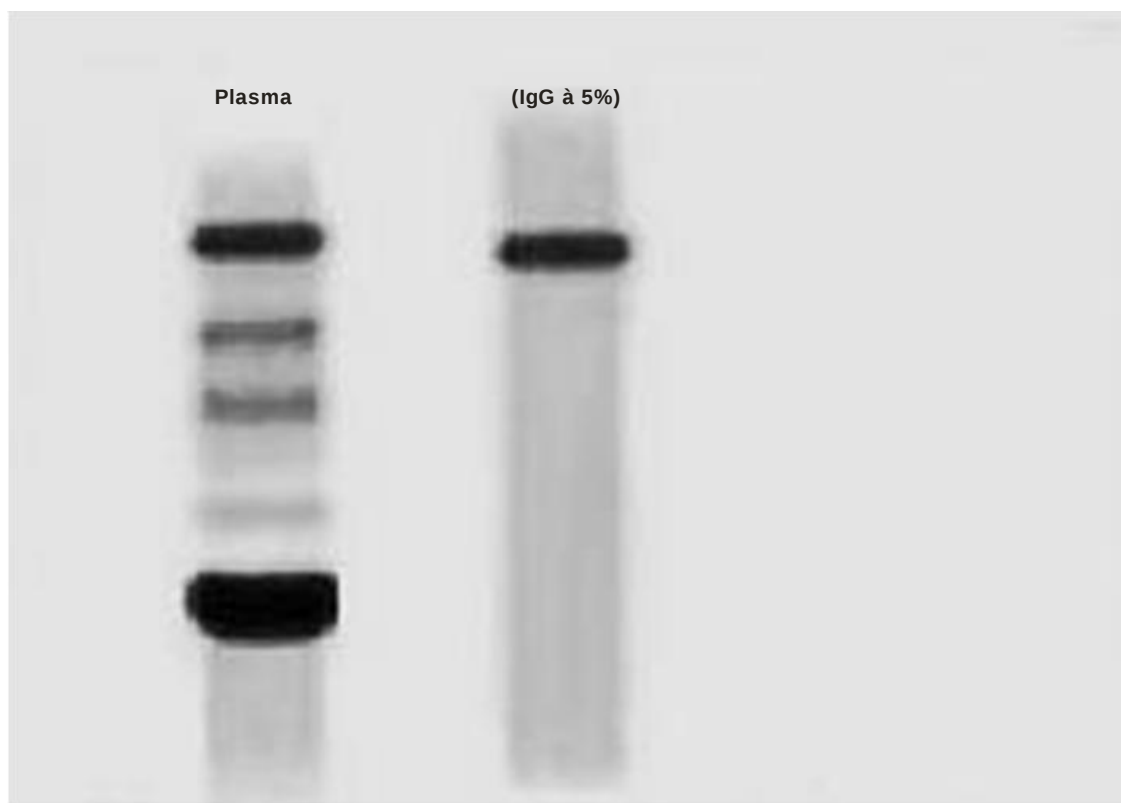


Figure 3: Electrophoresis of fresh plasma sample (left) and of the finished product (IgG 5%).

ELISA test for the finished product was non-reactive during the search for antibodies screened for blood donation, such as anti-HIV₁ and anti-HIV₂, and also antibodies against hepatitis B surface antigens. The presence of antibacterial antibodies was detected by hemagglutination. The presence of antiviral antibodies not screened in the blood center was also detected by ELISA test. Considering that the starting plasma used in the process was collected from a dengue endemic zone (Cordeiro, 2007), anti-dengue IgG high titers were detected in the finished product (average optic density [OD] 35, positive for OD>10). The present study should be extended in order to identify the presence of more than one viral subtype in IgG concentrate, which could potentially cause ADE (antibody dependent enhancement) phenomenon if the product were indicated for dengue cases (Figueiredo, 1999). The results are displayed in Table I.

Table 1: Biochemical/Immunological Characterization of 5%. IgG IV solution

Immunobiochemical Characterization		
Analysis*	Normal values	Result
Protein Conc.	50 mg/mL $\pm$ 10%	52 mg/mL
Protein Content (purity)	Minimum of 95% IgG	Minimum of 100% IgG
Subclasses distribution	Percent	Percent
IgG ₁	65 – 70	64
IgG ₂	20 – 25	22
IgG ₃	7 – 10	8
IgG ₄	3 – 6	6
pH	4.0 - 7.4	4.52
IgA	-	Not detectable
IgM	-	Not detectable
Anti-complementary (CH ₅₀)	$\leq$ 1	$\leq$ 1
Anti-HIV1 antibodies	Absent	Absent
Anti-HIV2 antibodies	Absent	Absent
Anti-HBSAg antibodies	Absent	Absent
Anti- <i>Streptococcus</i> antibodies	-	Present
Anti-parvovirus antibodies	-	Present
Anti-rubella antibodies	-	Present
Anti-dengue antibodies	-	Present
Quantification of aggregates	$\leq$ 3%	0.5%
Stability at 57°C/50h	No gellification	No gellification

CONCLUSION

The technology developed by the authors of the present paper showed high yield levels in the production of intact IgG – 3.3g/liter of plasma. The method has potential to show higher productivity than the Cohn-Oncley method, because the precipitation time of the fractions obtained by ethanol is higher than in the fractions obtained by polyethylene glycol. It also makes it possible to introduce several parallel technologies in order to improve finished product purification process, and it also allows linking of this method to other plasma fractionation methodologies. It is important to emphasize that thermal stability at 57°C for 50 hours allows the development of another viral inactivation step. The method described here can certainly help fractionation centers to develop, or improve, their techniques of the

production of IV IgG concentrates, with intact molecules and preserved subclasses, increasing the range of indications, and also enhancing the chances of therapeutic success.

ACKNOWLEDGMENTS

The present project was partially funded by grants from INCT-MCT in Dengue (process: # 573876/2008-8), and PPSUS-FACEPE (process: # APQ-1380-4.00/08) and funding support from the Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (HEMOPE). The authors would like to thank the supporting agencies and also HEMOPE Production Management, Aggeu Magalhães Research Center and *Centre Regionale de Transfusion Sanguine de Bordeaux* (France), for the technical and scientific support, and also for human resources necessary for the conclusion of the present work.

REFERENCES

BARANDUN, S.; KISTLER, P.; JEUNET, F.; ISLIKER, H. Intravenous administration of human gamma globulin. *Vox Sang*, v.7 p.157-174, 1962.

BERGER, M. Principles of and advances in immunoglobulin replacement therapy for primary immunodeficiency. *Immunol. Allergy Clin. N. Am.*, v.28, p.413-437, 2008.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 46, de 18 de Maio de 2000 (DOU 19/05/00) - Normatiza os processos de produção e controle de qualidade, a aquisição e distribuição dos medicamentos hemoderivados para uso humano. Available at: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Accessed on: 25 sep. 2009.

BUCHACHER, A.; IBERER, G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma – aspects of yield and virus safety. *Biotechnol. J.*, v.1, p.148-163, 2006.

CHANG, C. E.; EO, H.G.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.K.; SHIN, J.S.; LAH, Y.K.; PARK, C.W.; JUNG, J.T.; HUH, J.W.; LEE, S.M. Human intravenous immunoglobulin preparation and virus inactivation by pasteurization and solvent detergent treatment. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, v. 30, p.177-197, 2000.

COHN, E. J.; STRONG, L. E.; HUGHES, W. L. J. R.; MULFORD, D. J.; ASHWORTH, J. N.; MELIN, M.; TAYLOR, H. L. Preparation and properties of serum and plasma proteins III. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.*, v.68, 459-475, 1946.

CORDEIRO, T. M.; SILVA, M. A.; BRITO, A.A.C.; NASCIMENTO, M.J.E.; MAGALHÃES, F.C.M.; GUIMARÃES, F.G.; SILVA, L.N.; CARVALHO, F.M.E.; MARQUES, A. T. E. Characterization of a dengue patient cohort in Recife. *Brazil Am. J. Trop. Med. Hyg.* v. 77, p.1128-1134, 2007.

CURLING, J. M. Methods of plasma protein fractionation. London. Academic Press, 1980. 205 p.

FIGUEIREDO, L.T.M. Pathogenesis of dengue virus infections. *Medicina*, Ribeirão Preto, v.32, p.15-20, 1999.

GARCIA-LLORET M., MCGHEE S., CHATILA T. Replacement Therapy in Children *Immunology and Allergy Clinics of North America*, Volume 28, Issue 4, Pages 833-849, 2008

GREY, H. M.; KUNKEL, H.G. H. Chain subgroups of myeloma proteins and normal 7S gamma-globulin. *J. Exp. Med.*, v.120, p.253-66, 1964.

HARLOW, E.; LANE, D. Anticorps, un manuel de laboratoire. Paris: Éditions Pradel, 1991. 725 p.

HOROWITZ, B.; WIEBE, M.E.; LIPPIN, A.; STRYKER M.H. Inactivation of viruses in labile blood derivatives. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion*, v.25, p.516-22, 1985.

IMBACH P., (Ed.). Immunotherapy with intravenous immunoglobulins. London: Academic Press, 1991. 180p.

LEBING, W.; REMINGTON, K.M.; SCHREINER, C; PAUL, H.I. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography. *Vox Sang*, v.84, p.193-201, 2003.

LUNDBLAD, J. L.; SENG, R. L. Inactivation of lipid-enveloped viruses in proteins by caprylate. *Vox Sang*, v. 60, p.75-81, 1991.

KREIL, T.R.; WIESER, A.; BERTING, A.; SPRUTH, M.; MEDEK, C.; PÖLSLER, G.; GAIDA, T.; HÄMMERLE, T.; TESCHNER, W.; SCHWARZ .H-P.; BARRETT,

P. N. Removal of small nonenveloped viruses by anti-body-enhanced nanofiltration during manufacture of plasma derivatives. *Transfusion*, v.46, p.1143-1151, 2006.

KROEZ, M, KANZY, E-J, GRONSKI, P, DICKNEITE, G. Hypotension with intravenous immunoglobulin therapy: importance of pH and dimer formation. *Biologicals*, v.31, p.277-286, 2003.

MARTHA, M.; EIBL, M.D. History of immunoglobulin replacement – immunology *Allergy Clinic N. Am.*, v 28, p.737-764, 2008.

MORELL, A., NYDEGGER, U. E., (Eds.). Clinical use of intravenous immunoglobulins. London: Academic Press, 1986. 320 p.

MORGENTHALER, J.J. Effect of ethanol and viruses. *Curr. Stud. Hematol. Blood Transfus.*, v.56, p.109-21, 1989.

ONCLEY, J. L.; MELIN, M.; RICHERT, D. A.; CAMERON, J. W.; GROSS, P.M. Jr: The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-lipoprotein into subfractions of human plasma. *J. Am. Chem. Soc.*, v.71, p.541-550, 1949.

PARKKINEN, J. A process for the manufacture of virus safe immunoglobulin. US PATENT 0244305 Oct. 18, 2007.

BOACKLE J.R; JOHNSON, J.B.; CAUGHMAN, B.G. An IgG primary sequence exposure theory for complement activation using synthetic peptides *Nature*, v.282, p.742-743, 1979.

ROBERTS, P. Global demand for plasma products. In: International Plasma Protein Congress 2006 Prague. Paper presented PPTA, 2006. 39-68

SCHULTZE HE, SCHWICK G: Über neue Möglichkeiten intravenöser Gammaglobulin-Applikation. *Deutsche Med. Wchnschr.*, v.87, p.1643-1650, 1962.

SGOURIS, J.T. The preparation of plasmin treated immune serum globulin for intravenous use *Vox Sang.*, v.13, p. 71-84, 1967.

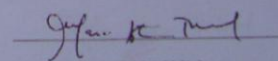
STEINBUCH, M. C. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Rev. Franç. Trans. Immuno. Hematol.*, v.13, p.141-151, 1970.

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho intitulado 728 - "DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA INÉDITA PARA PRODUÇÃO DE SOLUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA POLIVALENTE DUPLAMENTE INATIVADA PARA USO ENDOVENOSO" de autoria de AES Lucena, FL Gouveia, RMB Oliveira, FJP Vasconcelos, LMF Santos, SB Andrade, CS Nascimento, ACL Leite, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, realizado no período de 11 a 14 de novembro, na categoria pôster (painel 123).

ABHH
Associação Brasileira
de Hematologia e Hemoterapia

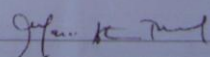

MARCO ANTÔNIO
PRESIDENTE DO HEMO 2009

CERTIFICADO

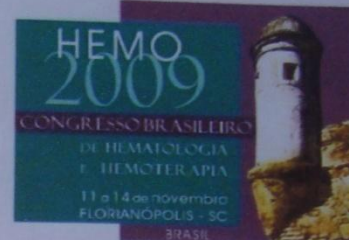


Certificamos que o trabalho intitulado 132 - "IS THERE ANTIBODY DEPENDENT ENHANCEMENT WITH THE TREATMENT OF IGIV IN THE INFECTION BY DENGUE VIRUS?" de autoria de FL Gouveia, RMB Oliveira, AES Lucena, CS Nascimento, LMF Santos, ACL Leite, MM Teixeira, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, realizado no período de 11 a 14 de novembro, na categoria pôster (painel 113).

ABHH
Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia

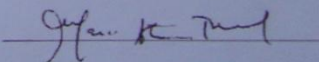

MARIA C. ROSTOM
PRESIDENTE DA ABHH 2009

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho intitulado 733 - "ESTUDO COMPARATIVO PARA PRODUÇÃO DE IMUNOGLOBULINA POLIVALENTE POR DIFERENTES METODOLOGIAS DE PRECIPITAÇÃO" de autoria de FL Gouveia, AES Lucena, RMB Oliveira, FJP Vasconcelos, LMF Santos, CS Nascimento, DRM Moreira, ACL Leite, foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia 2009, realizado no período de 11 a 14 de novembro, na categoria pôster (painel 128).

ABHH
Associação Brasileira
de Hematologia e Hemoterapia


MARCO ROTEIRO
PRESIDENTE DO HEMO 2009