



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102939107 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 20

(21) 申请号 201180029337. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 04. 21

A61K 39/395 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 9/08 (2006. 01)

1006753. 6 2010. 04. 22 GB

A61L 2/10 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C07K 16/06 (2006. 01)

2012. 12. 14

A61P 31/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/056487 2011. 04. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/131787 EN 2011. 10. 27

(71) 申请人 生物测试股份公司

地址 德国德赖艾希

(72) 发明人 W·莫勒尔 D·鲁德尼克

O·曼尼格 M·罗德梅尔

马蒂亚斯·杰默 V·布劳恩

(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限

公司 11127

代理人 丁香兰 庞东成

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 2 页

(54) 发明名称

抗体制剂

(57) 摘要

本发明提供一种适合于人静脉内施用的抗体制剂,所述抗体制剂包含 IgG 抗体、IgA 抗体和占抗体总量至少 5 重量 % 的 IgM 抗体,其中,所述制剂从人血浆制得,其中,所述抗体制剂具有特异性补体活化活性,并且其中,在适合于确定所述抗体制剂的非特异性地激活补体的能力的用人血清进行的体外测定中,所述抗体制剂基本不产生 C5a 且 / 或基本不产生 C3a。本发明还提供所述抗体制剂的医药应用。

1. 一种适合于人静脉内施用的抗体制剂,所述抗体制剂包含 IgG 抗体、IgA 抗体和占抗体总量至少 5 重量%的 IgM 抗体,其中,所述制剂从人血浆制得,其中,所述抗体制剂具有特异性补体活化活性,并且其中,在适合于确定所述抗体制剂的非特异性地激活补体的能力的用人血清进行的体外测定中,所述抗体制剂基本不产生 C5a 且 / 或基本不产生 C3a。

2. 如权利要求 1 所述的抗体制剂,所述抗体制剂还包含占抗体总量的的大于 5 重量%的 IgA 和大于 40 重量%的 IgG。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的抗体制剂,所述抗体制剂包含占抗体总量的的至少 10 重量%的 IgM。

4. 如权利要求 3 所述的抗体制剂,所述抗体制剂包含占抗体总量的的至少 15 重量%的 IgM。

5. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,经调整 IgM 浓度为 1.72mg/ml 的所述抗体制剂在 60 分钟的所述测定后产生少于 200ng/ml 的 C5a。

6. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,经调整 IgM 浓度为 1.72mg/ml 的所述抗体制剂在 60 分钟的所述测定后产生少于 6000ng/ml 的 C3a。

7. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,在所述体外血清测定中,与人血清一起的所述抗体制剂产生的 C5a 和 / 或 C3a 的量等于仅用人血清时的 C5a 和 / 或 C3a 的量 $\pm 70\%$ 。

8. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,用于确定所述抗体制剂基本不产生 C5a 的所述体外血清测定包括以下步骤:

(a) 将一定量的所述抗体制剂添加到 100 μ l 人血清中以产生含有 1.72mg/ml IgM 的反应混合物,并在持续搅拌下将所述反应混合物于 37°C 温育 60 分钟;

(b) 制备所述反应混合物的适合用于 ELISA 的稀释液组;

(c) 用针对 C5a 的一抗和二抗以及显色物质对所述反应混合物的所述稀释液组进行夹心式 ELISA,其中,所述二抗与酶偶联,且所述显色物质是所述酶的底物;和

(d) 根据因使所述显色物质与通过所述二抗结合 C5a 的所述酶接触而获得的颜色变化,确定所述反应混合物中的 C5a 的量。

9. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,用于确定所述抗体制剂基本不产生 C3a 的所述体外血清测定包括以下步骤:

(a) 将一定量的所述抗体制剂添加到 100 μ l 人血清中以产生含有 1.72mg/ml IgM 的反应混合物,并在持续搅拌下将所述反应混合物于 37°C 温育 60 分钟;

(b) 制备所述反应混合物的适合用于 ELISA 的稀释液组;

(c) 用针对 C3a 的一抗和二抗以及显色物质对所述反应混合物的所述稀释液组进行夹心式 ELISA,其中,所述二抗与酶偶联,且所述显色物质是所述酶的底物;和

(d) 根据因使所述显色物质与通过所述二抗结合 C3a 的所述酶接触而获得的颜色变化,确定所述反应混合物中的 C3a 的量。

10. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂包含少于 2% 的 1200kDa 以上的聚集体。

11. 如权利要求 10 所述的抗体制剂,所述抗体制剂包含少于 1.5% 的 1200kDa 以上的聚集体。

12. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,所述制剂的抗补体活性低于 1.0CH50/mg 蛋白。

13. 如权利要求 12 所述的抗体制剂,其中,所述抗补体活性低于 0.75CH50/mg 蛋白。

14. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂的免疫球蛋白含量大于总蛋白含量的 95%。

15. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂在未执行于 40°C 以上的温度进行超过 10 分钟的热处理的步骤的情况下从人血清制得。

16. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂在未执行涉及对所述抗体进行化学修饰或酶修饰的步骤的情况下从人血清制得。

17. 如权利要求 16 所述的抗体制剂,其中,进行化学修饰的所述步骤是使所述抗体与 β -丙内酯接触的步骤。

18. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂通过能够实现无包膜病毒的大于 3log10 的去除的方法制得。

19. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂通过包括以下步骤的方法从人血清制得:

(a) 从人血浆制备血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液;

(b) 将 C7 ~ C9 的羧酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白;

(c) 将沉淀出的蛋白从所述溶液中分离出,以产生含有 IgM 的免疫球蛋白组合物;

(d) 将所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物在 pH 3.5 ~ 4.5 温育,以形成经温育的溶液;

(e) 用 UVC 照射经温育的溶液,从而形成经 UVC 照射的溶液;和

(f) 在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液,从而形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。

20. 如权利要求 19 所述的抗体制剂,其中,所述方法还包括在步骤 (e) 的照射之前对从步骤 (d) 获得的经温育的溶液进行纳米过滤。

21. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,所述抗体制剂能够以 115mg IgM/kg 体重 / 小时施用至食蟹猴,并且不存在与治疗前水平相比超过 10% 的动脉压下降。

22. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,在所述制剂中至少 90% 的抗体具有生物活性。

23. 如前述权利要求中任一项所述的抗体制剂,其中,在适合于确定 Fc 功能的基于风疹抗原的体外测定中,所述抗体制剂的抗体的 Fc 部分的活性等于生物参照制剂的相应活性 $\pm 10\%$ 。

24. 一种从人血清制造前述权利要求中任一项所述的抗体制剂的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 从人血浆制备血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液;

(b) 将 C7 ~ C9 的羧酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白;

(c) 将沉淀出的蛋白从所述溶液中分离出,以产生含有 IgM 的免疫球蛋白组合物;

(d) 将所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物在 pH 3.5 ~ 4.5 下温育,以形成经温育的溶

液；

(e) 用 UVC 照射所述经温育的溶液,从而形成经 UVC 照射的溶液 ;和

(f) 在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液,从而形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。

25. 如权利要求 1 ~ 23 中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂用于医药应用。

26. 如权利要求 25 所述的抗体制剂,所述抗体制剂用于治疗免疫紊乱性疾病或细菌感染。

27. 如权利要求 26 所述的抗体制剂,其中,所述免疫紊乱性疾病是 IgM 缺陷疾病。

28. 权利要求 1 ~ 23 中任一项所述的抗体制剂在制造用于治疗免疫紊乱性疾病或细菌感染的药物中的应用。

29. 一种患者的治疗方法,所述治疗方法包括施用权利要求 1 ~ 23 中任一项所述的抗体制剂。

30. 如权利要求 29 所述的治疗方法,其中,所述患者患有免疫紊乱性疾病或细菌感染。

31. 如权利要求 29 或 30 所述的治疗方法,其中,将所述抗体制剂静脉内施用给所述患者。

抗体制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含 IgM 的抗体（免疫球蛋白）制剂，所述制剂具有特异性补体活化活性但具有低的非特异性补体活化能力。本发明还涉及所述抗体制剂在医药中的应用。

背景技术

[0002] 从人类血浆制备的且适合于静脉内施用的免疫球蛋白组合物在本领域中是已知的，且数十年来在多种疾病的治疗中起着重要作用。免疫球蛋白用于例如治疗人体感染，并且可以分为具有不同生化和生理性质的多种类别。免疫球蛋白 G 参与抵御病毒抗原，而 IgM 则主要在抗细菌和抗毒素的免疫应答中具有活性。

[0003] 免疫球蛋白溶液包含占各种百分比的 IgG、IgA 和 IgM，且不同的制剂具有不同的治疗应用，例如，IgM 百分比较高的制剂用于预防或治疗细菌感染。

[0004] 免疫球蛋白溶液通常从血浆或血清的组分（例如 Cohn 组分）中制得。随后对这些组分进行多个纯化步骤来除去包括病毒、变性蛋白、蛋白酶和脂质在内的污染物。

[0005] 用于组分分离的人类血清采集自数千供体，尽管对来源血浆进行了全面检测，但仍可能含有病原体病毒。因此，为了获得安全的用于医药应用产品，用于使病毒灭活或除去病毒的处理步骤必不可少。用于病毒灭活 / 去除的若干种技术在本领域中是已知的，例如化学处理、UVC 光照射或纳米过滤，实施这些技术是为了确保总体病毒安全性。

[0006] 通过使用生产过程的实验室规模模型验证了这些处理步骤的病毒去除或灭活能力，并且对每个步骤都确定了去除或灭活系数。灭活 / 去除系数的提高为药物产品增添了额外的病毒安全性。现今，来自主管机构的准则要求在制造源自血浆的药物时至少有两个针对有包膜和无包膜的病毒的有效步骤。虽然若干种方法（例如溶剂 / 去垢剂处理、辛酸处理、纳米过滤和热处理）可有效地灭活或除去有包膜病毒，但是仅有几种已知方法可灭活或除去无包膜病毒，例如细小病毒。这些无包膜病毒大部分都非常小，通常会穿过孔径大于 20nm 的纳米过滤器。而该孔径对于直径可高达 30nm 的 IgM 分子而言过小。无包膜病毒可被例如 β -丙内酯等化学物质有效地灭活，但是，这也会产生功能受到破坏的经修饰的免疫球蛋白。另一种有效的处理是 UVC 照射 (EP1842561, CAF-DCF)。然而，已知的溶剂 / 去垢剂处理、辛酸处理和温和热处理对无包膜病毒基本没有效果。

[0007] 如上所述，除了潜在的病毒以外，还有必要除去例如脂质、蛋白酶、蛋白聚集体和变性的免疫球蛋白等其他污染物。为了 (1) 确保产品符合有关病毒污染的生物安全性准则、(2) 在静脉内施用后使患者对产物耐受、(3) 使产品在长期储存过程中稳定（任何残留的蛋白水解活性都可能导致产品在长期储存（例如 2 年）过程中降解）和 (4) 产生所需的化合物混合物 / 药物组合物，除去所有上述污染物是必须的。

[0008] 然而，与此同时，至关重要的是用来除去污染物的纯化步骤不会干扰免疫球蛋白分子，从而尽可能地使这些免疫球蛋白分子保留其正常生物活性并以高产率保留在溶液中。该平衡难以实现，因为许多已知的纯化步骤还对免疫球蛋白特别是 IgM 的活性会有负

面影响；例如，过长时间的 UVC 照射可以使在最终免疫球蛋白溶液中所得到的天然的具有活性的 IgM 的产率降低。这不仅导致最终免疫球蛋白溶液的功效降低，而且还使该溶液在体内的耐受性变差。

[0009] 对患者而言，聚集体和变性的免疫球蛋白（其量可能通过某些纯化步骤增加）尤其是潜在的风险，因为它们的非特异性地激活补体的能力很高，从而在接受这些变性免疫球蛋白的患者中产生严重的副作用。非特异性补体活化是指在特异性抗体-抗原复合物不存在的情况下补体级联反应的启动。应严格避免非特异性补体活化，因为其可以引起不需要的副作用，例如高血压、潮红、头痛、发热、发冷、恶心、呕吐、肌肉痛、呼吸困难和心动过速。另一方面，特异性补体活化合乎需要，其仅在免疫球蛋白已结合其特异性抗原后发生。

[0010] 非特异性补体活化以所谓的抗补体活性 (ACA) 计，ACA 通过《欧洲药典 (European Pharmacopoeia)》中描述的标准化测试来测量。

[0011] 补体系统在对病原体的免疫防御中的作用是公知的。补体系统由约 20 种蛋白组成，这些蛋白依次发生活化。经典补体途径通常需要特异性抗原抗体复合物来激活，而旁路途径可以在无抗体存在的情况下由抗原来激活。补体活化的经典途径和旁路途径都产生蛋白酶-C3 转化酶。C3 转化酶切断并激活补体成分 C3，产生 C3a 和 C3b，并且在 C5 转化酶上引起进一步的断裂和活化事件的级联反应以形成 C5a 和 C5b。C5b 引发膜攻击途径，该途径产生由 C5b、C6、C7、C8 和多聚的 C9 组成的膜攻击复合物。这是补体级联反应的细胞溶解性末端产物，其形成跨膜通道，该通道引起靶细胞（如细菌）的渗透性溶解。

[0012] 补体活化还导致过敏毒素的形成，包括生物活性蛋白 C5a。该过敏毒素是免疫和炎性细胞的有力趋化剂，并且诱导细胞活化并使组胺从肥大细胞中释放出。在过量或不受控制的和/或非特异性的补体活化的情况下，C5a 的过度产生能够引起对患者有害的效果。

[0013] C5a 是有效的白细胞化学吸引剂，在补体活化的部位引起白血球、尤其是中性粒细胞的积累。C5a 激活白血球，而且是强效的炎症介质。尽管这些功能在特异性抗体-抗原复合物的反应过程中有益，但由于潜在的副作用，必须避免 C5a 的所有非特异性产生。

[0014] 因为与 IgG 制剂相比 IgM 抗体容易在溶液中聚集，所以对于 IgM 免疫球蛋白制剂（即，包含至少 5%IgM 的制剂）而言，非特异性补体活化特别成问题。IgM 制剂难以稳定化，尤其是在其相对于血浆浓度有所富集和储存在液体溶液中时。还已知 IgM 是补体的强力活化剂；与抗原结合的单个分子即可激活补体。这与 IgG 不同，两个以上的 IgG 分子必须在彼此近距离联结的情况下结合抗原才能激活补体。

[0015] 此外，含 IgM 的免疫球蛋白制剂所治疗的主要适应证是细菌感染和败血症。由于这些患者已经患有高血压，所以非特异性补体活化和 C5a 的额外的不需要的产生将使患者状况的临床恶化。因此，据已有描述，难以将 IgM 制剂制备成用于静脉内应用。

[0016] 本领域中描述了用于从人血浆中制造含 IgM 的免疫球蛋白制剂的若干种方法。

[0017] 已使用经典的 Cohn 血浆组分分离法或其公知的变形方法（例如 Cohn/Oncley, Kistler/Nitschmann）对人 IgM 溶液进行了初步纯化。使用冷乙醇沉淀法，将 IgM 组分回收在组分 III 或组分 I/III（亦称为 B 或 B+I）中。已描述了用来从组分 III 或 I/III 开始对富集有 IgM 的蛋白溶液进行纯化的方法。EP0013901 描述了从组分 III 开始的纯化方法，包括使用辛酸的步骤、使用 β -丙内酯的步骤和使用阴离子交换树脂的吸收步骤。该方法用于生产 Pentaglobin®——迄今为止唯一的市售静脉内 IgM 产品。 β -丙内酯是为了使潜

在的病毒灭活而用于灭菌步骤的公知化学物质。由于 β -丙内酯是可引起蛋白化学修饰的反应性很强的物质,所以免疫球蛋白的抗病毒活性和抗菌活性也会有大量损失。另一方面,与未经化学修饰的免疫球蛋白相比,该化学修饰产生了降低的抗补体活性。EP0352500 描述了通过以下方法制备具有降低的抗补体活性的用于静脉内应用的 IgM 浓缩物:使用阴离子交换层析、 β -丙内酯、UVC 光照射和在升高的温度(40°C~60°C)下进行温育的步骤。用该方法制造的制剂因所述化学修饰而在液体溶液中仅在有限的时间内保持稳定。IgM 的浓度超过总免疫球蛋白含量的 50%。

[0018] 在 EP0413187(Biotest,生物测试股份公司)和 EP0413188(Biotest,生物测试股份公司)中,已描述了未经 β -丙内酯化学修饰的 IgM 富集的蛋白溶液的制备。这些方法包括从 Cohn 组分 III 或 II/III 开始对适合的蛋白溶液进行辛酸处理和阴离子交换层析。在专利 EP0413187(Biotest,生物测试股份公司)中,辛酸处理通过搅拌 15 分钟来进行,以除去存在于 Cohn 组分 III 中的脂质。

[0019] EP0413187 所述的制剂具有低抗补体活性,即 0.6~0.8CH50/mg 蛋白,但是必须对其进行稳定化和用 β -丙内酯进行病毒灭活。根据针对免疫球蛋白的 EP 专论,认为低抗补体活性为 \leq 1CH50/mg 蛋白。

[0020] EP0413188B1(Biotest,生物测试股份公司)描述了为了降低抗补体活性而使用阴离子交换层析来制备用于静脉内施用的富集有 IgM 的制剂。此外,还描述了在 pH 4~4.5 且在 40°C~60°C、优选 50°C~54°C 进行热处理以降低抗补体活性。必须将该制剂冻干以确保该制剂持续数月的稳定性。未能显示出液体溶液的长期稳定性。

[0021] M. Wickerhauser 等的“Large scale preparation of macroglobulin(巨球蛋白的大规模制备)”(*Vox Sang* 23, 119-125(1972)) 显示出,通过 PEG 沉淀分离出的 IgM 制剂在标准补体结合试验中具有高抗补体活性(ACA),并且通过将该 IgM 制剂在 pH 4.0 下于 37°C 温育 8 小时并随后将 pH 重新调节至中性,使该 ACA 活性下降 10 倍。未说明该 10 倍下降是否足以保证静脉内耐受性。其作者并未评估他们的 IgM 浓缩物的特异性补体活化潜力,也未在任何动物或人模型中评估安全性。

[0022] 另一种方法描述了在 pH 4.0~5.0 和在 40°C~62°C、优选 45°C~55°C 提高利用对 IgM 制剂的温和热处理(EP0450412, Miles)来减少非特异性补体活化。在该专利申请中,将辛酸添加到 Cohn 组分 III 悬浮液中,从而通过离心除去前激肽释放酶活化剂和脂蛋白。但是,该温和热处理会导致 IgM 的抗原决定簇部分丢失。这可能会使产生新生抗原的风险升高,从而导致人体内免疫原性增加或活性丧失。

[0023] EP0835880(US 6136312, ZLB)中已描述了在辛酸沉淀步骤后使用蛋白酶处理(例如,用胃蛋白酶)来制备用于静脉内应用的含 IgM 的蛋白溶液。蛋白酶处理使免疫球蛋白分子发生部分片段化,从而破坏了 Fab 和 Fc 部分的完整功能活性。因此,经蛋白酶处理的免疫球蛋白不能认为是未经修饰的免疫球蛋白。此外,该制备方法会产生约 5% 的分子量小于 100kD 的片段。

[0024] 用来进行辛酸处理的已描述的方法(EP0413187 和 EP0835880)的缺点在于,辛酸处理在除去和灭活无包膜病毒方面并不有效,且不会除去几乎全部的蛋白水解活性。在 EP 0345543(Bayer, Miles)中,公开了用于治疗用途的含有至少 33%IgM 的高度浓缩的 IgM 制剂,该制剂基本不含同种凝集素效价(isoagglutinin titre)。在该专利申请中,通过添加

辛酸来进行辛酸沉淀,并通过 Synsorb 亲和层析来除去同种凝集素。最终制剂必须冷冻干燥。

[0025] 总之,如果利用化学手段或酶手段对免疫球蛋白进行修饰,和 / 或提高层析进一步纯化,和 / 或进行温和热处理,则可以制备出具有低抗补体活性的含 IgM 的制剂。然而,这些方法具有以下缺点:缺少病毒去除 / 病毒活化(因此缺乏病毒安全性),减少了天然形态的免疫球蛋白分子的量,和 / 或残余的抗补体活性。因此,仍有需要提供改善的适合于人静脉内施用的含 IgM 的免疫球蛋白制剂。

发明内容

[0026] 在第一方面,本发明提供一种适合于人静脉内施用的抗体制剂,所述抗体制剂包含 IgG 抗体、IgA 抗体和占抗体总量至少 5 重量%的 IgM 抗体,其中,所述制剂从人血浆制得,其中,所述抗体制剂具有特异性补体活化活性,并且其中,在适合于确定所述抗体制剂的非特异性地激活补体的能力的用人血清进行的体外测定中,所述抗体制剂基本不产生 C5a 且 / 或基本不产生 C3a。

[0027] 本申请人出人意料地发现,从人血清制造 IgM 抗体制剂是可行的,所述抗体制剂具有特异性补体活化能力且基本不具有非特异性补体活性。该产品是优越的,因为其在静脉内施用后在减少了与非特异性补体活化相关的不良副作用(例如高血压)的同时保持了产品的功效。

[0028] 本发明的另一方面提供一种从人血浆制造本发明的抗体制剂的方法,所述方法包括以下步骤:

[0029] (a) 从人血浆制备血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液;

[0030] (b) 将 C7 ~ C9 的羧酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白;

[0031] (c) 将沉淀出的蛋白从所述溶液中分离出,以产生含有 IgM 的免疫球蛋白组合物;

[0032] (d) 将所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物在 pH 3.5 ~ 4.5 下温育,以形成经温育的溶液;

[0033] (e) 用 UVC 照射所述经温育的溶液,从而形成经 UVC 照射的溶液;和

[0034] (f) 在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液,从而形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。

[0035] 申请人出人意料地发现,在将免疫球蛋白溶液与羧酸混合的步骤中使用振动搅拌器极其有利。该方法步骤使得可以以更有效地除去不需要的蛋白(包括蛋白酶),并且产生了对用来制造免疫球蛋白药物的下游加工步骤更适合的中间产物;该中间产物使得这些下游加工步骤效率更高。因此,下游加工步骤可以较不严厉,从而有助于得到能够特异性地激活补体且基本不能非特异性地激活补体的本发明的抗体制剂。

[0036] 特别而言,从步骤(c)获得的含有 IgM 免疫球蛋白的组合物可以与其他处理步骤组合,例如用温和酸条件进行的处理和用 UVC 照射进行的处理,从而产生适合于静脉内施用的含有 IgM 的免疫球蛋白产品或抗体制剂,且所述免疫球蛋白产物或抗体制剂具有以下有利性质:具有低的抗补体活性;保留了高水平的天然的具有活性的 IgM;病毒安全,且因此适合于人静脉内施用。此前,未能取得用本文所述的方法所取得的病毒安全水平。其他

优势是：具有低的蛋白水解活性（因此在长期储存过程中稳定），和未经化学修饰。

[0037] 另外，本发明还提供用于医药应用的本发明的抗体制剂。在一个实施方式中，所述抗体制剂用于治疗免疫紊乱性疾病和细菌感染。

[0038] 本发明的另一方面提供一种治疗方法，所述方法包括向患者施用本发明的抗体制剂。

[0039] 现将结合附图仅以实例方式来更详细地描述本发明。

[0040] 图 1 提供了能够用来形成本发明的适合于静脉内施用的抗体制剂的各步骤的总览。突出显示了采用振动混合器设备的辛酸处理步骤、pH4 处理和 UVC 处理。起始材料从人血浆的标准冷乙醇沉淀过程获得。

[0041] 图 2 提供了显示出在与 IgM 制剂温育后的人血清中发现的时间相关的平均 C5a 浓度的图。

[0042] 图 3 提供了显示出在与 IgM 制剂温育后的人血清中发现的时间相关的平均 C3a 浓度的图。

具体实施方式

[0043] 抗体制剂

[0044] 如上所述，本发明提供一种适合于人静脉内施用的抗体制剂，所述抗体制剂包含 IgG 抗体、IgA 抗体和占抗体总量至少 5 重量%的 IgM 抗体，其中，所述制剂从人血浆中制得，其中，所述抗体制剂具有特异性补体活化活性，且其中，在适合于确定所述抗体制剂的非特异性地激活补体的能力的用人血清进行的体外测定中，所述抗体制剂基本不产生 C5a 且 / 或基本不产生 C3a。

[0045] 本发明的抗体制剂包含人血浆蛋白，所述人血浆蛋白中至少 90%、优选至少 95% 是由免疫球蛋白（多克隆抗体）构成。特别而言，所述制剂包含免疫球蛋白 IgG、IgA 和 IgM，其中，免疫球蛋白的至少 5% 是 IgM。IgG、IgA 和 IgM 免疫球蛋白的量可以用浊度测定法或用《欧洲药典》2.7.1 所述的免疫沉淀来确定。

[0046] 所述抗体制剂更优选包含至少 10% 的 IgM 且最优选包含至少 15% 的 IgM。关于 IgG 和 IgA，所述抗体制剂优选包含大于 5% 的 IgA 和 / 或大于 40% 的 IgG。所有百分比是占抗体总量的百分比（例如，IgM 的克数 / (IgG 的克数 + IgA 的克数 + IgM 的克数) × 100）。

[0047] 通过评估免疫球蛋白分子的 Fc 部分的功能活性来确定抗体制剂具有特异性补体活化活性（即，在抗原存在时激活补体级联反应的能力）的方法在本领域中是已知的。特别而言，按照欧洲准则 ICH S6 (CPMP/ICH/302/95)，目前的《欧洲药典》方法描述了适合的方法，其采用风疹抗原。关于特异性补体活化的其他细节在下文参照生物活性给出。

[0048] 在适合用来确定人正常血清（例如，来自健康的人的血清）中的非特异性补体活化的体外测定中，所述抗体制剂基本不引起非特异性补体活化（即，在抗原不存在时由免疫球蛋白引起的补体级联反应的活化）。特别而言，该测定能够确定在抗原不存在时该测定中所产生的 C5a 和 / 或 C3a 的量。如上所述，补体的活化导致了 C5a 和 C3a 的产生。由于这两种蛋白都参与补体系统的末端途径（而不是参与经典 / 凝集素途径或旁路途径），它们对确定补体活化而言特别有效。

[0049] 当在抗原不存在的情况下在对人血清的适合的体外测定中使用，所述抗体制剂

基本不产生 C5a 和 / 或基本不产生 C3a。在优选的实施方式中,经调整 IgM 浓度为 1.72mg/ml 的所述抗体制剂在 60 分钟的测定后产生少于 200ng/ml 的 C5a,并且 / 或者经调整 IgM 浓度为 1.72mg/ml 的所述抗体制剂在 60 分钟的测定后产生少于 6000ng/ml 的 C3a。

[0050] 作为另一选择或作为补充,在所述测定中,所述抗体制剂产生的 C5a 和 / 或 C3a 的量等于仅用人血清的相同测定中所产生的 C5a 和 / 或 C3a 的量 $\pm 70\%$ 。这优选是在 60 分钟的测定后发生。

[0051] 适合的测定在本领域中是已知的。在优选实施方式中,该测定包括以下步骤:

[0052] (a) 将一定量的抗体制剂添加到 100 μ l 人血清中以产生含有 1.72mg/ml IgM 的反应混合物,并在持续搅拌下将该反应混合物于 37°C 温育 60 分钟;

[0053] (b) 制备所述反应混合物的适合用于 ELISA 的稀释液组;

[0054] (c) 用针对 C5a 或 C3a 的一抗和二抗以及显色物质对所述反应混合物的稀释液组进行夹心式 ELISA,其中,所述二抗与酶偶联,且所述显色物质是所述酶的底物;和

[0055] (d) 根据因使所述显色物质与通过所述二抗结合 C5a 或 C3a 的所述酶接触而获得的颜色变化,确定所述反应混合物中的 C5a 或 C3a 的量。

[0056] 在该 ELISA 中,使稀释液组与包被有所述一抗的检测板中的孔接触。在温育后,清洗这些孔以除去稀释液样品,随后在这些孔中温育二抗并使之结合与一抗结合的任何 C3a/C5a,这是因为所述二抗具有的对 C3a/C5a 的表位与一抗的不同。在进一步清洗除去未结合的二抗后,温育色原并使之与偶联至二抗的酶反应。所得到的颜色变化可以用光度计通过光密度确定来测量,该颜色变化与稀释液组中存在的 C5a/C3a 的浓度成正比。

[0057] 特别而言,在步骤 (a) 中添加的抗体制剂的量适合于在反应混合物中产生 1.72mg/ml 的 IgM 浓度。步骤 (c) 和步骤 (d) 可以包括:(i) 将反应混合物的稀释液组添加到包被有针对 C3a/C5a 的一抗(即“捕获抗体”)的检测板的孔中;(ii) 温育该板以使任何 C3a/C5a 与一抗结合;(iii) 清洗该板以除去稀释液中未与一抗结合的任何物质;(iv) 添加亦与 C3a/C5a 结合的酶联二抗(检测抗体);(v) 温育该板以使任何二抗与 C3a/C5a 结合;(vi) 清洗该板以除去未结合的二抗;(vii) 添加可被所述酶转化为颜色信号的化学物质;和 (viii) 测量该板的孔的吸收来确定 C3a/C5a 的存在和量。

[0058] 夹心式 ELISA 根据本领域中已知的方法和 / 或根据制造商的使用说明用市售的试剂盒来进行。适合且特别优选的市售酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒为 Quidel MicroVue C5a Plus EIA 试剂盒 ;A025 和 Quidel Micro Vue C3a Plus EIA 试剂盒 ;A032。

[0059] 在本发明的另一个实施方式中,抗体制剂包含少于 2%、优选少于 1.5% 的 1200kDa 以上的聚集体。这是指占免疫球蛋白含量的百分比。聚集体的量可以通过高效尺寸排阻色谱法 (HPSEC) 来确定。这可以用本领域中已知的方法来执行。

[0060] 作为另一选择或补充,可以将抗体制剂的基本不产生非特异性补体活化的能力定义为该制剂的抗补体活性低于 1.0CH₅₀/mg 蛋白、优选低于 0.75CH₅₀/mg 蛋白。根据《欧洲药典》中所描述的方法(方法 2.6.17,欧洲药典,第 6 版,2008)来进行确定此范围的抗补体活性的测定。该测定的进一步的细节在下文的测定部分给出。

[0061] 在优选实施方式中,在未执行对抗体进行化学修饰或酶修饰的步骤的情况下,从人血清制备了抗体制剂,即,从人血清制造抗体制剂的方法不包括使抗体与会对该抗体进行酶修饰或化学修饰的试剂接触的步骤。特别而言,该方法不包括使抗体接触 β -丙内酯

(其引起抗体的化学修饰)或不包括使抗体接触胃蛋白酶(其会使抗体发生酶促性断裂)。

[0062] 作为另一选择或补充,在未执行将抗体加热至 40℃ 以上的温度持续 10 分钟以上的步骤的情况下,从人血清制备了抗体制剂。特别而言,已知加热步骤能够使免疫球蛋白变性且引起免疫球蛋白聚集。

[0063] 进一步优选的是,所述抗体制剂通过以下方法制备:所述方法能够实现无包膜病毒的大于 3log₁₀、优选大于 4log₁₀、最优选大于 5log₁₀ 的去除,由此使所述抗体制剂病毒安全。因此,所述抗体制剂比现有技术的抗体制剂更安全,特别是就有活性的无包膜病毒(例如细小病毒)而言尤其如此。由此得到了基本不含病毒、特别是基本不含无包膜病毒的抗体制剂。另外,本发明的方法能够在不显著影响抗体制剂的抗补体活性或活性 IgM 的量的情况下实现所述水平的病毒颗粒去除/灭活。

[0064] 特别而言,所述抗体制剂能够通过包括以下步骤的方法从人血浆制得:

[0065] (a) 从人血浆制备血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液;

[0066] (b) 将 C7 ~ C9 的羧酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白;

[0067] (c) 将沉淀出的蛋白从所述溶液中分离出,以产生含有 IgM 的免疫球蛋白组合物;

[0068] (d) 将所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物在 pH 3.5 ~ 4.5 下温育,以形成经温育的溶液;

[0069] (e) 用 UVC 照射所述经温育的溶液,从而形成经 UVC 照射的溶液;和

[0070] (f) 在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液,从而形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。

[0071] 上述方法优选还包括在步骤 (e) 的照射之前对从步骤 (d) 获得的经温育的溶液进行纳米过滤。该制造方法的进一步的细节和优选方面在以下部分描述。

[0072] 在本发明的另一优选实施方式中,能够以 115mg IgM/kg 体重/小时将抗体制剂施用至食蟹猴,且不存在与治疗前水平相比 10% 以上的动脉压下降。如上所述,非特异性补体活化引起高血压,因此动脉压缺乏显著变化表明在健康的猴体内基本没有出现补体的非特异性活化。动脉压可以通过将压力导管经由右股动脉插入下腹主动脉中来测量。

[0073] 在优选实施方式中,抗体制剂还包含针对肺炎球菌糖 (Pneumococcus saccharide)、大肠杆菌、粪肠球菌、白色念珠菌和衣原体属中的一种或多种的抗体。

[0074] 在另一优选实施方式中,抗体制剂中至少 90% 的抗体具有生物活性。术语“具有生物活性”是指制剂中的抗体处在天然形态,且特别而言能够因特异性地结合抗原而激活补体级联反应。抗体制剂的生物活性能够基于本领域已知的用来确定抗体效价/结合活性和 Fc 完整性/功能的测定来估算。特别而言,在适合于确定 Fc 功能的基于风疹抗原的体外测定中,抗体制剂的抗体的 Fc 部分的活性等于生物参照制剂 (Biological Reference Preparation) 的相应活性 ±10%、更优选 ±5%。

[0075] 生物参照制剂被国际医药和保健团体采用,其有助于保证医药产品的一致性。因此,适合用于上述测定的生物参照制剂在本领域中是已知的和可获得的(例如,免疫球蛋白生物参照制剂 (Immunoglobulin Biological Reference Preparation, 批次号:3))。特别而言,所述测定可以按照国际上承认的《欧洲药典》2.7.9 “用于免疫球蛋白的 Fc 功能的测试”(当前版本,2011 年 4 月)来进行,其中采用了人类免疫球蛋白生物参照制剂(批次

号:3) 作为对照,并以该生物参照制剂为背景确定了抗体制剂的 % 活性。该测试包括以下步骤:(i) 对经鞣酸处理的 O 型人红细胞加载风疹病毒抗原,以产生抗原包被的血细胞;(ii) 将一定量的抗体制剂与该血细胞一起温育;添加豚鼠补体以启动补体引发的血细胞溶解;(iii) 通过 541nm 处的吸收值随时间的变化来测量溶血动力学;(iv) 使用单位时间内的吸收值最大变化来评估抗体制剂中的抗体的功能。

[0076] 该抗体制剂的蛋白水解活性还优选低于现有技术中描述的抗体制剂。特别而言,当该制剂储存在 2°C ~ 8°C 下时,在其中检测不到蛋白水解活性。蛋白水解活性可以用本领域中已知的标准化测试方法来测量,例如使用下文实施例 6 中所述的显色底物的方法。

[0077] 本发明的抗体制剂还可以包含稳定剂,例如甘氨酸。

[0078] 与本领域已知的制剂一样,本发明的抗体制剂可以储存在 5±3°C 下。然而,由于用本发明的方法进行了高效的纯化,该抗体制剂的稳定性极佳。液体形式的最终产品在 2°C ~ 8°C 下稳定至少 3 个月、优选至少 6 个月且最优选至少两年,这意味着:在 HPSEC 测定中 IgM 的片段化或聚合不超过 5%,蛋白水解活性没有增加,针对大肠杆菌的 IgM 抗体活性和针对肺炎球菌糖的 IgM 抗体活性的下降不超过 25%,且抗补体活性的增加不超过 25%,保持低于 1CH50/mg 蛋白。此外,用相同的标准估算,通过本发明的方法产生的液体形式的最终产品在室温 (23°C ~ 27°C) 下稳定至少 3 个月、优选至少 6 个月且最优选至少一年。

[0079] 制造抗体制剂的方法

[0080] 如上所述,本发明提供从包含免疫球蛋白的血浆组分制备含 IgM 的抗体制剂。特备而言,本发明提供一种从人血浆制造本文所述的抗体制剂的方法,所述方法包括以下步骤:

[0081] (a) 从人血浆制备血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液;

[0082] (b) 将 C7 ~ C9 的羧酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白;

[0083] (c) 将沉淀出的蛋白从所述溶液中分离出,以产生含有 IgM 的免疫球蛋白组合物;

[0084] (d) 将所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物在 pH 3.5 ~ 4.5 下温育,以形成经温育的溶液;

[0085] (e) 用 UVC 照射所述经温育的溶液,从而形成经 UVC 照射的溶液;和

[0086] (f) 在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液,从而形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。

[0087] 适合于制备药物免疫球蛋白组合物的血浆组分及其制造方法在本领域中是公知的。血浆组分优选为沉淀的血浆组分,最优选为通过 Cohn 组分分离方法或其公知的变形方法(例如 Kistler-Nitschmann)获得的沉淀的血浆组分。最优选的是,所述组分为冷乙醇组分分离产生的组分 I/III 或组分 III(亦称为组分 B+I 或组分 B)。血浆组分的免疫球蛋白优选包含至少 5% 的 IgM。

[0088] 步骤 (a) 包括提供血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液。在许多情况下,包含免疫球蛋白的血浆组分会是固体或半固体形式。因此,该步骤的目的是确保或使得血浆组分的蛋白进入溶液,从而使得所述蛋白处在适合于在步骤 (b) 中与羧酸混合的状态。该步骤可以包括将血浆组分与适合的缓冲液混合。所述缓冲液优选为低摩尔浓度(即,低于 1M)且 pH 为 4.5 ~ 5.5,例如,pH 为 5.05±0.1 的 0.1M 乙酸钠缓冲液。混合可以使用桨叶混合器

或振动搅拌器来完成。

[0089] 在步骤 (b) 中,使用振动搅拌器将步骤 (a) 中形成的溶液与 C7 ~ C9 的羧酸混合,从而沉淀出污染性蛋白(例如,蛋白酶、病毒等)。所述羧酸可以具有支链和/或可以包含不会显著改变步骤 (b) 的效果的取代基。所述羧酸优选为辛酸。该酸优选以至少 0.075kg/kg 血浆组分的浓度添加,最多以 0.2kg/kg 的浓度添加。该酸更优选以 0.8kg/kg ~ 0.15kg/kg 血浆组分添加,最优选以 0.09kg/kg ~ 0.13kg/kg 添加。可以用任何便利的摩尔浓度的酸来提供正确的浓度。

[0090] 可以使用适合用于化工/制药工业的任何类型的市售振动搅拌器。适合的振动搅拌器的实例可以从 Graber+Pfenninger GmbH 获得。特别而言,“Labormodell Typ 1”振动混合器可以用于实验室规模的实验,而“Industriemixer Typ 4”可以用于生产规模的制备。可以根据制造商的操作说明来使用振动混合器,特别是在被制造商描述为适合于混合含蛋白的溶液的设置下进行使用。例如,振动混合器通常可以在低于 100Hz 下以小于 10mm 的振幅工作,例如,本发明人在使用 230V 电源时在 50Hz 下使用“Labormodell Typ1”进行了实验室规模的振动混合。混合过程的振动振幅为 0 ~ 3mm 不等,而对于 IgM 的制备,优选使用 3mm。使用了直径为 23mm ~ 65mm 的搅拌器板来进行实验室规模的实验。对于生产规模,使用了直径为 395mm 的搅拌器板(孔直径为 13.5mm 和 16mm)。

[0091] 在步骤 (b) 中,经混合的溶液的 pH 优选为 4.5 ~ 5.5,更优选为 4.8 ~ 5.3。该步骤可以在乙酸钠缓冲液中进行,例如,用约 0.1M 的乙酸钠缓冲液。执行步骤 (b) 的温度优选为 10°C ~ 35°C,更优选为 14°C ~ 30°C。

[0092] 对使用振动搅拌器的混合时间没有特别限制,但优选为 30 分钟至 3 小时,更优选为 40 分钟 ~ 110 分钟。低于 30 分钟的温育时间可以降低病毒灭活水平。

[0093] 在步骤 (b) 的一个实施方式中,将磷酸三钙与步骤 (b) 中的溶液混合。优选其以 0.01kg/kg ~ 0.02kg/kg 血浆组分添加(在血浆组分为固体或半固体形式时)。磷酸三钙可以与羧酸同时添加、分开添加或依次添加。在优选实施方式中,磷酸三钙在添加羧酸后至少 20 分钟添加。

[0094] 在步骤 (c) 中,将在步骤 (b) 中沉淀出的污染性蛋白从溶液中分离出,从而产生含有 IgM 的免疫球蛋白组合物(即,含免疫球蛋白的溶液)。对该分离步骤没有特别限制,可以用本领域中已知的任何适合的方法来执行该分离步骤。然而,该分离步骤优选使用过滤,更优选使用超滤来执行,因此,步骤 (c) 的产物是经过滤的溶液。

[0095] 如上所述,本发明的方法在生成方面具有优势,因为其显示出更高效地沉淀出了污染性蛋白,且步骤 (c) 因此更容易进行。当对步骤 (b) 产生的混合物进行分离时,获得了透明清晰的溶液,即含 IgM 的免疫球蛋白组合物。因此过滤更快且更容易。

[0096] 需要进一步的加工步骤 (d) ~ (f) 来将从步骤 (c) 获得的含 IgM 的免疫球蛋白组合物转化为适合于静脉内施用的抗体制剂。

[0097] 步骤 (d) 包括用温和酸条件处理从步骤 (c) 获得的含有 IgM 的免疫球蛋白组合物,步骤 (e) 包括对经酸处理的组合物进行 UVC 照射以形成经 UVC 照射的溶液,步骤 (f) 包括在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液以形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。

[0098] 在用温和酸条件进行处理时,在 pH 为 3.5 ~ 4.5、优选为 3.8 ~ 4.2 下温育从步骤 (c) 获得的含 IgM 的免疫球蛋白组合物,从而形成经温育的溶液。温和酸条件可以通过

向含 IgM 的免疫球蛋白组合中添加适合的酸来获得,例如,可以通过添加 0.2M 的 HCl 来调节 pH。

[0099] 该温育步骤优选在 32°C ~ 42°C 下、更优选在 35°C ~ 39°C 下进行。温育时间优选为 2 小时至 24 小时,更优选为 9 小时至 16 小时。

[0100] 在照射步骤中,对于从上述温和酸处理中获得的经温育的溶液用 UVC 光进行处理,从而形成经 UVC 照射的溶液。该步骤可以使用市售的设备来进行,例如 UViviatec® 设备 (Bayer Technology Services)。为了使潜在的病毒和蛋白酶进一步灭活,优选以 200J/m² ~ 500J/m²、更特别以 200J/m² ~ 300J/m² 在 254±10nm 处理所述经温育的溶液。已注意到,通常要求的在温和条件下的 UVC 处理仅对通过振动混合进行的辛酸处理后本发明所获得的水澄清滤液可行。标准搅拌技术所通常得到的更乳白或更不透明的溶液会需要更长的照射时间,这将导致 IgM 活性的更多变性及更低的病毒灭活率。

[0101] 在步骤 (f) 中,在无菌条件下将经照射的溶液过滤,从而形成适合于人静脉内施用的抗体制剂。所述过滤优选为纳米过滤,更优选为通过孔径为 40nm ~ 50nm 的过滤器进行的过滤。

[0102] 除了温和酸处理、UVC 照射和过滤步骤外,用来获得静脉内施用的免疫球蛋白制剂的额外步骤还可以可选地包括一个或多个进一步的过滤步骤。在一个实施方式中,可以使处理中的蛋白溶液吸收到 DEAE- 交联葡聚糖凝胶上,随后通过深度过滤使之与交联葡聚糖凝胶分离。例如,可以进一步在 pH 5.8 下以 75mg/kg 蛋白 DEAE 交联葡聚糖凝胶对所述蛋白溶液进行分批吸收,从而除去不需要的伴随性血浆铜蓝蛋白。

[0103] 在特别优选的实施方式中,对从温和酸处理中获得的经温育的溶液进行 DEAE- 交联葡聚糖凝胶吸附,随后通过深度过滤使之与交联葡聚糖凝胶分离,然后进行 UVC 照射处理。

[0104] 在另一个实施方式中,处理中的免疫球蛋白溶液可以通过纳米过滤器来过滤。在处理过程中的各个阶段,可以使用孔径为 75±5nm ~ 35±5nm 的过滤器或具有 75nm ~ 35nm 标称孔径的过滤器 (例如 Pall Ultipor DV50)。(举例而言,50nm 的标称孔径意味着对大小为 50nm 以上的病毒的截留率 ≥ 4log₁₀)。在优选实施方式中,使从上文所述的 DEAE- 交联葡聚糖凝胶步骤中获得的溶液过滤通过 0.2 μm 过滤器,然后再进行 UVC 照射。

[0105] 由上述方法获得的最终抗体制剂 (即,经处理的含 IgM 的免疫球蛋白溶液) 可以直接在无菌条件下填充到容器中。作为另一选择,可以将该抗体制剂配制在 pH 为 4 ~ 5.5、优选为 4.1 ~ 4.5 的含甘氨酸的缓冲液中。还可以将该抗体制剂稀释至蛋白浓度为 40g/L ~ 80g/L、优选为 55g/L ~ 70g/L。应注意到,也可以用公知的方法 (例如阴离子交换层析) 来富集抗体制剂中的 IgM 含量。

[0106] 如上文所示,上述方法实现了对病毒颗粒的更高水平的灭活和去除,尤其是对抗性非常高的无包膜病毒 (例如细小病毒) 尤其如此,这些病毒通常不易受到辛酸处理的影响。此外,与常规的搅拌相比,实现了改善的蛋白水解活性去除。这些特征是在保持高产率的未经化学修饰的 IgM 的同时获得的。上述发现与下述常规观点相反:辛酸处理并不是针对无包膜病毒的有效步骤,且改善的病毒安全性必须通过用更严厉的方法 (例如 β-丙内酯处理) 使病毒灭活来实现。此外,为人熟知的是,提高例如辛酸的浓度来完全除去蛋白水解活性会导致 IgM 的大量损失。

[0107] 所述方法的结果通过使用振动模式的混合设备与辛酸处理结合而获得。这特别出人意料,因为已知的是 IgM 非常易受剪切应力的影响,这种剪切应力会导致不合需要的高抗补体活性。因此,不会想到使用振动混合器来制备 IgM 组合物,且不会预料到在处理含 IgM 的溶液期间使用振动混合时会产生如此有利的效果。

[0108] 此外,使用所述方法,在使用振动混合设备时增强了通过步骤 (c) 所实现的分离,例如,通过过滤从步骤 (b) 获得的经辛酸处理的溶液来进行的澄清化。更容易地实现了分离,从而减少了处理时间和制造成本,且步骤 (c) 产生了清澈的溶液,这为下游加工提供了优势。通过对经辛酸处理的含 IgM 溶液的搅拌后产物进行过滤而得到的常规溶液呈乳白色或不透明。

[0109] 对从步骤 (c) 获得的含 IgM 的组合物优选进行用温和酸条件 (例如, pH4) 处理和 UVC 照射步骤,从而进一步改善病毒安全性并使最终产品稳定化。由于对从步骤 (c) 获得的含 IgM 的免疫球蛋白组合物的澄清化有所增强,因此可以降低 UVC 的必需照射时间,从而使无包膜病毒的病毒灭活程度大于 3 或 4log₁₀。这在 UVC 处理过程中产生了更高产率的天然的具有活性的 IgM。

[0110] 出人意料的是,这些步骤产生了含有未经化学修饰和酶修饰的 IgM 的溶液,所述溶液具有更高产率的天然的具有活性的 IgM,具有低的抗补体活性和低蛋白水解活性,且具有高抗细菌和抗病毒活性,具有关于有包膜病毒和无包膜病毒的优异的病毒安全性;这对于静脉内施用的药物而言是关键特征。此外,经处理的含 IgM 溶液具有改善的长期稳定性,其在 2°C ~ 8°C 下在液体溶液中持续超过 12 个月均非常稳定。

[0111] 医药应用

[0112] 本发明的抗体制剂适合于医药应用,并且可以用于治疗免疫紊乱性疾病和感染,特别是 IgM 缺陷疾病和细菌感染。与多价免疫球蛋白 G 制剂相比,用于静脉内施用的富集有人 IgM 的多价免疫球蛋白制剂包含更高的针对临床相关的革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌的抗体效价、更高的针对革兰氏阴性细菌的内毒素和革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌的外毒素的抗体效价。

[0113] 特别而言,本发明的抗体制剂适合于向患者静脉内施用。

[0114] 本发明还提供患者的治疗方法,所述治疗方法包括向该患者施用本发明的抗体制剂的步骤。特别而言,所述患者可以患有免疫紊乱性疾病或细菌感染。在优选实施方式中,静脉内施用所述抗体制剂。

[0115] 现将仅以示例方式来进一步描述本发明。

[0116] 实施例

[0117] 测定方法

[0118] 通过对 IgM 浓缩物进行 HPLC 来确定的分子大小分布

[0119] 可以使用以下方法来确定抗体制剂中的 % 聚集体 (如在实施例 8 所使用的)。

[0120] 测试溶液 :注入约 50g/L 的未稀释的样品,进样体积为 10 μ l (约 500 μ g 蛋白加载量)。

[0121] 参照溶液 :人免疫球蛋白 (例如, Intratect, Biotest AG, 生物测试股份公司)

[0122] 标准溶液 :Bio-Rad 凝胶过滤标准样 (产品号 151-1901)

[0123] 柱 :

- [0124] - 尺寸 : $l=30\text{mm}$, $\varnothing=7.8\text{mm}$,
- [0125] - 固定相 : Tosoh Bioscience TSK-Gel G4000SWXL, 适于相对分子质量为 $20000\text{Da} \sim 7 \times 10^6\text{Da}$ 的球蛋白的分级。
- [0126] 流动相 : 将 4.873g 二水合磷酸氢二钠、 1.741g 一水合磷酸二氢钠、 11.688g 氯化钠和 50mg 叠氮化钠溶解在 1 升水中。
- [0127] 流速 : 0.5ml/分钟
- [0128] 检测 : 在 280nm 使用分光光度计。在用参照溶液获得的色谱图中, 按照以下方案对色谱图进行积分, 并鉴定出各个峰 :
- [0129] • 多聚体 ($>1200\text{kD}$), 10 分钟 ~ 13 分钟
- [0130] • IgM ($1200\text{kD} \sim 750\text{kD}$), 13 分钟 ~ 19 分钟
- [0131] • 二聚体 / IgA ($750\text{kD} \sim 350\text{kD}$), 19 分钟 ~ 20 分钟
- [0132] • IgG ($350\text{kD} \sim 100\text{kD}$), 20 分钟 ~ 26 分钟
- [0133] • 片段 ($<100\text{kD}$), 26 分钟 ~ 40 分钟
- [0134] • 片段 ($<100\text{kD}$), 26 分钟 ~ 40 分钟
- [0135] 对非特异性补体活化的确定
- [0136] 补体使经过溶血素预处理的绵羊红血球发生溶血。凭借样品中的补体结合性抗体, 溶血得到了抑制。确定了被 1mg 免疫球蛋白结合 (灭活) 了的补体的量。
- [0137] 将一定量的免疫球蛋白 (10mg) 与豚鼠的补体混合, 并对游离的补体进行滴定。将抗补体活性表示为相对于参照溶液中所用补体的已用补体。补体活性的溶血单位 (CH50) 是导致最佳缓冲条件中的 5×10^8 个红血球总量中的 2.5×10^8 个最佳制备的红血球发生溶血的补体的量。
- [0138] 最佳制备的红血球 (8ml 来自绵羊的稳定化红血球, 用白明胶 - 巴比妥缓冲液清洗了三次, 最后将 1ml 红血球沉积物悬浮在 24ml 白明胶 - 巴比妥缓冲液中) 通过以下方法制得 : 将 20ml 红血球悬浮液与 20ml 溶血素 (调节至 2MHE/ml —最小溶血单位) 混合, 并于 37°C 温育 15 分钟。
- [0139] 将 10mg 当量的免疫球蛋白稀释在白明胶 - 巴比妥缓冲液 (1L pH 7.3 的巴比妥缓冲液含 1g 白明胶, 5 倍的巴比妥缓冲溶液 : 83 克氯化钠、 10.192g 巴比妥钠于 2 升水中, pH 7.3) 中。将 $200\ \mu\text{l}$ 补体 100CH50/ml 添加至 1ml 的最终体积中。将试管在 37°C 下振荡温育 1 小时。稀释样品, 并针对最佳制备的红血球对样品进行滴定。在 37°C 下温育 1 小时后, 离心样品, 并使用分光光度计在 541nm 处确定光密度。
- [0140] 对蛋白水解活性的确定
- [0141] 蛋白水解活性可以通过以下方法来估算 : 于 37°C 将显色底物 (特别是对至少一种丝氨酸蛋白酶敏感的显色底物) 与抗体制剂样品 (通常稀释在缓冲液中以达到测定的线性范围) 混合, 随后使用分光光度计监测吸收动力学。该样品的蛋白水解活性通过使用等式 $C(\text{U/L}) = 313S \times \Delta \text{Abs/分钟} \times F$ (C = 蛋白水解活性 ; S = 与显色底物的特定吸收变化相关的转换因子 ; F = 稀释因子) 由起始吸收差 ($\Delta \text{Abs/分钟}$) 计算得到。根据制造商的操作说明来使用该底物。
- [0142] 特别而言, 蛋白水解活性可以通过以下步骤来估算 :
- [0143] (a) 将 25mg 底物 S-2288 (Chromogenix) 溶解在 7.2ml 注射用水中 ;

[0144] (b) 将抗体制剂样品稀释在缓冲液 (100mM Tris. HCl, pH 8.4, 106mM NaCl) 中, 以达到测定的线性范围, 并将温度调节至 37°C ;

[0145] (c) 将经稀释的抗体制剂与已溶解的底物以等量 (例如 200 μ l) 混合 ;

[0146] (d) 使用分光光度计在 405nm 处于 37°C 测量吸收动力学 1 分钟 ~ 3 分钟 ;

[0147] (e) 通过使用等式 $C(U/L) = 313 \times \Delta Abs / \text{分钟} \times F$ (C= 蛋白水解活性 ; F= 稀释因子) 由起始吸收差 ($\Delta Abs / \text{分钟}$) 计算出样品的蛋白水解活性。

[0148] 该方法的定量测定极限是 8U/1 ; 使用本发明的抗体制剂的样品, 检测不到蛋白水解活性。因此, 本发明的最终产品中的蛋白水解活性水平低于 8U/1。

[0149] 实施例 1—从组分 I/III 制备富集有 IgM 的制剂

[0150] 将源自人血浆的冷乙醇组分分离过程的 180kg Cohn 组分 I/III 悬浮在 720L 0.1M 的乙酸钠缓冲液 (pH 5.05) 中, 并在达到悬浮液温度 ($22 \pm 4^\circ\text{C}$) 后混合 15 分钟 ~ 30 分钟。

[0151] 通过在室温下添加 19.8kg 辛酸 (0.110kg/kg 所用的糊状物 I/III) 来对上述溶液进行处理, 随后用振动混合器 (Vibromixer®, 规格 4, Graber+Pfenniger GmbH, 将振动混合器调节至 2 ~ 3 级) 将蛋白溶液进一步混合 80 分钟。历时 30 分钟缓慢添加辛酸。

[0152] 添加约 3kg 磷酸三钙 ((Ca₃(PO₄)₂), 随后再混合蛋白溶液至少 15 分钟。利用过滤器压力通过澄清过滤来除去沉淀。进行另外的 0.2 μ m 过滤, 并用 10kD 膜对蛋白溶液进行超滤。以 0.04M NaCl 溶液为背景对蛋白溶液进行渗滤, 之后将蛋白溶液调节至蛋白浓度为 40g/L。

[0153] 在使用注射用水进行 1+1 稀释后, 在 pH 4.0 \pm 0.1 下处理蛋白溶液。pH 调节通过使用 1M HCl 来进行, 并于 37°C \pm 2°C 温育蛋白溶液 9 小时。在 pH 4 下温育之后, 用 1M NaOH 将蛋白溶液调节至 pH 5.8。对于所得到的蛋白溶液, 通过分批添加 DEAE 交联葡聚糖凝胶 (75g DEAE 交联葡聚糖凝胶 /kg 蛋白) 来进行进一步纯化。在搅拌下于室温温育蛋白溶液 60 分钟以上。通过澄清过滤来除去 DEAE 交联葡聚糖凝胶。对蛋白溶液进行 0.2 μ m 过滤。

[0154] 使蛋白溶液过滤通过 0.1 μ m 过滤器和 Pall, Ultipor VF DV50, 20" 过滤器。使用流动通过式 UVivotec® 处理设备 (Bayer Technology Services/Sartorius Stedim) 以 240J/m² 的 UVC 剂量在 254nm 处对滤液进行进一步的 UVC 光处理。使用制造商的操作说明来计算通过 UVC 反应器的流速。通过超滤将经照射的蛋白溶液浓缩至蛋白浓度为 50g/l ~ 70g/l, 并对其进行渗滤 (10kD 膜, 使用 0.32M pH=4.3 的甘氨酸缓冲液)。使最终产物过滤通过 0.2 μ m 过滤器, 并在 2°C ~ 8°C 下储存。

[0155] 实施例 2 对辛酸处理步骤中的条件的研究

[0156] 对于辛酸处理, 使用实施例 1 中描述的方法检测了以下实验范围, 并且还测试了其相互间的组合 (结果未示出)。

[0157] - 辛酸量 : 0.09kg/kg ~ 0.13kg/kg (与每 kg 所用组分 I/III 对应的辛酸量) (120mM ~ 180mM 辛酸)

[0158] - 辛酸处理的 pH : pH4.8 ~ 5.3

[0159] - 反应的温度范围 : 14°C ~ 30°C

[0160] - 温育时间 : 40 分钟 ~ 110 分钟

[0161] 所有经检测的条件都产生了易于澄清以用于后续处理的中间体, 并且蛋白水解活性从悬浮的 Cohn 组分 I/III 中的数千 U/L 发生了大幅度下降。这些中间体产生了蛋白水

解活性低于 8U/1 (按下文实施例 6 所述进行计算得到) 的最终产品, 8U/1 为定量测定的极限。

[0162] 实施例 3—通过振动混合器的病毒消减—对使用和不使用振动混合器的辛酸处理确定病毒去除系数

[0163] 在 pH 5.05 和 22°C 下, 对 250ml 悬浮的组分 I/III 进行 30 分钟的匀质。将 2.6ml 病毒原液掺入上述悬浮液中。添加辛酸 (110g/kg), 并使用振动混合器匀质 60 分钟。在平行实验中, 通过标准搅拌对同样的混合物进行匀质。60 分钟后, 添加磷酸三钙 (0.15g/kg 辛酸), 并搅拌悬浮液 15 分钟。通过使用滤片进行深度过滤来使悬浮液澄清。滤片用 70ml ~ 80ml 缓冲液预先冲洗过。过滤后, 用 80ml 缓冲液冲洗滤器。将滤液和洗液合并, 并提取样品进行病毒滴定。

[0164] 在针对 SV40、Reo 和 PPV 的适合的指示细胞 (CV-1、CCL. 7.1 和 PK13) 上确定了在添加辛酸前和进行过滤后所采集的样品中的病毒效价。最后, 按照目前用于病毒验证研究的准则计算出去除系数。

[0165] 在病毒验证研究中, 诸如 SV40 和 Reo 等无包膜病毒分别以大于 4log₁₀ 和大于 5log₁₀ 的量级被有效去除。此外, 超过 3log₁₀ 的 PPV 被去除。这些值比在无振动混合的标准搅拌条件下进行相同的辛酸处理时高出超过 10 倍至 1000 倍。

[0166] 表 1: 对使用及不使用振动混合器时辛酸处理的病毒消减系数 (log₁₀) 的比较。

[0167]

	标准搅拌下的辛酸反应 [log ₁₀ 消减]	振动混合下的辛酸反应 [log ₁₀ 消减]
PPV	2.15 ± 0.32	3.39 ± 0.36
REO	2.34 ± 0.38	5.46 ± 0.28
SV40	2.05 ± 0.4	4.71 ± 0.34

[0168] 实施例 4—对 UVC 处理的评估

[0169] 对 UVC 照射剂量的最佳范围进行了评估。在实现至少 4log₁₀ 的无包膜病毒的灭活的最小必需剂量和避免 IgM 分子变性 (其致使 Fab 结合抗原的功能受损且使影响补体活化的 Fc 功能受损) 的最大耐受剂量之间存在平衡。在 200J/m² ~ 400J/m² 范围内, 仅能观察到免疫球蛋白聚集体的略微增加, 且观察不到对片段含量的显著影响。

[0170] 在实验中, 利用销售商提供的来自 BTS 的 Excel 表 (用户主计算表 UVivatec Lab II, 版本号 3.0), 用原始蛋白溶液的光密度 (OD) 来计算 UVivatec 实验室系统中的流速。计算流速时, 将灯的性能、UV 信号灯传感器的设定点和所需的 UVC 照射剂量考虑在内。

[0171] 以 5.8l/h 的流速将蛋白含量为约 55g/l 的含 IgM 溶液 (批次 86GB005BE07) 泵送通过 UVivatec 系统, 从而为单次流动通过实现 200J/m² 的剂量。以 3.9L/m² 的流速将蛋白溶液泵送通过该系统, 从而实现 300J/m² 的剂量。以 2.9L/m² 的流速将蛋白溶液泵送通过该系统, 从而实现 400J/m²。

[0172] 表 2: 对浓缩的最终产品中 UVC 处理前、后的活性和效价确定的分析结果

[0173]

		IgM 产品 无 UVC 照 射	IgM 产品 200 J/m ² 的 UVC 照射后	IgM 产品 300 J/m ² 的 UVC 照射后	IgM 产品 400 J/m ² 的 UVC 照射后
蛋白含量	g/l	56.3	56.2	57.6	54.4
IgG 含量(浊度测定法)	%	56.1	55.5	55.7	54.9
IgA 含量(浊度测定法)	%	20.1	20.6	20.5	20.7
IgM 含量(浊度测定法)	%	23.7	23.9	23.7	24.4
HPSEC 聚集体>1200 kD	面积%	1.9	2.6	3.3	4.0
片段<100 kD	面积%	0.66	0.73	0.76	0.79
ACA	CH50/mg 蛋白	0.68	0.48	0.46	0.46
PA	U/l	< 8	< 8	< 8	< 8

[0174] 在 200J/m² ~ 400J/m² 范围内,未能观察到免疫球蛋白含量、蛋白水解活性或 ACA 上的显著差异。优选的剂量范围设定为 200J/m² ~ 300J/m²,因为 200J/m² 足以使无包膜病毒灭活,而在 300J/m² 下,未能看到对聚集体的形成和抗体效价的显著影响。优选的剂量为 225J/m²。

[0175] 以 5.8l/h 的流速将蛋白含量为 8g/l ~ 12g/l 的经稀释的含 IgM 溶液(批次 86BB059BE07)泵送通过 UVivatec 系统,从而为单次流动通过实现 200J/m² ~ 300J/m² 的剂量。

[0176] 表 3 :对以不同的 UVC 剂量进行 UVC 照射前、后的 IgM 溶液的分析结果

[0177]

批次组分 I/III 86BB059BE07		UVC 之前	UVC: 200 J/m ²	UVC: 225 J/m ²	UVC: 250 J/m ²	UVC: 300 J/m ²
蛋白	g/l	11.34	10.56	10.65	10.69	10.56
IgG 含量	%	59.2	59.1	58.5	58.6	57.1
IgA 含量	%	19.6	19.6	20.2	20.1	20.3
IgM 含量	%	21.1	21.3	21.2	21.4	22.6
HSEC 聚集体>1200 kD	%	0.20	0.39	0.54	0.3	0.47
片段<100 kD	%	0.47	0.46	0.25	0.26	0.47
PA	U/l	< 8	< 8	n.t.	n.t.	n.t.
PKA	U/ml	3	3	3	3	3
		0.1	0.08	0.1	0.1	0.18
ACA	CH50/mg 蛋白					
抗大肠杆菌 O1:K1-IgG	U/mg	24.7	20.5	18.9	19.5	20.2
抗大肠杆菌 O1:K1-IgA	U/mg	9.4	9.5	9.5	9.1	8.9
抗大肠杆菌 O1:K1-IgM	U/mg	14.1	13.0	15.1	13.9	13.4
抗白色念珠菌-IgG	U/mg	15.6	16.8	17.9	17.3	17.0
抗白色念珠菌-IgA	U/mg	11.3	11.6	10.5	10.3	10.4
抗白色念珠菌-IgM	U/mg	13.8	13.3	13.7	13.9	13.1
抗粪肠球菌- IgG	U/mg	13.0	15.5	13.5	14.8	15.0
抗粪肠球菌- IgA	U/mg	11.3	10.5	10.1	9.7	9.6
抗粪肠球菌- IgM	U/mg	17.2	14.1	16.7	14.0	13.9
抗肺炎球菌糖-IgG	U/mg	23.2	24.1	24.7	24.0	25.7
抗肺炎球菌糖-IgA	U/mg	13.3	12.1	18.0	16.5	14.8
抗肺炎球菌糖-IgM	U/mg	17.5	15.1	18.0	16.4	16.6

[0178] 在此剂量范围程序内,免疫球蛋白类别之间的分布保持不受 UV 照射的影响。经 HPSEC 分析,分子量分布模式亦未发生变化。经 CZE 分析,纯度水平保持不变。蛋白水解活性 (PA)、前激肽释放酶活化剂 (PKA) 和抗补体活性 (ACA) 无变化。此外,对所有免疫球蛋白类别而言,用 ELISA 方法测得的抗细菌活性均未发生显著变化。

[0179] 对用升高的 UV 强度照射的等分部分进行了进一步的处理直至获得最终产品,并对其进行同样一套分析测试。在该最终产品中也未能观察到显著差异。所有测得的抗体效价始终处于未经 UVC 处理的对照制剂的 100±10% 的范围内。

[0180] 实施例 5—使用振动混合器 /pH4 处理和 UVC 处理后的总体病毒消减—对病毒去除系数的确定

[0181] 使用以下模型病毒对通过振动混合进行的辛酸处理、pH4 处理和 UVC 处理 (215J/

m²) 这三个步骤的病毒去除 / 灭活进行了验证:牛病毒性腹泻病毒 (BVDV) (作为丙型肝炎病毒的模型病毒),假性狂犬病病毒 (PRV) (作为人类疱疹病毒的模型病毒),人免疫缺陷病毒 (HIV-1),马动脉炎病毒 (EAV) (作为冠状病毒的模型病毒),Sindbis 病毒 (SinV) (作为黄病毒的模型病毒),鼠脑脊髓炎病毒 (MEV) (作为甲型肝炎病毒的模型病毒),呼肠孤病毒 (Reo) (作为其他无包膜病毒的模型病毒),猪细小病毒 (PPV) (作为人细小病毒 B19 的模型病毒)。

[0182] 对辛酸处理、pH4 处理和 UVC 处理这三个步骤的研究的结果在下表 2 中列出。

[0183] 表 4 :IgM 产生方法所致的总病毒消减

[0184]

模型病毒	BVDV	PRV	HIV-1	EAV	SinV	MEV	Reo	PPV
总消减 (log ₁₀)	>12.5	>10.1	>12.7	>8.4 ^a	>13.7 ^a	9.2	>11.0	>8.4

[0185] ^a 在没有 UVC 照射步骤的验证数据的情况下的消减系数

[0186] 用标称孔径为约 50nm 的过滤器进行的可选的纳米过滤通过将总消减提升至超过 17log₁₀ (视病毒尺寸而定) 而增加了额外的安全性。例如,随后对 HIV-1 的去除达到了 >17.5log₁₀, 然而纳米过滤并未进一步除去 PPV。

[0187] 因此,本发明的纯化程序产生了优异的病毒安全的 IgM 制剂,该制剂具有迄今为止此类含 IgM 制剂未达到的大于 8log₁₀ 的病毒灭活 / 消减率。这对于无包膜病毒 (如 MEV、Reo 和 PPV) 来说尤其重要,通常,这些病毒因其尺寸小和缺乏脂质包膜而对病毒灭活和去除程序更具抗性。

[0188] 实施例 6—对使用和不使用振动混合器的辛酸处理的残留蛋白水解活性的确定

[0189] 如实施例 1 中那样进行了辛酸处理,并在未使用振动混合器而是使用桨式搅拌器进行强烈的标准搅拌的平行实验中进行了辛酸处理。在进行了辛酸 / 磷酸三钙处理和超滤 / 渗滤后,根据制造商的操作说明,使用显色底物 S-2288 (Chromogenix) 确定了样品中的蛋白水解活性。将 25mg 底物 S-2288 (Chromogenix) 溶解在 7.2ml 注射用水中。将样品稀释在缓冲液 (100mM Tris/HCl, pH 8.4, 106mM NaCl) 中以达到测定的线性范围,例如将 200 μl 缓冲液与 200 μl 样品 (混合并调节温度至 37°C) 和 200 μl 显色底物溶液混合。使用分光光度计于 37°C 在 405nm 处测量吸收动力学 (1 分钟 ~ 3 分钟)。通过使用等式 C(U/L) = 313 × ΔAbs / 分钟 × F (C = 蛋白水解活性; F = 稀释因子) 由起始吸收差 (ΔAbs / 分钟) 计算出样品的蛋白水解活性。

[0190] 表 5 :辛酸处理所致的蛋白水解活性下降

	无振动混合的辛酸处理	振动混合下的辛酸处理
[0191] 起始材料(U/L)	5630	5630
辛酸处理后的平均残留蛋白水解活性(U/L)	42	< 8 (LOD)

[0192] 在使用振动混合时,辛酸处理后的滤液清澈。在对比实验中,使用桨式搅拌器进行辛酸处理后的滤液非常不透明且难以过滤。

[0193] 实施例 7:本发明的 IgM 制剂中的抗细菌效价

[0194] 为了与唯一的市售静脉内耐受的含 IgM 的制剂 Pentaglobin 进行比较,在第三批该成熟药物中进行了抗细菌活性分析,并将该活性与本发明的制剂进行比较。通过 ELISA,对 IgM 制剂中针对抗细菌或抗真菌抗原的 IgA 或 IgM 类的抗体进行了确定。用对应的抗原包被微量滴定板,并将其与标准样或所述 IgM 制剂一起温育。用抗人 IgA 偶联物或抗人 IgM 偶联物检测与抗原结合的抗体。该检测使用酶底物来进行。发生的颜色变化与存在于 IgM 制剂中的抗体的量对应。

[0195] 表 6 对本发明的制剂和市售的 Pentaglobin 中的 IgM 抗细菌结合活性的比较

参数	单位	本发明的 IgM 制剂 平均值	市售产品 Pentaglobin 平均值
[0196] 抗肺炎球菌糖的 IgM 抗体	U/mg IgM	72	21
抗大肠杆菌的 IgM 抗体	U/mg IgM	62	39
抗粪肠球菌的 IgM 抗体	U/mg IgM	69	27
抗白色念珠菌的 IgM 抗体	U/mg IgM	61	41
抗衣原体的 IgM 抗体	U/mg IgM	71	6

[0197] 表 7 对本发明的制剂和市售的 Pentaglobin 中的 IgA 抗细菌结合活性的比较

参数	单位	本发明的 IgM 制剂 平均值	市售产品 Pentaglobin 平均值
[0198] 抗肺炎球菌糖的 IgA 抗体	U/mg IgA	86	25
抗大肠杆菌的 IgA 抗体	U/mg IgA	83	26
抗粪肠球菌的 IgA 抗体	U/mg IgA	93	21
抗衣原体属的 IgA 抗体	U/mg IgA	65	38
抗幽门螺杆菌的 IgA 抗体	U/mg IgA	59	24

[0199] 新制剂中 IgM 和 IgA 所介导的活性通常是 Pentaglobin 中的至少 1.5 倍高,这可以用 Pentaglobin 中的 IgM 和 IgA 已被 β -丙内酯化学修饰这一事实来解释。这一步骤被本发明中的更温和的程序替代。

[0200] 总而言之,这些数据表明最终制剂中的 IgM 分子的结合区在功能上具有完整活性。

[0201] 实施例 8 对液体 IgM 产品的储存稳定性研究

[0202] 将未经 UVC 处理的实施例 1 的产品储存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 的 10ml 或 100ml 玻璃小管(填充体积为 5ml 或 50ml)中,并就规范中的所有参数进行分析。结果示于表 8 中。与显示出稳定性相关的参数是:用高效尺寸排阻色谱法 (HPSEC) 测得的聚集体和片段含量,蛋白水解活性 (PA),和抗补体活性 (ACA)。这些参数对静脉内耐受性至关重要,并且可能在长期储存过程中发生变化。在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下,这些参数无显著变化。甚至在室温 ($23^{\circ}\text{C} \sim 27^{\circ}\text{C}$) 下储存时,这些值仍在规范范围内,但在室温下在 24 个月之后片段会略有增加。还确定了其他参数,例如着色、乳白度、pH 值,这些参数在整个研究期间保持不变。在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下,针对各种细菌的 IgM 和 IgA 效价保持稳定超过 2 年。

[0203] 将经 UVC 处理的实施例 1 的产品也储存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 和室温下的 10ml 或 100ml 玻璃小管(填充体积为 5ml 或 50ml)中,并就规范中的所有参数进行分析。结果示于表 9 中。

在仍在进行的该稳定性研究中,目前获得的 12 个月的数据显示出该产品与未经 UVC 处理时的产品相同的稳定性特征,这使得可以外推至 24 个月的稳定性。

[0204] 表 8 在 2°C~8°C 下测试的批次 A586067 的稳定性水平位置填充量 :5ml

[0205]

经测试的参数	要求 (耐受)	储存月数 2°C~8°C							23°C~27°C
		0	3	6	9	12	18	24	24
蛋白(g/l)	45~55	50.3	51.4	50.3	50.4	50.5	49.6	50.8	49.8
HPSEC									
%聚集体 > 1200 kD	≤ 5	0.9	0.6	0.5	0.8	0.6	1.0	1.3	1.7
%片段 < 100 kD	≤ 5	0.2	0.6	1.1	0.7	1.6	0.9	1.2	4.1
蛋白水解活性(U/l)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
免疫球蛋白含量(%)	> 95 %	96.7	99.0	100	n.t.	99.5	n.t.	98.4	97.5
IgM 含量	≥ 20 %	21.6	22.1	22.1	n.t.	22.3	n.t.	20.9	20.5
抗补体活性 (CH50/mg 蛋白)	≤ 1.0	0.48	0.56	0.48	0.66	0.70	0.64	0.54	0.38

[0206] n. t. = 未测试

[0207] 表 9 在 2°C~8°C 下测试的批次 A586057 的稳定性水平位置填充量 :50ml

[0208]

经测试的参数	要求 (耐受)	储存月数 2°C~8°C							23°C~27°C
		0	3	6	9	12	18	24	24
蛋白(g/l)	45~55	50.2	50.8	49.7	50.4	50.3	49.4	50.3	49.7
HPSEC									
%聚集体 > 1200 kD	≤ 5	0.9	0.5	0.4	0.8	0.6	1.0	1.3	1.5
%片段 < 100 kD	≤ 5	0.3	0.6	1.0	0.9	1.4	1.2	1.2	4.2
蛋白水解活性(U/l)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
免疫球蛋白含量(%)	> 95 %	98.6	98.9	100	n.t.	99.5	n.t.	98.5	98.0
IgM 含量	≥ 20 %	21.3	22.3	24.5	n.t.	22.0	n.t.	20.9	20.1
抗补体活性 (CH50/mg 蛋白)	≤ 1.0	0.48	0.82	0.52	0.64	0.68	0.48	0.60	0.40

[0209] 实施例 9 用 IgM 产品进行的体外非特异性补体活化

[0210] 实施例 9A—对 C5a 水平的确定

[0211] 使用因子 C5a 作为末端补体途径的活化的标志物分析了 IgM 制剂的在体外非特异性地激活补体的潜力。出于此目的,将人血清与免疫球蛋白产品或缓冲液一起温育 120 分钟。在温育了 0 分钟、5 分钟、15 分钟、60 分钟和 120 分钟后取样。为了展示体外系统的适合功能,示出了补体系统的完全抑制和完全活化。使用市售的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Quidel Micro Vue C5a Plus EIA 试剂盒 ;A025),用光度计通过光密度确定来测量了补体因子的浓度。

[0212] 在 37°C 下快速融解人血清 (Quidel NHS;A113) 并立即置于冰上。每个单样品由包含血清的反应批料组成 (100 μ l)。首先用吸量管加入添加剂,随后添加人血清,从而使每个

反应批料中的反应开始。

[0213] 不含任何添加剂的人血清充当空白,并显示出实验设置所致的基线补体活化。添加热聚集的 IgG (HAAG Quidel; A114; 1.3 μ l) 来充当人血清补体的强活化剂,从而展示该体外系统的应答性。为了在整个反应时间和实验处理期间完全抑制补体活化,在人血清中添加了 EDTA (终浓度 10mM)。调节 IgM 制剂、Pentaglobin (如 EP0013901 所述) 和 EP0413187 所述的 IgM 制剂,使得每个反应中的 IgM 浓度为 1.72mg/ml。使用相应体积的配制缓冲液作为阴性对照。

[0214] 于 37°C 在持续搅拌下温育 0 分钟、5 分钟、15 分钟、60 分钟和 120 分钟,之后,通过添加稳定化溶液 (Quidel 样品稳定剂 A9576; 140 μ l) 来使所有反应停止。按照制造商的操作规程,进行了后续的样品稀释和 ELISA 分析。该实验在两个独立的平行测定中进行,并计算了平均值。结果示于表 10 和图 2 中。

[0215] 添加活化剂 (热聚集的 IgG) 导致了 C5a 在 15 分钟内的明显增加,从而表明了该体外系统检测补体活化的灵敏应答。添加作为抑制剂的 EDTA 导致了在整个温育期间未变化的值,说明补体活化是特异性的,而不是由于样品操作或制备所致的人为假象。于 37°C 温育人血清并暴露于人造表面引发了轻微的补体活化,将其记录为空白值。

[0216] EP0413187 所述的 IgM 参照制剂在 60 分钟后导致了最高超过 1000ng/ml 的补体活化 (表 10)。市售的经化学修饰的参照制剂 Pentaglobin (EP0013901) 与 EP0413187 产品相比仍显示出一半的补体活化潜力。

[0217] 用本发明的 IgM 制剂处理过的血清中的 C5a 的浓度与在不含添加剂的血清 (空白) 或用配制缓冲液 (300mM 甘氨酸、pH4.3, 或 0.45%NaCl/2.5% 葡萄糖、pH 6.8) 处理过的血清中测得的 C5a 浓度相当。因此,在该体外测试系统中,本发明的 IgM 制剂中的免疫球蛋白在人血清中基本不非特异性地激活补体。

[0218] 表 10 在用含有 IgM 的免疫球蛋白处理过的人血清中检测到的平均 C5a 浓度

[0219]

时间(分钟)	0	5	15	60	120
IgM 制剂(本发明) C5a [ng/ml]	23.8	42.0	110.5	162.0	150.8
Pentaglobin (EP0013901) C5a [ng/ml]	46.4	55.4	329.2	460.9	653.5
EP0413187 产品 C5a [ng/ml]	21.1	149.5	423.2	1029.4	1084.2
对照					
空白 C5a [ng/ml]	22.3	30.7	66.2	149.5	168.1
活化剂 (IgG 多聚体) C5a [ng/ml]	19.4	897.6	3409.2	4536.1	4829.6
抑制剂 EDTA C5a [ng/ml]	25.9	22.3	25.5	23.8	27.5
配制缓冲液 IgM C5a [ng/ml]	19.8	35.5	101.2	112.8	173.4
配制缓冲液 Pentaglobin C5a [ng/ml]	26.2	33.1	56.7	82.6	187.2

[0220] 实施例 9B 对 C3a 水平的确定

[0221] 使用因子 C3a 作为补体途径的活化的标志物分析了 IgM 制剂的在体外非特异性地激活补体的潜力。出于此目的,将人血清与免疫球蛋白产品或缓冲液一起温育 120 分钟。在温育 0 分钟、5 分钟、15 分钟、60 分钟和 120 分钟后取样。为了展示体外系统的适合功能,示出了补体系统的完全抑制和完全活化。使用市售的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (Quidel Micro Vue C3a Plus EIA 试剂盒; A032),用光度计通过光密度确定来测量了补体因子的浓度。

[0222] 在 37°C 下快速融解人血清 (Quidel NHS; A113) 并立即置于冰上。每个单样品由包含血清的反应批料组成 (100 μ l)。首先用吸量管加入添加剂,随后添加人血清,从而使每个反应批料中的反应开始。

[0223] 不含任何添加剂的人血清充当空白,并显示出实验设置所致的基线补体活化。添加眼镜蛇毒因子 (CVF Quidel; A600; 20U/ml) 来充当人血清补体的强活化剂,从而展示该体外系统的应答性。为了在整个反应时间和实验处理期间完全抑制补体活化,在人血清中添加了 EDTA (终浓度 10mM)。调节 IgM 制剂和 Pentaglobin (如 EP0013901 所述),使得每个反应中的 IgM 浓度为 1.72mg/ml。使用相应体积的配制缓冲液作为阴性对照。

[0224] 于 37°C 在持续搅拌下温育 0 分钟、5 分钟、15 分钟、60 分钟和 120 分钟,之后,通过添加稳定化溶液 (Quidel 样品稳定剂 A9576; 140 μ l) 来使所有反应停止。按照制造商的操作规程,进行了后续的样品稀释和 ELISA 分析。该实验在两个独立的平行测定中进行,并计算了平均值。结果示于表 11 和图 3 中。

[0225] 添加活化剂 (CVF) 导致了 C3a 在 15 分钟内的明显增加,从而表明了该体外系统检测补体活化的灵敏应答。添加作为抑制剂的 EDTA 导致了在整个温育期间未变化的值,说明补体活化不是由于样品操作或制备所致的人为假象。于 37°C 温育人血清并暴露于人造表面引发了轻微的补体活化,将其记录为空白值。

[0226] 市售的经化学修饰的参照制剂 Pentaglobin (EP0013901) 显示出的 C3 活化潜力为空白值的三倍高。

[0227] 用本发明的 IgM 制剂处理过的血清中的 C3a 的浓度与在不含添加剂的血清 (空白) 或用配制缓冲液 (300mM 甘氨酸、pH4.3, 或 0.45%NaCl/2.5% 葡萄糖、pH 6.8) 处理过的血清中测得的 C3a 浓度相当。因此, 在该体外测试系统中, 本发明的 IgM 制剂中的免疫球蛋白在人血清中基本不以显著的量非特异性地激活补体。

[0228] 表 11 在用含有 IgM 的免疫球蛋白处理过的人血清中检测到的平均 C3a 浓度

[0229]

时间(分钟)	0	5	15	60	120
IgM 制剂(本发明) C3a [ng/ml]	1458.3	2484.1	3972.1	5280.7	5703.1
Pentaglobin (EP0013901) C3a [ng/ml]	1371.9	3069.4	7585.9	10225.4	11769.5
对照					
空白 C3a [ng/ml]	1301.1	1742.6	2468.7	3361	4117.4
活化剂 (CVF) C3a [ng/ml]	1194.3	6077.1	12796.8	27679.1	27284.5
抑制剂 EDTA C3a [ng/ml]	1140.2	1098.0	1025.7	964.2	1004.8
配制缓冲液 IgM C3a [ng/ml]	1060.3	2262.3	2907.3	3480.7	4435.4
配制缓冲液 Pentaglobin C3a [ng/ml]	1070.9	1965.8	3548.0	4008.1	5251.9

[0230] 实施例 10 用 IgM 产品进行的体内实验

[0231] 为了确认安全性和耐受性, 在 8 只有意识的食蟹猴中研究了在历时 5 天反复进行静脉内输注后 IgM 制剂对动脉血压的影响。以 190mg/IgM/kg/ 日的剂量施用了按本文所述的方法制备的 IgM 制剂。向一些猴施用了市售的静脉内耐受的含 IgM 制剂 Pentaglobin, 以作为对比物质。以施用相同 IgM 剂量的方式施用 Pentaglobin。在注射后确定了血压, 从而确定施用是否与不可耐受的非特异性补体活化相关。在施用免疫球蛋白制剂前数小时, 向这些动物施用对照剂量的 0.9%NaCl。通过将压力导管经由右股动脉插入下腹主动脉中来确定血压。通过遥测术传送了结果。

[0232] 施用 IgM 制剂 (15ml/kg/ 日) 对动脉血压 (收缩压和舒张压的平均值) 仅有微小的影响。在每次输注后长达 4 小时, 与预先测试的值的差异不超过 4mmHg。可以认为这些差异在生物学上不相关。

[0233] 表 12a 施用 IgM 制剂后的 C3a 水平 [ng/ml]

	对照 (0.9% NaCl, pH 4.5) C3a [ng/ml]	施用 IgM 制剂 C3a [ng/ml]
[0234] 平均值	229	240
SD	83	37
N	8	8

[0235] 表 12b 施用参照制剂 Pentaglobin 后的 C3a 水平 [ng/ml]

	对照 (0.9% NaCl, pH 6.8) C3a [ng/ml]	施用 Pentaglobin C3a [ng/ml]
[0236] 平均值	204	263
SD	20	61
N	4	4

[0237] 在注射后采集的血浆样品中确定了 C3a 水平,以作为补体途径的非特异性活化的标志物。施用 IgM 制剂 (15ml/kg 体重) 仅使 C3a 水平 [ng/ml] 略微升高,且该 C3a 水平甚至低于施用具有等量 IgM 的市售参照制剂 Pentaglobin 后的 C3a 水平。血样采集在治疗后约 6 小时进行。

[0238] 没有明显的毒理学结果可以归因于 IgM 制剂,而且没有在使用 Pentaglobin 时未观察到的相关变化。由于 Pentaglobin 的安全性已在多年临床实践中得到充分确认,因此可以合理断定,这些变化不具有任何临床相关性。

[0239] 在 24 位健康男性和女性志愿者中,在人 I 期研究中也证实了 IgM 制剂的良好耐受性和安全性。在以 0.5ml/分钟输注了 91mg ~ 274mg IgM 制剂/kg 体重/日后,施用后的前 4 个小时内的平均收缩血压仅下降了约 9%(11.9mmHg)。

[0240] 这与安慰剂 0.9%NaCl 溶液的值 (9.4%, 11.7mmHg) 在相同的范围内。

[0241] 没有记录到严重的不良事件,而且所有的非严重不良事件都是自约束的。此外,如 PCT 测定所示,没有传染原传播的证据。

[0242] 应注意的是,由于免疫原性和获自人血浆的 IgM 制剂中的预先形成的 Gal 抗体,用相关疾病的动物模型进行的功效研究的有效性有限。然而,鉴于 Pentaglobin 在疾病治疗中的应用的相关现有技术知识和按照本发明的方法制备的 IgM 制剂的抗细菌抗体效价(如实施例 7 所示),可以断定该 IgM 制剂具有临床功效。

[0243] 实施例 11 抗体制剂的 Fc 部分的功能完整性

[0244] 使用目前的《欧洲药典》方法 (2.7.9 “用于免疫球蛋白的 Fc 功能的测试”,《欧洲药典》,当前版本,2011 年 4 月),按照针对 IgG 制剂的欧洲准则 ICH S6 (CPMP/ICH/302/95) (对源自生物技术的药品的临床前安全性评估的准则的注释),分析了用本文所述的方法制备的抗体制剂中的抗体的 Fc 部分的功能完整性。欧洲药典的针对免疫球蛋白的专论 (01/2005:20709) 提出了针对免疫球蛋白 Fc 功能的基于风疹抗原的测试。

[0245] 特别而言,对经鞣酸处理的 O 型人红细胞加载风疹病毒抗原。将特定体积的抗体制剂与抗原包被的血细胞一起温育。通过添加豚鼠补体来启动补体引发的血细胞溶解。通过 541 纳米处的吸收值随时间的变化,测量了随后的溶血动力学。使用单位时间内的吸收值最大变化来进行评估。使用人免疫球蛋白生物参照制剂 (BRP 批次号 3) 作为对比。

[0246] 在 7 批含 IgM 的抗体制剂中确定了抗体分子的 Fc 部分的活性,而且在所有批次中,该活性均在生物参照制剂 (BRP) 的活性的 96.5% 至 103.3% 之间,从而证明了含 IgM 的抗体制剂的功能性。



图 1

体外C5a补体活化

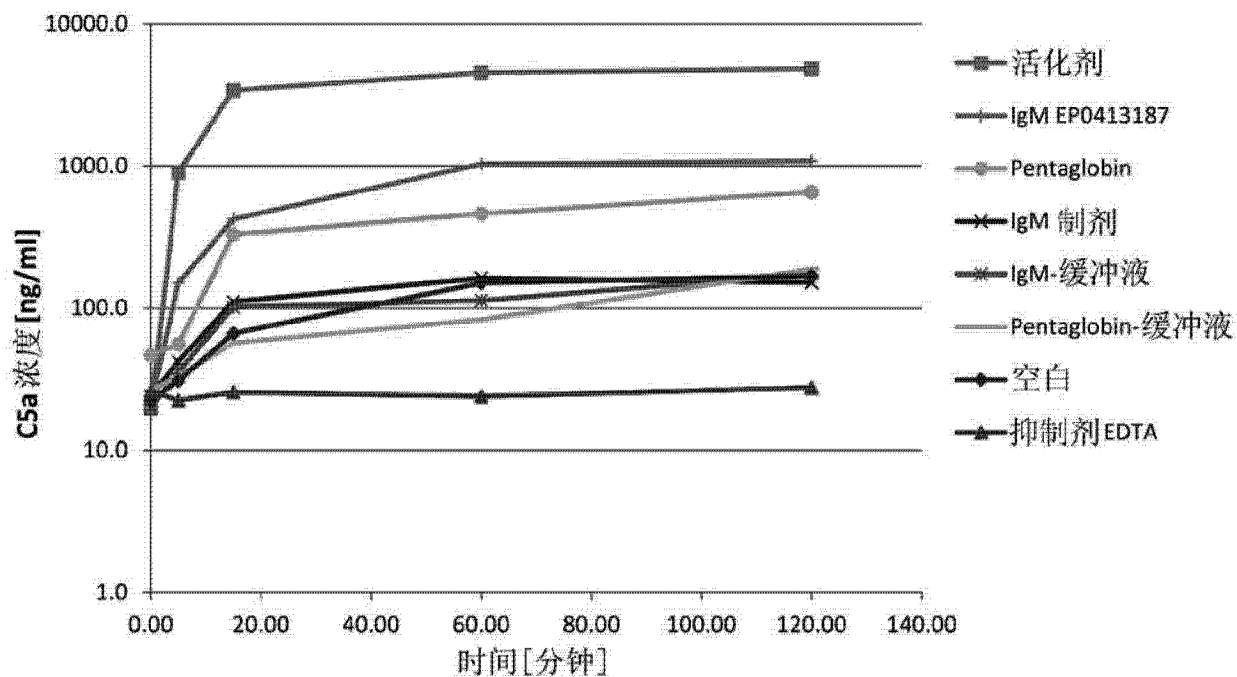


图 2

体外C3a补体活化

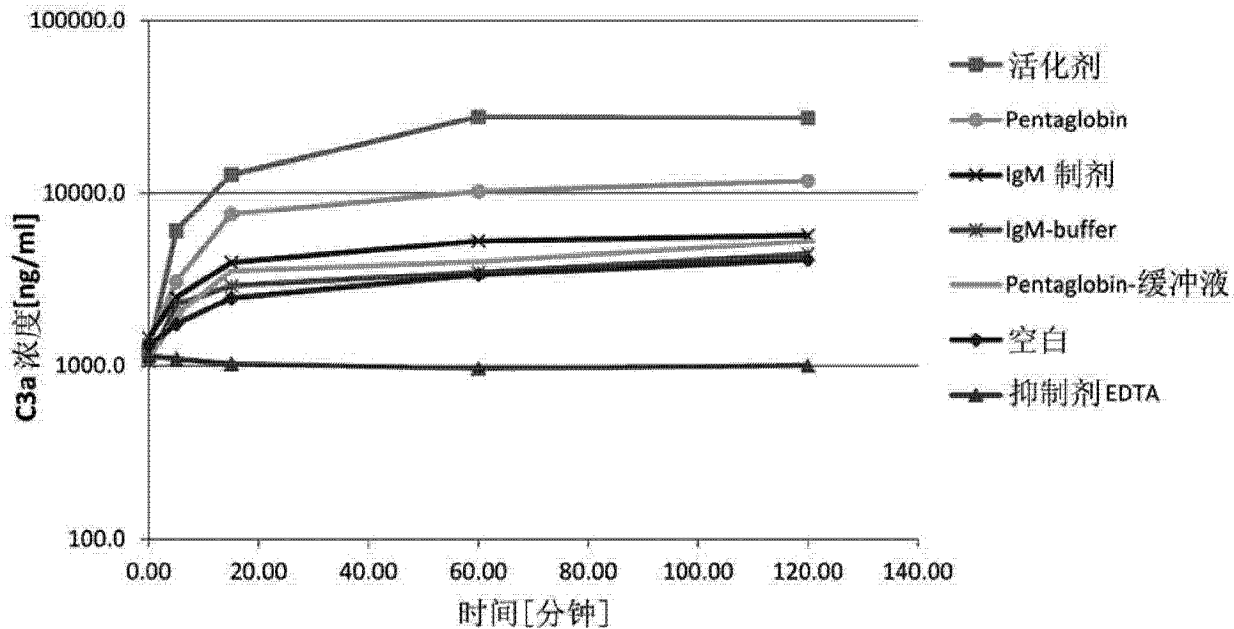


图 3