

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6612182号
(P6612182)

(45) 発行日 令和1年11月27日(2019.11.27)

(24) 登録日 令和1年11月8日(2019.11.8)

(51) Int. Cl.	F I	
C07K 1/32 (2006.01)	C O 7 K	1/32
A61K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K	9/08
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 W
A61P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 X
A61P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P	31/04

請求項の数 33 (全 23 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-110121 (P2016-110121)	(73) 特許権者	390035378
(22) 出願日	平成28年6月1日(2016.6.1)		バイオテスト・アクチエンゲゼルシャフト
(62) 分割の表示	特願2013-511591 (P2013-511591) の分割		ドイツ連邦共和国、ドライアイヒ、ラント シュタイネル ストラーセ、5
原出願日	平成23年4月21日(2011.4.21)	(74) 代理人	100107515
(65) 公開番号	特開2016-196477 (P2016-196477A)		弁理士 廣田 浩一
(43) 公開日	平成28年11月24日(2016.11.24)	(74) 代理人	100107733
審査請求日	平成28年6月29日(2016.6.29)		弁理士 流 良広
審判番号	不服2018-10453 (P2018-10453/J1)	(74) 代理人	100115347
審判請求日	平成30年8月1日(2018.8.1)		弁理士 松田 奈緒子
(31) 優先権主張番号	1006753.6	(72) 発明者	ヴォルフガング・メーラー
(32) 優先日	平成22年4月22日(2010.4.22)		ドイツ連邦共和国 61440 オーバー ウルゼル グラーフ-フォン-シュタウフ エンベルク-シュトラーセ 32
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫グロブリン組成物を調製するためのプロセス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

静脈内投与に適した抗体調製物であって、免疫グロブリン I g G、I g A 及び I g M を含み、

免疫グロブリンの総量の 15% ~ 30% が I g M であり、

前記抗体調製物は、エンベロープウイルス及び非エンベロープウイルスに関してウイルス安全性を有し、

抗補体活性が、1 CH50 / mg タンパク質以下であり、

2 ~ 8 で保存したときに少なくとも 2 年間、液状で安定であり、

前記免疫グロブリンが、 - プロピオラクトンで化学的に修飾されていない抗体調製物

10

【請求項 2】

タンパク質分解活性が 8 U / L 未満である請求項 1 に記載の抗体調製物。

【請求項 3】

少なくとも 20% の I g M を含む請求項 1 から 2 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 4】

安定化剤を更に含む請求項 1 から 3 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 5】

安定化剤がグリシンである請求項 4 に記載の抗体調製物。

【請求項 6】

20

抗体調製物中の免疫グロブリンが、酵素的に修飾されていない請求項 1 から 5 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 7】

抗体調製物中の免疫グロブリンが、製造プロセスにおいて、ペプシンのようなプロテアーゼを添加し、該プロテアーゼによる処理がされていない請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 8】

医薬において使用するための請求項 1 から 7 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 9】

免疫障害又は細菌感染症の治療において使用するための請求項 8 に記載の抗体調製物。

10

【請求項 10】

免疫障害が I g M 欠乏症である請求項 9 に記載の抗体調製物。

【請求項 11】

免疫グロブリンを含む血漿画分から I g M 含有免疫グロブリン組成物を調製するためのプロセスであって、

(a) 血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として準備する工程；

(b) オクタン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；及び

(c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離して I g M 含有免疫グロブリン組成物を得る工程、を含み、

20

前記免疫グロブリンを - プロピオラクトンで処理する工程を含まないプロセス。

【請求項 12】

免疫グロブリンを酵素的に修飾する工程を含まない請求項 11 に記載のプロセス。

【請求項 13】

工程 (b) において、オクタン酸の濃度が少なくとも 0 . 0 7 5 k g / k g 血漿画分である請求項 11 から 12 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 14】

工程 (b) において、混合溶液の pH が 4 . 5 ~ 5 . 5 である請求項 11 から 13 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 15】

工程 (b) において、混合溶液の温度が 1 0 ~ 3 5 である請求項 11 から 14 のいずれかに記載のプロセス。

30

【請求項 16】

工程 (b) において、オクタン酸が、免疫グロブリン含有溶液と少なくとも 3 0 分間インキュベートされる請求項 11 から 15 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 17】

血漿画分の免疫グロブリンが少なくとも 5 % の I g M を含む請求項 11 から 16 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 18】

血漿画分が C o h n 画分 I / I I I 又は K i s t l e r / N i t s c h m a n n 画分 B 若しくは B + I の沈殿物である請求項 11 から 17 のいずれかに記載のプロセス。

40

【請求項 19】

工程 (c) が限外濾過を含み、免疫グロブリン組成物が濾過された溶液を含む請求項 11 から 18 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 20】

工程 (c) で得られた I g M 含有免疫グロブリン組成物を pH 3 . 5 ~ pH 4 . 5 でインキュベートしてインキュベート溶液を得る工程を更に含む請求項 11 から 19 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 21】

工程 (c) で得られた I g M 含有免疫グロブリン組成物をインキュベートする工程が 3

50

2 ~ 42 で行われる請求項 20 に記載のプロセス。

【請求項 22】

インキュベート溶液を DEAE Sephadex (登録商標) に吸着させる工程、及び前記 DEAE Sephadex を前記溶液から深層濾過により分離する工程を更に含む請求項 20 から 21 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 23】

深層濾過で得られた濾液をナノ濾過に付す工程を更に含む請求項 22 に記載のプロセス

【請求項 24】

ナノ濾過が公称孔径 35 nm ~ 75 nm のフィルターで行われる請求項 23 に記載のプロセス。

10

【請求項 25】

ナノ濾過が公称孔径 40 nm ~ 50 nm のフィルターで行われる請求項 23 に記載のプロセス。

【請求項 26】

請求項 20 から 21 のいずれかにおけるインキュベート溶液又は請求項 22 から 25 のいずれかにおける濾液を UVC 照射により処理して UVC 照射溶液を得る工程を更に含む請求項 20 から 25 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 27】

インキュベート溶液又は濾液が、 $200 \text{ J/m}^2 \sim 500 \text{ J/m}^2$ で UVC 照射により処理される請求項 26 に記載のプロセス。

20

【請求項 28】

インキュベート溶液又は濾液が、 $200 \text{ J/m}^2 \sim 300 \text{ J/m}^2$ で UVC 照射により処理される請求項 26 に記載のプロセス。

【請求項 29】

UVC 照射溶液を滅菌条件下で濾過して、静脈内投与に適した抗体調製物を製造する工程を更に含む請求項 26 から 28 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 30】

抗体調製物をグリシン含有バッファ中で pH 4 ~ pH 5.5 で製剤化する工程を含む請求項 29 に記載のプロセス。

30

【請求項 31】

請求項 26 から 28 のいずれかにおける UVC 照射溶液又は請求項 29 から 30 のいずれかにおける抗体調製物を、滅菌条件下で容器に充填する工程を更に含む請求項 26 から 30 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 32】

請求項 26 から 28 のいずれかにおける UVC 照射溶液又は請求項 29 から 30 のいずれかにおける抗体調製物のタンパク質分解活性が 8 U/L 未満である請求項 26 から 31 のいずれかに記載のプロセス。

【請求項 33】

非エンベロープウイルスを $3 \log_{10}$ 超除去する請求項 26 から 32 のいずれかに記載のプロセス。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ウイルス安全性を有する免疫グロブリン調製物を調製するためのプロセス、及び該プロセスを用いて調製することができる抗体調製物及び医薬組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト血漿から調製され、静脈内投与に適する免疫グロブリン組成物は、当技術分野において知られており、数十年間に亘って広範な疾患の治療において重要な役割を果たしてき

50

た。免疫グロブリンは、例えば、ヒトの感染症の治療に用いられ、様々な生化学的及び生理学的性質に基づいて様々なクラスに分類することができる。免疫グロブリンGは、ウイルス抗原に対する防御に関与し、一方、I g Mは、抗細菌及び抗毒素免疫反応において主たる活性を有する。

【 0 0 0 3 】

免疫グロブリン溶液は、様々な割合のI g G、I g A、及びI g Mを含み、これらの割合が異なる調製物は、その治療適応も異なる。例えば、高割合のI g Mを含む調製物は、細菌感染症の予防又は治療に用いられる。I g G調製物とは対照的に、I g M抗体は溶液中で容易に凝集する。特に、I g M抗体が血漿濃度に比べて富化されており、液体溶液として保存される場合、I g M調製物を安定化させることは困難である。

10

【 0 0 0 4 】

免疫グロブリン溶液は、通常、血漿又は血清の画分、例えば、C o h n画分から調製される。次いで、これら画分は、多数の精製工程に付されて、ウイルス、変性タンパク質、プロテアーゼ、及び脂質等の混入物が除去される。分画するためのヒト血漿は、数千人のドナーから回収されるので、元血漿を徹底的に試験しているにも関わらず、病原ウイルスを含有している場合がある。したがって、医療で使用するための安全な製品を得るためには、ウイルスを不活化又は除去するためのプロセス工程が必須である。ウイルスを不活化/除去するための幾つかの技術が、当技術分野において知られている。例えば、化学的処理、U V C光の照射、又はナノ濾過であり、これらは、全体的なウイルス安全性を保証するために実施される。しかしながら、このような工程は、免疫グロブリンの活性にネガティブな影響を及ぼし得る。例えば、長時間のU V C照射は、最終産物である免疫グロブリン溶液中に得られるネイティブで活性のあるI g Mの収量を低減する場合がある。

20

【 0 0 0 5 】

前記プロセス工程のウイルス除去能又は不活化能は、生産プロセスの実験室規模のモデルを用いて検証され、各工程について、除去又は不活化係数が求められる。不活化/除去係数を増加させることにより、更なるウイルス安全性が医薬品に付加される。今日、規制機関による指針では、血漿に由来する医薬品の製造において、エンペロープウイルス及び非エンペロープウイルスに対する少なくとも2つの有効な工程を実施することが必要である。

【 0 0 0 6 】

十分な忍容性を有する製品を得るためには、潜在的に存在するウイルスに加えて、プロテアーゼ、タンパク質凝集体、及び変性免疫グロブリン等の他の混入物を除去する必要もある。特に変性免疫グロブリンは、補体を非特異的に活性化させる能力が高く、これら変性免疫グロブリンを投与されている患者に重篤な副作用をもたらすので、患者にとって潜在的なリスクである。この抗補体活性(A C A)は、欧州薬局方に記載されている標準化試験により測定される。

30

【 0 0 0 7 】

これらのあらゆる混入物を除去することは、(1)製品が、静脈内投与後患者にとって忍容性を有するようにするため、(2)製品が、ウイルスの混入に関する生物学的安全性の指針に準拠することを保証するため、(3)製品が、長期保存に対し安定であるようにするため、及び(4)望ましい化合物混合物/医薬組成物を得るために、必須である。

40

【 0 0 0 8 】

ヒトI g M溶液の初期における精製は、古典的なC o h n血漿分画法又はそのよく知られた改良法(例えば、C o h n / O n c l e y、K i s t l e r / N i t s c h m a n n)により実施されている。低温エタノール沈殿プロセスを用いると、I g M画分は、画分I I I又は画分I / I I I(B又はB + Iとも呼ばれる)に回収される。I g Mが富化されたタンパク質溶液を精製するために、画分I I I又は画分I / I I Iから出発する方法が報告されている。特許文献1には、オクタン酸、 γ -プロピオラクトン処理を用いる工程と、陰イオン交換樹脂を用いる吸着工程とを含む画分I I Iから出発する精製方法が記載されている。この方法を用いてP e n t a g l o b i n(登録商標)が製造される。P

50

entaglobinは、今日まで、唯一市販されている静脈内投与用IgM製品である。特許文献2は、陰イオン交換クロマトグラフィー、 β -プロピオラクトン、UV C照射、及び高温(40 ~ 60)におけるインキュベート工程を用いることにより抗補体活性が低下した静脈内投与用IgM濃縮物の調製について記載している。 β -プロピオラクトンは、存在する可能性のあるウイルスを不活化するために殺菌工程で用いられるよく知られた化学物質である。 β -プロピオラクトンは、タンパク質の化学修飾を引き起こす非常に反応性の高い物質であるので、免疫グロブリンの抗ウイルス活性及び抗細菌活性もかなり失われる。この方法により製造される調製物は、化学修飾されているので液体溶液中で安定である時間は限られていた。IgM濃度は、総免疫グロブリン含量の50%超であった。

10

【0009】

β -プロピオラクトンで化学修飾されていないIgM富化タンパク質溶液の調製について、特許文献3及び4に記載されている。これらの方法は、Cohn画分III又は画分III/IIIから出発して、好適なタンパク質溶液をオクタン酸処理及び陰イオン交換クロマトグラフィーに付すことを含む。特許文献4では、Cohn画分III中に存在する脂質を除去するために、15分間攪拌することによりオクタン酸処理が実施される。

【0010】

多量の免疫グロブリンを患者に静脈内投与するので、忍容性のある医薬調製物を達成しなければならない。IgM調製物は、これまで静脈内用途用に調製することが困難であるとして記述されてきた。IgMは、元来、抗原と結合して補体の強力な活性化剤となる。したがって、変性IgM分子の非特異的抗補体活性は、変性IgG分子の場合よりも患者にとって遥かに危険である。特許文献3に係る調製物は、0.6CH50/mgタンパク質~0.8CH50/mgタンパク質という低い抗補体活性を有していたが、安定化及び β -プロピオラクトンによるウイルスの不活化を行わなければならなかった。低い抗補体活性とは、免疫グロブリンに関するEPモノグラフに従って1CH50/mgタンパク質以下であるとみなす。

20

【0011】

特許文献4には、抗補体活性を低下させるために、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いることによる静脈内投与用IgM富化調製物の調製について記載されている。更に、40 ~ 60、好ましくは50 ~ 54にてpH4~pH4.5で熱処理すると抗補体活性が低下することが記載されている。この調製物は、数ヶ月間調製物の安定性を確保するために凍結乾燥させなければならなかった。液体溶液として長期安定性を有することについて示すことはできなかった。

30

【0012】

40 ~ 62、好ましくは45 ~ 55で、pH4.0~pH5.0にてIgM調製物を穏やかに熱処理して、非特異的な補体活性化を減少させる別の方法が記載されている(特許文献5)。この特許出願では、プレカリクレインアクチベータ及びリポタンパク質を遠心分離により除去するために、オクタン酸をCohn画分III懸濁液に添加する。しかし、この処理でもIgMの抗原決定基が一部失われる。これによって、新生抗原が生じるリスクが増し、ヒトにおける免疫原性の上昇又は活性の喪失が導かれる場合もある。

40

【0013】

オクタン酸沈殿工程後にプロテアーゼ処理(例えば、ペプシン処理)を行うことによる静脈内投与用IgM含有タンパク質溶液の調製が、特許文献6に記載されている。プロテアーゼ処理により、免疫グロブリン分子が部分的に断片化され、Fab及びFc部分の全体的な機能活性が低下する。したがって、プロテアーゼ処理された免疫グロブリンは、修飾されていないとみなすことはできない。また、この調製方法では、分子量100kD未満の断片が約5%生じる。

【0014】

オクタン酸処理を実施するための知られた方法(特許文献3及び6)は、非エンペロー

50

プウイルスの除去及び不活化に対してオクタン酸処理が有効ではなく、また、全てのタンパク質分解活性を実質的に除去するものではないという問題点を有する。

【0015】

特許文献7には、治療用途のための少なくとも33%のIgMを含む高濃度IgM調製物が開示されており、前記調製物は、同種凝集素力価を実質的に有しない。この特許出願では、オクタン酸を添加することによりオクタン酸沈殿が実施され、同種凝集素は、Synsorbアフィニティクロマトグラフィーにより除去される。最終調製物は、凍結乾燥させる必要があった。

【0016】

総じて、免疫グロブリンが化学的に若しくは酵素的に修飾されている、クロマトグラフィーにより更に精製される、及び穏やかな熱処理に付される、のうちの少なくとも1つにより、抗補体活性の低いIgM含有調製物の調製が可能である。

【0017】

それにもかかわらず、修飾されていない免疫グロブリン調製物に関する先行技術の方法は、潜在的に存在するあらゆるウイルスのためのウイルス不活化能を達成することはできない。エンベロープウイルスの不活化又は除去には、溶剤/界面活性剤処理、オクタン酸処理、ナノ濾過、及び熱処理等の幾つかの方法が有効であるが、例えば、パルボウイルス等の非エンベロープウイルスを不活化又は除去するための方法は、僅かしか知られていない。これら非エンベロープウイルスは、多くの場合非常に小さく、通常20nm超の孔径のナノフィルタを通過する。この孔径は、30nm以下の直径を有するIgM分子には小さすぎる。非エンベロープウイルスは、プロピオラクトン等の化学物質により有効に不活化されるが、機能の低下した修飾免疫グロブリンも生じさせる。別の有効な処理は、UV照射(特許文献8、CAF-DCF)である。しかし、知られた溶剤/界面活性剤処理、オクタン酸処理、及び穏やかな熱処理は、非エンベロープウイルスに対して実質的に効果を有しない。

【0018】

したがって、先行技術の方法によって調製され且つ抗補体活性が低下した化学的に修飾されていないIgM含有調製物はいずれも、パルボウイルスなど非エンベロープウイルスに関して、ヒトへの使用において安全なものではない。

【0019】

要約すると、静脈内用途に忍容なIgM含有調製物を得る先行技術の方法は、例えば、効果的に非エンベロープウイルスを不活化又は除去することができない、高量のIgMを溶液中に維持しながらタンパク質分解活性を取り除く能力に制限がある、などの問題点を有する(タンパク質分解活性は、調製物中に存在しているプロテアーゼの合計量を意味する)。液体タンパク質調製物は、長期間(例えば、2年間)安定である必要があるため、医薬組成物の分解を引き起こし得る残存プロテアーゼ活性を取り除かなくてはならない。

【0020】

したがって、本発明の目的は、これらの問題点に対処することにある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0021】

【特許文献1】欧州特許第0013901号明細書

【特許文献2】欧州特許第0352500号明細書

【特許文献3】欧州特許第0413187号明細書(Biotest)

【特許文献4】欧州特許第0413188号明細書(Biotest)

【特許文献5】欧州特許第0450412号明細書(Miles)

【特許文献6】欧州特許第0835880号明細書(米国特許第6136312号明細書、ZLB)

【特許文献7】欧州特許第0345543号明細書(Bayer、Miles)

【特許文献8】欧州特許第1842561号明細書

10

20

30

40

50

【非特許文献】

【0022】

【非特許文献1】M. Wickerhauser et al. "Large Scale Preparation of Macroglobulin", Vox Sang 23, 119 - 125 (1972)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0023】

第1の態様において、本発明は、免疫グロブリンを含む血漿画分からIgM含有免疫グロブリン組成物を調製するためのプロセスであって、

- (a) 血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として準備する工程；
 (b) C₇～C₉カルボン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；
 (c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る工程、
 を含むプロセスを提供する。

【0024】

驚くべきことに本出願人は、免疫グロブリン溶液をカルボン酸と混合する工程における振動式攪拌機の使用が、非常に有利であることを見出した。該工程により、望ましくないタンパク質（プロテアーゼなど）がより効率的に除去され、免疫グロブリン製剤を製造するために行われる下流の処理工程により適した中間生成物が得られる。即ち、該中間生成物は、これら下流の処理工程をより効率的にする。特に、工程(c)で得られるIgM含有免疫グロブリン組成物は、穏やかな酸性条件での処理、UVC照射による処理などの更なる処理工程に付すことができ、これにより、静脈内投与に適した、次の有利な性質、
 (i) 化学的に修飾されていないこと；(ii) ウィルス安全性を有すること；(iii) タンパク質分解活性が低いこと（そのため、長期保存安定性を有すること）；(iv) 抗補体活性が低いこと；(v) ネイティブで活性のあるIgMを高レベルに維持すること、という性質を有するIgM含有免疫グロブリン製品又は抗体調製物が製造される。本明細書に記載の方法で達成されるウィルス安全性のレベルは、これまで得られなかったレベルである。更に、本発明の方法を用いることにより、これまで得られなかった、これら特徴を組合わせて有するIgM含有免疫グロブリン製品又は抗体調製物が得られる。

【0025】

特に、本発明の方法の工程は、ウィルス粒子の不活化率及び除去率をより高め、特にパルポウィルスなどの耐性の高い非エンベロープウィルスの不活化率及び除去率を高める。これらのウィルスは、通常、オクタン酸処理に対する感受性があまりない。更に、従来の攪拌に比べて、タンパク質分解活性をよりよく取り除くことができる。これらの特徴は、化学的に修飾されていないIgMの量を高く維持しながら達成される。この知見は、オクタン酸による処理は、非エンベロープウィルスに対して有効な工程ではなく、ウィルス安全性を改善するためには、 α -プロピオラクトン処理などのより過酷な方法でウィルスを不活化しなければならないという従来の見解と対照的である。また、タンパク質分解活性を完全に取り除くために例えばオクタン酸濃度を上げることが、多量のIgMを失うことになることは、よく知られていた。

【0026】

本発明のこのような結果は、オクタン酸処理と組合わせて振動式の混合装置を使用することで達成される。IgMは、不所望の高い抗補体活性をもたらす断応力に対して感受性が非常に高いことが知られているので、この事実は、特に驚くべきことである。したがって、IgM組成物を調製するために振動式混合機を用いることは、誰も考えないであろうし、IgM含有溶液の処理に振動式混合機を用いることでこのような望ましい影響を期待する者もないであろう。

【0027】

更に、本発明の方法において、工程（b）で得られるオクタン酸処理済溶液の濾過による清澄化などの工程（c）で達成される分離は、振動式混合装置を用いることで向上する。分離がより容易に達成されると、処理時間が短縮され製造コストが低減する。工程（c）により、下流の処理に有利な透明溶液が得られる。オクタン酸処理済IgM含有溶液を攪拌し濾過して得られる従来の溶液は、乳白色又は不透明である。

【0028】

工程（c）で得られるIgM含有組成物は、穏やかな酸性条件（例えば、pH4）での処理及びUV照射工程に付して、ウィルス安全性を更に高めると共に最終産物を安定化させることが好ましい。工程（c）で得られたIgM含有免疫グロブリン組成物の清澄度を高めることにより、 $3 \log_{10}$ 超又は $4 \log_{10}$ 超の非エンベロープウィルスを不活化するために必要なUV照射時間を短縮することが可能である。これにより、UV照射後のネイティブで活性のあるIgMの量がより多くなる。

10

【0029】

驚くべきことに、これらの工程により、ネイティブで活性のあるIgMが高量であり、抗補体活性が低く、タンパク質分解活性が低く、抗菌活性及び抗ウィルス活性が高く、静脈内投与用の医薬にとって重要な特徴であるエンベロープウィルス及び非エンベロープウィルスに関する顕著なウィルス安全性を有する、化学的にも酵素的にも修飾されていないIgM含有溶液が得られる。更に、処理されたIgM含有溶液は、改善された長期安定性を有し、2～8で12ヶ月間を超える期間、溶液として非常に安定である。

20

【0030】

したがって、更なる態様において本発明は、上述の本発明のプロセスで得られる抗体調製物、及びタンパク質分解活性が8U/L未満であるIgM含有抗体調製物を提供する。特に、前記抗体調製物は、ヒトにおける静脈内投与に適しており、IgG、IgA、及びIgMを含み、免疫グロブリンの総量の少なくとも5%がIgMである。

【0031】

更に本発明は、医薬において使用するための本発明の抗体調製物を提供する。一実施形態においては、前記抗体調製物は、免疫障害又は細菌感染症の治療において使用される。

【0032】

更なる態様において、本発明は、本発明の抗体調製物を投与することを含む患者の治療方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】

【0033】

添付の図面を参照して、本発明をより詳細に説明するが、以下の説明はほんの1例に過ぎない。

【0034】

【図1】図1は、本発明に係る静脈内投与に適した抗体調製物を得るために用いることができる各工程を示す本発明の一実施形態の概要である。このうち、振動式混合機を用いるオクタン酸処理、pH4処理、及びUV照射処理がハイライトされている。出発材料は、ヒト血漿の標準的な低温エタノール沈殿プロセスにより得られる。

40

【発明を実施するための形態】

【0035】

上述したように、本発明は、免疫グロブリンを含む血漿画分からIgM含有免疫グロブリン組成物を調製するためのプロセスを提供する。免疫グロブリン医薬組成物の調製に適した血漿画分及びそれらの製造方法は当技術分野においてよく知られている。特に、前記免疫グロブリン医薬組成物がヒトに投与するためのものである場合には、前記血漿画分は、ヒト血漿から得られる。前記血漿画分は、沈殿した血漿画分が好ましく、Cohn分画法又はそのよく知られた改良法（例えば、Kistler-Nitschmann）のプロセスにより得られた沈殿血漿画分が最も好ましい。前記画分は、低温エタノール分画法により得られる画分I/III又は画分III（画分B+I又は画分Bとしても知られる

50

)が最も好ましい。前記血漿画分の免疫グロブリンは、少なくとも5%のIgMを含むことが好ましい。

【0036】

工程(a)は、血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として準備することを含む。多くの場合、免疫グロブリンの含有する血漿画分は、固体又は半固体の形態となる。したがって、この工程の目的は、前記血漿画分のタンパク質を確実に工程(b)におけるカルボン酸との混合に適した状態にする、又はそのような状態になるように前記血漿画分のタンパク質を溶液状にすることである。この工程は、血漿画分を好適なバッファと混合することを含んでいてもよい。バッファのモル濃度は低いことが好ましく(即ち、1M未満)、pHは4.5~5.5であることが好ましい(例えば、0.1M酢酸ナトリウムバッファ、pH 5.05±0.1)。混合は、ブレードミキサー又は振動式攪拌機を用いて完了させることができる。

10

【0037】

工程(b)においては、工程(a)で得られた溶液をC₇~C₉カルボン酸と振動式攪拌機を用いて混合し、混入タンパク質(例えば、プロテアーゼ、ウィルスなど)を沈殿させる。前記カルボン酸は、分岐していてもよいし、工程(b)の効果を実質的に変えることがない置換基を有していてもよいし、分岐しており且つそのような置換基を有していてもよい。前記カルボン酸は、オクタン酸が好ましい。前記カルボン酸は、少なくとも0.075kg/kg血漿画分の濃度、多くても0.2kg/kg血漿画分の濃度で添加されることが好ましい。前記カルボン酸は、0.8kg/kg血漿画分~0.15kg/kg血漿画分で添加されることがより好ましく、0.09kg/kg血漿画分~0.13kg/kg血漿画分で添加されることが最も好ましい。酸のモル濃度を適宜調整することで正確な濃度に行うことができる。

20

【0038】

振動式攪拌機は、化学品/医薬品業界での使用に好まないかなる種類の市販の振動式攪拌機も用いることができる。好適な振動式攪拌機としては、例えば、Grabber+Pfenniger有限会社から市販されている。特に、「Labormodell Typ 1」振動式混合機は実験室規模の実験に用いることができ、「Industriemixer Typ 4」は生産規模の調製に用いることができる。前記振動式混合機は、製造業者の説明書に従って、特にタンパク質を含有する溶液の混合に好適であるとして製造業者によって記載されている設定で用いることができる。前記振動式混合機は、通常、100Hz未満、振幅10mm未満で運転させることができる。例えば、本発明者らは、「Labormodell Typ 1」を用いる実験室規模での振動混合を、230V電源を用いる場合には、50Hzで行った。前記混合プロセスの振動振幅は、0mm~3mmとし、IgM調製物の場合には、好ましい振幅である3mmとした。直径23mm~65mmの攪拌プレートを実験室規模の実験に用いた。生産規模では、直径395mmの攪拌プレートを用いた(孔径:13.5mm~16mm)。

30

【0039】

工程(b)においては、混合溶液のpHは、4.5~5.5が好ましく、4.8~5.3がより好ましい。この工程は、酢酸ナトリウムバッファ中で行うことができ、例えば、約0.1M酢酸ナトリウムバッファが用いられる。工程(b)を行う際の温度は、10~35℃が好ましく、14~30℃がより好ましい。

40

【0040】

振動式攪拌機による混合時間は、特に限定されないが、少なくとも30分間~最長3時間であることが好ましく、40分間~110分間であることがより好ましい。インキュベーション時間が30分間未満であると、ウィルスの不活化レベルが低下することがある。

【0041】

工程(b)の一実施形態においては、リン酸三カルシウムを工程(b)における前記溶液と混合する。これは、0.01kg/kg血漿画分~0.02kg/kg血漿画分で添加されることが好ましい(リン酸三カルシウムは、固体又は半固体の形態であるので)。

50

リン酸三カルシウムは、カルボン酸と同時に、別々に又は順次添加することができる。好ましい実施形態においては、リン酸三カルシウムは、カルボン酸の添加後少なくとも20分間の間に添加される。

【0042】

工程(c)では、工程(b)で沈殿させた混入タンパク質を前記溶媒から分離除去してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る(即ち、免疫グロブリン含有溶液)。この分離工程は、特に限定されず、当技術分野で知られたいかなる好適な方法によっても行うことができる。しかしながら、前記分離工程は、濾過により行うことが好ましく、限外濾過により行うことがより好ましい。したがって、工程(c)の結果物は、濾過溶液である。

【0043】

上述したように、本発明の方法は、混入タンパク質をより効率的に沈殿させ、その結果、工程(c)が実施し易くなるので、製造効率の点で有利である。工程(b)の結果得られる混合物を分離すると、透明で清澄な溶液、即ち、IgM含有免疫グロブリン組成物が得られる。したがって、濾過は、より迅速且つより容易になる。

【0044】

後続の処理工程は、工程(c)で得られたIgM含有免疫グロブリン組成物を静脈内投与に適した免疫グロブリン調製物にするために必要である。

【0045】

したがって、好ましい実施形態においては、本発明のプロセスは、工程(c)で得られたIgM含有免疫グロブリン組成物を穏やかな酸性条件で処理する更なる工程、また、酸処理済組成物をUV照射に付す更なる工程を含む。

【0046】

穏やかな酸性条件での処理のために、工程(c)で得られた前記IgM含有免疫グロブリン組成物をpH3.5~pH4.5、好ましくはpH3.8~pH4.2でインキュベートして、インキュベート溶液を得る。穏やかな酸性条件は、好適な酸をIgM含有免疫グロブリン組成物に添加することにより達成できる。例えば、0.2M HClを添加してpHを調整することができる。

【0047】

このインキュベーション工程は、32~42で行うことが好ましく、35~39で行うことがより好ましい。インキュベーション時間は、少なくとも2時間~最長24時間であることが好ましく、少なくとも9時間~最長16時間であることがより好ましい。

【0048】

前記照射工程では、上述の穏やかな酸処理により得られたインキュベート溶液をUV光で処理してUV照射溶液を得る。この工程は、UVivatic(登録商標)装置(Bayer Technology Services社製)などの市販の装置を用いて行うことができる。潜在的に存在するウイルス及びプロテアーゼを更に不活化するためには、前記インキュベート溶液は、254nm±10nmで200J/m²~500J/m²、より好ましくは200J/m²~300J/m²で処理することが好ましい。なお、通常必要とされるよりも穏やかな条件でのUV処理は、振動攪拌によるオクタン酸処理後に本発明によって得られる清澄な濾液で初めて可能となる。標準的な攪拌技術で通常得られる、より乳白色又は不透明な溶液の場合には、照射時間をより長くする必要があり、IgM活性の変性を促進すると共にウイルス不活化率を低下させ得る。

【0049】

前記穏やかな酸処理及びUV照射のほかに、静脈内投与用の免疫グロブリン調製物を得るための追加の工程として、一回以上の濾過工程を任意に行うことができる。一実施形態においては、処理されるタンパク質溶液をDEAE Sephadex(登録商標)に吸着させた後、深層濾過によりSephadexから分離することができる。望ましくない付随タンパク質であるセルロプラスミンを除去するために、例えば、タンパク質溶液を75mg/kg DEAE Sephadex、pH5.8でバッチ式吸着に更に付しても

10

20

30

40

50

よい。

【0050】

特に好ましい実施形態においては、UVC照射処理に先立ち、穏やかな酸処理により得られたインキュベート溶液をDEAE Sephadexに吸着させ、深層濾過により前記Sephadexから分離する。

【0051】

他の実施形態においては、処理される免疫グロブリン溶液をナノメートルフィルタで濾過してもよい。孔径 $75\text{ nm} \pm 5\text{ nm} \sim 35\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ のフィルタ、又は公称孔径 $75\text{ nm} \sim 35\text{ nm}$ のフィルタ（例えば、Pall社製、Ultipor（登録商標）DV50）を前記プロセス中の各段階で用いることができる（例えば、公称孔径 50 nm は、 50 nm 以上の大きさのウイルスに対して保持率 $4\log_{10}$ 以上であることを意味する）。好ましい実施形態においては、上記段落に記載したDEAE Sephadex工程から得られた溶液を、UVC照射に先立ち $0.2\text{ }\mu\text{m}$ フィルタで濾過する。更に好ましい実施形態においては、UVC照射後に得られた免疫グロブリン溶液をナノ濾過、好ましくは孔径 $40\text{ nm} \sim 50\text{ nm}$ のフィルタを用いるナノ濾過に付す。この工程は、滅菌条件下で行われることが好ましい。

10

【0052】

上に定義したプロセスにより得られた最終抗体調製物（即ち、処理されたIgM含有免疫グロブリン溶液）は、滅菌条件下でそのまま容器に充填してもよい。或いは、前記抗体調製物は、グリシンなどの安定化剤と共に製剤化してもよい。特に、前記調製物は、 $\text{pH } 4 \sim \text{pH } 5.5$ 、好ましくは $\text{pH } 4.1 \sim \text{pH } 4.5$ でグリシン含有バッファ中で製剤化してもよい。前記抗体調製物はまた、 $40\text{ g/L} \sim 80\text{ g/L}$ のタンパク質濃度、好ましくは $55\text{ g/L} \sim 70\text{ g/L}$ のタンパク質濃度に希釈してもよい。

20

【0053】

本発明の方法は、調製物中の抗体の化学的修飾、酵素的修飾、及び熱処理（例えば、10分間以上の $40\text{ }^\circ\text{C}$ 以上での抗体の処理など）の1つ以上を伴う工程を含まないことが好ましい。本発明のプロセスは、抗体をプロピオラクトン及びペプシンの少なくともいずれかに接触させる工程を含まないことがより好ましい。

【0054】

本発明は更に、上述のプロセスにより得られる免疫グロブリン調製物又は抗体調製物を提供する。前記免疫グロブリン調製物は、ポリクローナルであり、少なくとも5%のIgM、好ましくは少なくとも15%のIgM、最も好ましくは少なくとも20%のIgMを含むことができる。その他の免疫グロブリンは、IgGとIgAである。前記免疫グロブリン調製物は、5%～30%のIgM（最も好ましくは15%～30%）、5%～30%のIgA（最も好ましくは15%～30%）、及び40%～70%のIgG（最も好ましくは45%～70%）を含むことが好ましい。最も好ましい製品においては、IgG含量が約50%であり、IgM含量とIgA含量がそれぞれ約25%である。これらの値は、例えばIgG + IgA + IgMの合計に対するIgMなどのパーセンテージを意味する。しかしながら、陰イオン交換クロマトグラフィーなどのよく知られた方法で、IgM含量を更に上げることもできる。これらの値は、比濁分析法又はPh.Eur.（現行版（2010）2.9.17）に基づく免疫沈降法により測定することができる。

30

40

【0055】

特に、前記免疫グロブリン調製物中の免疫グロブリンは、化学的に修飾されていない。前記免疫グロブリン調製物は、その製造プロセスにおいて、当該製品を滅菌するためにプロピオラクトンなどの化学物質で処理されたものではない。同様に、前記調製物は、当該製品を滅菌するためにペプシンなどの添加されたプロテアーゼで処理されたものではない。したがって、前記免疫グロブリンは、実質的にネイティブの形態である。

【0056】

前記抗体調製物は、先行技術における抗体調製物よりもタンパク質分解活性が低い。特に、 $2 \sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ で保存したときに、前記調製物にタンパク質分解活性が検出されない。タ

50

タンパク質分解活性は、以下のアッセイの項目及び実施例6に記載される発色性基質を用いる方法など、当技術分野において知られた標準的な試験方法により測定することができる。かかる方法において、タンパク質分解活性は、発色基質（特に、少なくとも1つのセリンプロテアーゼに対して感受性である発色基質）と37の抗体調製物のサンプル（通常、バッファで希釈して線形範囲でアッセイできるようにする）とを混合し、分光光度計を用いて吸収速度をモニタリングすることによりアッセイすることができる。サンプルのタンパク質分解活性は、方程式 $C(U/L) = S \times Abs / 分 \times F$ （ C = タンパク質分解活性； S = 発色基質の特異的吸光変化に関する変換係数；及び F = 希釈倍率）を用いることにより、初期吸収差（ $Abs / 分$ ）から計算される。基質の使用は、製造業者の説明書に従う。

10

【0057】

タンパク質分解活性は、具体的には、以下の工程でアッセイすることができる：

(a) 25 mgの基質 *S-2288*（*Chromogenix*社製）を7.2 mLの注射用水に溶解させる；

(b) 抗体調製物のサンプルをバッファ（100 mMの *Tris-HCl*（pH 8.4）、106 mMの *NaCl*）で希釈して、線形範囲でアッセイできるようにし、温度を37に調整する；

(c) 等量（例えば、200 μ L）の希釈された抗体調製物と溶解した基質とを混合する；

(d) 分光光度計を用いて37で1分間～3分間、405 nmで吸収速度を測定する；

(e) 方程式 $C(U/L) = 313 \times Abs / 分 \times F$ （ C = タンパク質分解活性、 F = 希釈倍率）を用いることにより初期吸収差（ $Abs / 分$ ）からタンパク質分解活性を計算する。

20

【0058】

この方法の定量限界は、8 U/Lであり、本発明の抗体調製物のサンプルは検出不可能である。したがって、本発明の最終産物におけるタンパク質分解活性のレベルは、8 U/L未満である。

【0059】

当技術分野において知られた調製物と同様に、本発明の抗体調製物は、5 \pm 3で保存することができる。しかしながら、本発明の方法による効率的な精製により、前記抗体調製物の安定性は非常に優れている。最終産物は、2～8で少なくとも3ヶ月間、好ましくは6ヶ月間、最も好ましくは2年間、液状で安定である。これは、HPLCで測定される1.5%超のIgMの断片化及び重合化がないこと、タンパク質分解活性の上昇がないこと、*Escherichia coli*に対するIgM抗体活性及び*Pneumococcus saccharide*に対するIgM抗体活性の25%超の低下がないこと、抗補体活性の25%超の上昇がなく、1 CH50/mgタンパク質未満を維持していることを意味する。更に、本発明の方法により製造される最終産物は、同一の基準で評価されたときに、室温（23～27）で少なくとも3ヶ月間、好ましくは6ヶ月間、最も好ましくは1年間、液状で安定である。

30

【0060】

本発明のプロセスは更に、先行技術のプロセスよりも高いレベルのウィルス除去を提供し、これにより、特にパルボウィルスなどの活性な非エンベロープウィルスに関して、先行技術の抗体調製物よりも安全な抗体調製物が得られる。本発明の方法は、3 log₁₀超、好ましくは4 log₁₀超、最も好ましくは5 log₁₀超のウィルス、特に非エンベロープウィルスを除去/不活化することができる。これにより、ウィルスを実質的に含有しない抗体調製物、特に非エンベロープウィルスを実質的に含有しない（即ち、ウィルス安全性を有する）抗体調製物となる。更に、本発明の方法は、前記抗体調製物の活性IgMの量と抗補体活性のいずれに対しても大きな影響を与えることなく、前記レベルのウィルス粒子除去/不活化を達成することが可能である。したがって、エンベロープウィルス及び非エンベロープウィルスに関してウィルス安全性を有し、少なくとも15%、より好

40

50

ましくは少なくとも20%のIgMを含有し、抗補体活性が1CH50/mgタンパク質以下である抗体調製物が得られる。

【0061】

本発明の抗体調製物は、医薬における使用に適しており、免疫障害及び感染症、特に、IgM欠乏症及び細菌感染症の治療に用いることができる。本発明のプロセスにより調製することができる静脈内投与用ヒトIgM富化多価免疫グロブリン調製物は、多価免疫グロブリンG調製物に比べて、臨床的に重要なグラム陰性菌及びグラム陽性菌に対する抗体力価が高く、且つグラム陰性菌のエンドトキシン及びグラム陽性菌のエンドトキシンに対する抗体力価も高い。

【0062】

特に、本発明の抗体調製物は、患者への静脈内投与に適しており、特にヒトにおける静脈内注射に適している。

【0063】

本発明はまた、本発明の抗体調製物を患者に投与することを含む患者の治療方法を提供する。特に、前記患者は、免疫障害又は細菌感染症に罹患している患者である。より好ましい実施形態においては、前記抗体調製物は、静脈内投与される。

【0064】

本発明をより詳細に説明するが、以下の説明はほんの一例に過ぎない。

【実施例】

【0065】

抗補体活性を測定するための試験方法について

抗補体活性を測定するためのアッセイは、欧州薬局方(方法2.6.17, Ph. Eur. 6. Edition, 2008)に記載の方法に従って行った。

【0066】

ヘモリシンで前処理したヒツジ赤血球を補体により溶血させる。サンプル中の補体結合抗体により、溶血を抑制する。1mgの免疫グロブリンに結合している(不活化されている)補体の量を求める。

【0067】

一定量の免疫グロブリン(10mg)とモルモットの補体とを混合し、遊離補体を滴定する。抗補体活性は、レファレンス溶液中の使用された補体に対する、使用された補体として表される。補体活性の溶血単位(CH50)は、最適なバッファ条件において、合計 5×10^8 個の赤血球のうち、最適に調製された赤血球を 2.5×10^8 個溶血させる補体の量である。

【0068】

最適に調製された赤血球(ヒツジ由来の安定化赤血球8mLをゼラチン-バルビタール-バッファで3回洗浄し、最後に赤血球沈殿物1mLをゼラチン-バルビタール-バッファ24mLに懸濁させる)は、20mLの赤血球懸濁液と20mLのヘモリシン(2MHE/mL(最低溶血単位)に調整されている)とを混合し、37で15分間インキュベートすることにより調製する。

【0069】

10mgの免疫グロブリンをゼラチン-バルビタール-バッファ(バルビタールバッファ1L中ゼラチン1g(pH7.3)、5倍バルビタールバッファ溶液:水2L中塩化ナトリウム83g、バルビタールナトリウム10.192g(pH7.3))で希釈する。最終体積が1mLになるように、200µLの補体100CH50/mLを添加する。37で1時間、振盪させながら試験管をインキュベートする。サンプルを希釈し、最適に調製された赤血球に対して滴定する。37で1時間インキュベートした後、サンプルを遠心分離し、541nmの波長で分光光度計を用いることにより吸光度を求める。

【0070】

実施例1 - 画分I/IIIからのIgMを富化した調製物の調製

ヒト血漿の低温エタノール分画から得られたCohn画分I/III 180kgを0

10

20

30

40

50

・ 1 M酢酸ナトリウムバッファ (pH 5 . 0 5) 7 2 0 L に懸濁させ、懸濁温度 (2 2 ± 4) に達した後 1 5 分間 ~ 3 0 分間混合する。

【 0 0 7 1 】

室温のオクタン酸 (用いたペースト I / I I I 1 k g 当たり 0 . 1 1 0 k g) 1 9 . 8 k g を添加することにより溶液を処理し、振動式混合機 (V i b r o m i x e r (登録商標)、サイズ - 4、G r a b e r + P f e n n i g e r 有限会社製、レベル 2 ~ 3 に調整された V i b r o m i x e r) を用いてタンパク質溶液を更に 8 0 分間混合する。オクタン酸は、3 0 分間かけてゆっくりと添加する。

【 0 0 7 2 】

約 3 k g のリン酸三カルシウム ($C a_3 (P O_4)_2$) を添加し、タンパク質溶液を少なくとも 1 5 分間更に混合する。フィルタプレスを用いて清澄濾過することにより沈殿物を除去する。更に 0 . 2 μ m 濾過を実施し、タンパク質溶液を 1 0 k D の膜を用いる限外濾過に付す。タンパク質溶液を 0 . 0 4 M の N a C l で透析し、その後、タンパク質濃度を 4 0 g / L に調整する。

10

【 0 0 7 3 】

注射用水で 1 + 1 希釈した後、タンパク質溶液を pH 4 . 0 ± 0 . 1 で処理する。pH の調整は、1 M の H C l を用いて行い、タンパク質溶液は、3 7 ± 2 で 9 時間インキュベートする。pH 4 でのインキュベーションの後、タンパク質溶液の pH を 1 M の N a O H を用いて 5 . 8 に調整する。バッチ方式で D E A E S e p h a d e x を添加することにより (タンパク質 1 k g 当たり D E A E S e p h a d e x 7 5 g)、得られたタンパク質溶液を更に精製する。タンパク質溶液を室温で 6 0 分間以上攪拌しながらインキュベートする。清澄濾過により D E A E S e p h a d e x を除去する。タンパク質溶液を 0 . 2 μ m 濾過に付す。

20

【 0 0 7 4 】

タンパク質溶液を 0 . 1 μ m のフィルタ及び P a l l 社製、U l t i p o r V F D V 5 0 , 2 0 " フィルタに通して濾過する。U V C 線量 2 4 0 J / m² で、フロースルー U V i v a t e c 処理装置 (B a y e r T e c h n o l o g y S e r v i c e s 社 / S a r t o r i u s S t e d i m 社製) を用いて、2 5 4 n m で U V C 光処理することにより濾液を更に処理する。製造業者の説明書に従って U V C 反応機を通過する流速を計算する。照射されたタンパク質溶液を、限外濾過によりタンパク質濃度が 5 0 g / L ~ 7 0 g / L になるように濃縮し、透析 (1 0 k D の膜、0 . 3 2 M のグリセリンバッファ (pH 4 . 3) を用いる) に付す。最終産物を 0 . 2 μ m のフィルタに通して濾過し、2 ~ 8 で保存する。

30

【 0 0 7 5 】

実施例 2 - オクタン酸処理工程における条件の検討

オクタン酸処理に関して、実施例 1 に記載の方法を用いて以下の実験範囲について、また実験範囲を互いに組み合わせて試験した (結果は示さない)。

- オクタン酸の量 : 0 . 0 9 k g / k g ~ 0 . 1 3 k g / k g (用いた画分 I / I I I 1 k g 当たりのオクタン酸量) (1 2 0 m M ~ 1 8 0 m M のオクタン酸)
- オクタン酸処理の pH : pH 4 . 8 ~ pH 5 . 3
- 反応の温度範囲 : 1 4 ~ 3 0
- インキュベート時間 : 4 0 分間 ~ 1 1 0 分間

40

【 0 0 7 6 】

試験した全ての条件で、更に処理するための清澄化が容易であり、且つタンパク質分解活性が、懸濁 C o h n 画分 I / I I I 中数百 U / L から著しく低下している中間体が得られる。これら中間体から、定量限界である 8 U / L (下記実施例 6 に記載の通り計算) 未満のタンパク質分解活性を有する最終産物が得られる。

【 0 0 7 7 】

実施例 3 - V i b r o m i x e r の使用によるウイルスの減少 - オクタン酸処理に V i b r o m i x e r を用いる場合及び用いない場合のウイルス除去係数の決定

50

250 mLの懸濁画分I / I I IをpH 5.05及び22 で30分間ホモジナイズした。懸濁液を2.6 mLのウイルス原液を加えた。オクタン酸を添加し(110 g / kg)、Vibromixerを用いて60分間ホモジナイズした。平行して、同じ混合物を標準的な攪拌機でホモジナイズした。60分間後、リン酸三カルシウム(0.15 g / kgオクタン酸)を添加し、懸濁液を15分間攪拌した。フィルタディスクを用いて深層濾過により懸濁液を清澄化した。フィルタディスクは、70 mL ~ 80 mLのバッファで予めすすいでおいた。濾過後、80 mLのバッファでフィルタをすすいだ。濾液及び洗浄液をプールし、ウイルス滴定のためのサンプルを抜き取った。

【0078】

SV40、Reo、及びPPV(CV-1、CCL-7.1、及びPK13)について適切な指示細胞において、オクタン酸の添加前及び濾過後に採取したサンプルのウイルス力価を求めた。最後に、ウイルス検証研究に関する現行の指針に従ってウイルス除去係数を計算した。

10

【0079】

ウイルス検証研究では、SV40及びReo等の非エンベロープウイルスは、それぞれ4 log₁₀超及び5 log₁₀超のオーダーで効果的に除去された。更に、PPVは、3 log₁₀超除去された。これら値は、Vibromixerを用いずに標準的な攪拌条件下で同じオクタン酸処理を行ったときの10倍~1,000倍高い値である。

【表1】

	オクタン酸反応 標準的な攪拌 [log ₁₀ 減少]	オクタン酸反応 Vibromixerで攪拌 [log ₁₀ 減少]
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

20

表1: Vibromixerを用いた及び用いなかったオクタン酸処理
についてのウイルス減少係数(log₁₀)の比較

30

【0080】

実施例4 - UVC処理の評価

UVC照射線量の最適範囲について評価した。非エンベロープウイルスについて少なくとも4 log₁₀不活化するための最低必須線量と、Fabの抗原に結合する機能を低下させ且つ補体活性化に影響を与えるFcの機能を低下させるIgM分子の変性を避けるための最高耐性線量とのバランスがある。200 J / m² ~ 400 J / m²の範囲では、免疫グロブリンの凝集体の僅かな増加がみられ、断片含量に対する著しい影響はなかった。

【0081】

実験のために、オリジナルのタンパク質溶液の吸光度(OD)を用いて、BTSより提供されるExcelシート(customer Master Calculation Sheet UVivatec Lab IIバージョン3.0)を用いてUVivatecラボシステムにおける流速を計算する。ランプの性能、UVシグナルランプセンサの設定点、及び望ましいUVC照射線量を考慮して、流速を計算する。

40

【0082】

シグナルフロースルーについて200 J / m²の線量を得るために、流速5.8 L / hでUVivatecシステムを通過するように、タンパク質含量が約55 g / LであるIgM含有溶液(Batch 86GB005BE07)をポンプで送った。流速3.9 L / m²で前記システムを通過するようにタンパク質溶液をポンプで送ることにより、300 J / m²の線量を得た。流速2.9 L / m²で前記システムを通過するようにタンパク質溶液をポンプで送ることにより、400 J / m²の線量を得た。

50

【表2】

		UVCを照射し なかったIgM産 物	UVC200J/m ² 照射後のIgM 産物	UVC300J/m ² 照射後のIgM 産物	UVC400J/m ² 照射後のIgM 産物
タンパク質含量	g/L	56.3	56.2	57.6	54.4
IgG含量(比濁分析)	%	56.1	55.5	55.7	54.9
IgA含量(比濁分析)	%	20.1	20.6	20.5	20.7
IgM含量(比濁分析)	%	23.7	23.9	23.7	24.4
HPSEC					
凝集体>1200 kD	面積%	1.9	2.6	3.3	4.0
断片<100 kD	面積%	0.66	0.73	0.76	0.79
ACA	CH50/mg タンパク質	0.68	0.48	0.46	0.46
PA	U/L	< 8	< 8	< 8	< 8

表2: 濃縮最終産物中におけるUVC処理前及び後の活性及び力価測定についての分析結果

【0083】

200 J/m² ~ 400 J/m² の範囲では、免疫グロブリン含量、タンパク質分解活性、又はACAについて有意な差はみられなかった。非エンベロープウイルスを不活化するには200 J/m² で十分であり、且つ300 J/m² で凝集体の形成及び抗体力価に対する著しい影響がみられなかったため、線量の好ましい範囲を200 J/m² ~ 300 J/m² に設定した。好ましい線量は、225 J/m² である。

【0084】

シングルフロースルーについて200 J/m² ~ 300 J/m² の線量を得るために、流速5.8 L/hでUVivatecシステムを通過するように、タンパク質含量が8 g/L ~ 12 g/Lである希釈したIgM含有溶液(Batch 86BB059BE07)をポンプで送った。

【表3】

Batchフラクション/III 86BB059BE07		UVC前	UVC: 200 J/m ²	UVC: 225 J/m ²	UVC: 250 J/m ²	UVC: 300 J/m ²
タンパク質	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						
凝集体>1200kD	%	0.20	0.39	0.54	0.3	0.47
断片<100kD	%	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
ACA	CH50/ mg タンパク質	0.1	0.08	0.1	0.1	0.18
抗大腸菌 O1:K1 - IgG	U/mg	24.7	20.5	18.9	19.5	20.2
抗大腸菌 O1:K1 - IgA	U/mg	9.4	9.5	9.5	9.1	8.9
抗大腸菌 O1:K1 - IgM	U/mg	14.1	13.0	15.1	13.9	13.4
抗カンダアルヒカス - IgG	U/mg	15.6	16.8	17.9	17.3	17.0
抗カンダアルヒカス - IgA	U/mg	11.3	11.6	10.5	10.3	10.4
抗カンダアルヒカス - IgM	U/mg	13.8	13.3	13.7	13.9	13.1
抗エンテロコッカスフェカリス - IgG	U/mg	13.0	15.5	13.5	14.8	15.0
抗エンテロコッカスフェカリス - IgA	U/mg	11.3	10.5	10.1	9.7	9.6
抗エンテロコッカスフェカリス - IgM	U/mg	17.2	14.1	16.7	14.0	13.9
抗肺炎球菌多糖体 -IgG	U/mg	23.2	24.1	24.7	24.0	25.7
抗肺炎球菌多糖体 -IgA	U/mg	13.3	12.1	18.0	16.5	14.8
抗肺炎球菌多糖体 -IgM	U/mg	17.5	15.1	18.0	16.4	16.6

表3: UVC照射前及び様々なUVC線量を照射した後のIgM溶液についての分析結果

【0085】

この線量範囲内のUV照射では、免疫グロブリンのクラスの分布は影響を受けなかった

。H P S E Cにより分析した分子量分布パターンも変化しない。C Z Eにより分析した純度のレベルも変化しなかった。タンパク質分解活性(P A)、プレカリクレインアクチベータ(P K A)、及び抗補体活性(A C A)も変化しない。また、E L I S A法により測定した抗細菌活性は、全ての免疫グロブリンのクラスについて有意には変化しない。

【0086】

漸増強度のU Vを照射したアリコートを最終産物まで更に処理し、同パネルの分析試験に付した。この試験でも、最終産物に有意な差はみられなかった。試験した抗体力価は全て、常に、U V C処理していない対照調製物の $100 \pm 10\%$ の範囲内である。

【0087】

実施例5 - V i b r o m i x e r / p H 4 処理及びU V C 処理の使用による全体的なウイルス減少 - ウイルス除去係数の決定

以下の3工程：V i b r o m i x e rで撹拌しながらオクタン酸処理する工程と、p H 4 処理工程と、U V C 処理(215 J/m^2)工程とによるウイルス除去/不活化の検証を、以下のモデルウイルスを用いて実施した：C型肝炎ウイルスのモデルウイルスとしてのウシウイルス性下痢症ウイルス(B V D V)、ヒトヘルペスウイルスのモデルウイルスとしての偽狂犬病ウイルス(P R V)、ヒト免疫不全ウイルス(H I V - 1)、コロナウイルスとしてのウマ動脈炎ウイルス(E A V)、フラビウイルスのモデルウイルスとしてのシンドビスウイルス(S i n V)、A型肝炎ウイルスのモデルウイルスとしてのマウス脳脊髄炎ウイルス(M E V)、他の非エンベロープウイルスのモデルウイルスとしてのレオウイルス(R e o)、ヒトパルボウイルスB 19のモデルウイルスとしてのブタパルボウイルス(P P V)。

【0088】

以下の3工程：オクタン酸処理工程、p H 4 処理工程、及びU V C 処理工程を用いたこれら研究結果を以下の表2に示す。

【表4】

モデルウイルス	BVDV	PRV	HIV-1	EAV	SinV	MEV	Reo	PPV
合計減少量 (\log_{10})	>12.5	>10.1	>12.7	>8.4 ^a	>13.7 ^a	9.2	>11.0	>8.4

^a UVC照射工程の検証のためのデータを用いない減少係数

表4: IgM生産プロセスによる合計ウイルス減少量

【0089】

公称孔径約50nmのフィルタを用いて更にナノ濾過して、ウイルスのサイズに依存して $17 \log_{10}$ 超まで合計減少量を増加させることにより更に安全性を高める。例えば、H I V - 1では $17.5 \log_{10}$ 超に達したが、P P Vは、ナノ濾過を行ってもそれ以上除去されなかった。

【0090】

したがって、I g M含有調製物では現在までウイルス不活化/減少量が $8 \log_{10}$ 超に達しており、本発明に係る精製手順により優れたウイルス安全性を有するI g M調製物が得られる。これは、一般的に、サイズが小さく且つ脂質エンベロープが存在しないのでウイルス不活化及び除去手順に対する耐性が高いM E V、R e o、及びP P V等の非エンベロープウイルスにとって特に重要である。

【0091】

実施例6 - オクタン酸処理にV i b r o m i x e rを用いる場合及び用いない場合の残存タンパク質分解活性の測定

V i b r o m i x e rを用いずに、ブレードスターを用いて激しく標準的な撹拌を行いながら、実施例1及び並行実験と同様にオクタン酸処理を実施した。オクタン酸/リン酸三カルシウム処理及び限外濾過/透析後のサンプルのタンパク質分解活性を、製造業者の説明書に従って発色基質S - 2288 (C h r o m o g e n i x社製)を用いて測定した。25mgの基質S - 2288を7.2mLの注射用水に溶解させる。サンプルをバッ

10

20

30

40

50

ファ(100mMのTris/HCl(pH8.4)、106mMのNaCl)で希釈して、線形範囲でアッセイできるようにする。例えば、200μLのバッファと200μLのサンプル(混合及び37℃への温度調整)及び200μLの発色基質溶液とを混合する。分光光度計を用いて37℃で405nm(1分間~3分間)にて吸収動態を測定する。サンプルのタンパク質分解活性を、方程式 $C(U/L) = 313 \times Abs / 分 \times F$ (C = タンパク質分解活性、F = 希釈倍率)を用いることにより初期吸収差(Abs/分)から計算する。

【表5】

	Vibromixerを用いないオクタン酸処理	Vibromixerを用いるオクタン酸処理
出発物質(U/L)	5630	5630
オクタン酸処理後の平均残存タンパク質分解活性(U/L)	42	< 8 (LOD)

10

【0092】

Vibromixerを使用したとき、オクタン酸処理後の濾液は澄んでいた。比較実験において、ブレードスターラを用いてオクタン酸処理した後の濾液は、非常に不透明であり、濾過が困難であった。

20

【0093】

実施例7：本発明に係るIgM調製物における抗細菌力価

唯一市販されている静脈内耐性IgM含有調製物であるPentaglobinと比較するために、この十分に確立されている薬剤3バッチで抗細菌活性を分析し、本発明に係る調製物と比較した。抗細菌抗原又は抗真菌抗原に対するIgM調製物中におけるIgA又はIgMクラスの抗体をELISAにより測定した。対応する抗原でマイクロタイタープレートをコーティングし、標準物質又はIgM調製物と共にインキュベートした。抗原に結合している抗体を抗ヒトIgA又は抗ヒトIgMコンジュゲートで検出した。酵素の基質を用いることにより検出を行った。生じる色の変化は、IgM調製物中に存在する抗体の量に対応する。

30

【表6】

パラメータ	単位	本発明のIgM調製物の平均	市販製品Pentaglobinの平均
肺炎球菌多糖体に対するIgM抗体	U/mg IgM	72	21
大腸菌に対するIgM抗体	U/mg IgM	62	39
エンテロコッカスフェカリスに対するIgM抗体	U/mg IgM	69	27
カンダアルビカスに対するIgM抗体	U/mg IgM	61	41
クラミジアに対するIgM抗体	U/mg IgM	71	6

40

表6: 本発明に係る調製物及び市販のPentaglobinにおけるIgMの抗細菌結合活性の比較

【表 7】

パラメータ	単位	本発明のIgM調製物の平均	市販製品Pentaglobinの平均
肺炎球菌多糖体に対するIgA抗体	U/mg IgA	86	25
大腸菌に対するIgA抗体	U/mg IgA	83	26
エンテロコッカスフェカリスに対するIgA抗体	U/mg IgA	93	21
クラミジアに対するIgA抗体	U/mg IgA	65	38
ヘリコクターピロリに対するIgA抗体	U/mg IgA	59	24

10

表7: 本発明に係る調製物及び市販のPentaglobinにおけるIgAの抗細菌結合活性の比較

【 0 0 9 4 】

新規調製物における I g M 及び I g A 媒介活性は、典型的に、P e n t a g l o b i n の少なくとも 1 . 5 倍高かったが、これは、P e n t a g l o b i n 中の I g M 及び I g A が - プロピオラクトンで化学的に修飾されているという事実により説明することができる。この工程は、本発明に係るより穏やかな手順により置換される。

【 0 0 9 5 】

これらデータは、全体的に、最終調製物中の I g M 分子の結合領域が機能的に完全に活性であることを示す。

20

【 0 0 9 6 】

実施例 8 : 液体 I g M 生成物を用いた保存安定性試験

U V C 処理を行わなかった実施例 1 の生成物を、2 ~ 8 にて 1 0 m L 又は 1 0 0 m L のガラスバイアル（充填体積 5 m L 又は 5 0 m L ）中で保存し、仕様に従って全てのパラメータについて分析した。結果を表 8 に示す。安定性に関連するパラメータは、高速サイズ排除クロマトグラフィー（H P S E C ）を用いて測定する凝集体及び断片の含量、タンパク質分解活性（P A ）、並びに抗補体活性（A C A ）である。これらパラメータは、静脈内耐性にとって重要であり、長期保存中に変化しやすい。2 ~ 8 では、これらパラメータに有意な変化はみられなかった。室温（2 3 ~ 2 7 ）保存した場合でさえも、これら値は仕様の範囲内であったが、室温で 2 4 ヶ月間保存した後は断片が僅かに増加する。着色、タンパク質光、p H 値等の他のパラメータについても測定したが、全試験期間に亘って変化していなかった。様々な細菌に対する I g M 及び I g A の力価は、2 ~ 8 で 2 年間に亘って安定である。

30

【 0 0 9 7 】

また、U V C 処理を行った実施例 1 の生成物を、2 ~ 8 及び室温にて 1 0 m L 又は 1 0 0 m L のガラスバイアル（充填体積 5 m L 又は 5 0 m L ）中で保存し、仕様に従って全てのパラメータについて分析した。結果を表 9 に示す。この進行中の安定性試験では、現在入手可能な 1 2 ヶ月間のデータは、U V C 処理を行わなかった生成物と同じ安定性プロファイルを示しているため、2 4 ヶ月間安定であると推定できる。

40

【表 8】

試験したパラメータ	要件 (許容値)	2℃～8℃で保存(月)							23℃～ 27℃
		0	3	6	9	12	18	24	
タンパク質(g/L)	45-55	50.3	51.4	50.3	50.4	50.5	49.6	50.8	49.8
HPSEC									
>1200kDの凝集体の割合(%)	≤5	0.9	0.6	0.5	0.8	0.6	1.0	1.3	1.7
<100kDの断片の割合(%)	≤5	0.2	0.6	1.1	0.7	1.6	0.9	1.2	4.1
タンパク質分解活性 (U/L)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
免疫グロブリン含量 (%)	> 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
抗補体活性 (CH50/mg タンパク質)	≤1.0	0.48	0.56	0.48	0.66	0.70	0.64	0.54	0.38

n.t. = 試験せず

表8: 横にした状態で2℃～8℃にて試験したバッチA586067の安定性 充填体積: 5mL

【表 9】

試験したパラメータ	要件 (許容値)	2℃～8℃で保存(月)							23℃～ 27℃
		0	3	6	9	12	18	24	
タンパク質(g/L)	45-55	50.2	50.8	49.7	50.4	50.3	49.4	50.3	49.7
HPSEC									
>1200kDの凝集体の割合(%)	≤5	0.9	0.5	0.4	0.8	0.6	1.0	1.3	1.5
<100kDの断片の割合(%)	≤5	0.3	0.6	1.0	0.9	1.4	1.2	1.2	4.2
タンパク質分解活性 (U/L)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
免疫グロブリン含量 (%)	> 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
抗補体活性 (CH50/mg タンパク質)	≤1.0	0.48	0.82	0.52	0.64	0.68	0.48	0.60	0.40

表9: 横にした状態で2℃～8℃にて試験したバッチA586057の安定性 充填体積: 50mL

【0098】

実施例 9 I g M 生成物を用いたインビトロ実験

安全性及び忍容性を確認するために、5日間に亘って反復静脈内注射した後の動脈圧に対するI g M調製物の影響を8頭の覚醒力ニクイザルで試験した。190mg / I g M / kg / 日の用量の本明細書に記載の方法に従って調製したI g M調製物を投与した。比較物質として、市販の静脈内耐性I g M含有調製物であるP e n t a g l o b i nを何頭かのサルに投与した。同用量のI g Mを投与する方法でP e n t a g l o b i nを投与した。免疫グロブリン調製物を投与する前の時点で、対照用量の0.9%NaClを動物に投与した。注射後に血圧を測定し、投与により許容できないレベルの非特異的な補体活性化が起こっているかどうかを判定した。

【0099】

I g M調製物(15mL / kg / 日)の投与は、動脈圧(平均、収縮期、及び拡張期)に対して僅かな影響しか与えなかった。予備試験の値と比較した各注射の4時間後までの差は、4mmHgを超えなかった。これら差を、生物学的に関連しているとみなすことはできない。

【0100】

補体経路の非特異的な活性化のマーカーとして注射後に採取した血漿サンプル中のC3a濃度を測定した。C3a濃度[ng/mL]は、I g M調製物を投与しても僅かに増加するのみであり(15mL / kg BW)、I g Mと等量の市販のレファレンス調製物P e n t a g l o b i nによる増加よりも更に少なかった。処理の約6時間後に血液をサンプリングした。

10

20

30

40

【表 10】

	対照(0.9% NaCl, pH 4.5) C3a [ng/mL]	IgM調製物の投与 C3a [ng/mL]
平均	229	240
SD	83	37
N	8	8

表10a: IgM調製物投与後のC3a濃度[ng/mL]

【0101】

10

IgM調製物に起因する実質的な毒物学的所見はみられず、Pentaglobinではみられなかった明らかな変化も生じなかった。Pentaglobinの安全性は長年に亘る臨床試験で十分に確立されているので、これら変化が任意の臨床的関連性を有しないと結論付けるのが合理的である。

【表 11】

	対照(0.9% NaCl, pH 6.8) C3a [ng/mL]	IgM調製物の投与 C3a [ng/mL]
平均	204	263
SD	20	61
N	4	4

20

表10b: レファレンス調製物Pentaglobin投与後のC3a濃度[ng/mL]

【0102】

また、IgM調製物の優れた忍容性及び安全性は、24人の健常男性及び女性のボランティアにおけるヒトの第I相試験でも検証された。投与の最初の4時間後における収縮期血圧は、平均して、0.5 mL / 分で91 mg ~ 274 mgのIgM調製物 / kg BW / 日を注射した後、約9% (11.9 mmHg) しか低下しなかった。

【0103】

これは、プラセボである0.9% NaCl溶液と同程度であった(9.4%、11.7 mmHg)。

30

【0104】

重篤な有害事象は記録されず、全ての重篤ではない有害事象は自己制限的であった。更に、PCT測定により示される通り、感染因子の伝染の証拠は存在しなかった。

【0105】

関連疾患の動物モデルにおける有効性試験の有用性は、免疫原性及びヒト血漿から得られたIgM調製物中で予め形成されているGal抗体により制限されることに留意すべきである。しかし、疾患の治療におけるPentaglobinの使用に関する先行技術の知見及び本発明の方法により調製されるIgM調製物の抗細菌抗体力価(実施例7に示す)を鑑みて、IgM調製物は臨床的有効性を有すると結論付けることができる。

40

【図1】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
 C 0 7 K 16/00 (2006.01) A 6 1 P 37/02
 C 0 7 K 16/00
- (72)発明者 ディーター・ラドニック
 ドイツ連邦共和国 6 3 3 0 3 ドライアイヒ イン デア ノイエン ラッハ 3
- (72)発明者 オリバー・マネク
 ドイツ連邦共和国 6 1 3 5 2 パート ホンブルク リンデンシュトラッセ 2 4
- (72)発明者 ミハエル・ロデマー
 ドイツ連邦共和国 6 3 1 1 0 ロートガウ ヴァイスキルヒェンシュトラッセ 6 1
- (72)発明者 ヘルベルト・ディヒテルミュラー
 ドイツ連邦共和国 6 5 8 4 3 ズルツバッハ ロッサートシュトラッセ 1 4
- (72)発明者 エックハルト・フレヒシク
 ドイツ連邦共和国 6 3 1 2 8 ディーツェンバッハ シェーファーガッセ 1 5

合議体

審判長 田村 聖子
 審判官 天野 貴子
 審判官 小暮 道明

- (56)参考文献 特開平4 - 2 2 1 3 2 1 (J P , A)
 特開2 0 0 9 - 5 3 1 4 0 1 (J P , A)
 特開2 0 0 9 - 5 3 1 4 0 0 (J P , A)
 特開平2 - 7 8 6 3 5 (J P , A)
 特開2 0 0 1 - 5 0 4 0 9 2 (J P , A)
 Immune Globulin Intravenous (Human), 10% Ca
 pplylate/Chromatography Purified, Product De
 scription, 2005, p. 1 - 17

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-90
 C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)