



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102939107 B

(45)授权公告日 2016.12.21

(21)申请号 201180029337.X

(22)申请日 2011.04.21

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 102939107 A

(43)申请公布日 2013.02.20

(30)优先权数据  
1006753.6 2010.04.22 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2012.12.14

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2011/056487 2011.04.21

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02011/131787 EN 2011.10.27

(73)专利权人 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 北京市金杜律师事务所  
11256  
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.  
A61K 39/395(2006.01)  
A61K 9/08(2006.01)  
A61L 2/10(2006.01)  
C07K 16/06(2006.01)  
A61P 31/00(2006.01)

(56)对比文件  
EP 0450412 A1,1991.10.09,  
CN 1311797 A,2001.09.05,  
CN 1233258 A,1999.10.27,  
审查员 李宁

权利要求书3页 说明书23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,所述制剂通过包括以下步骤的方法从人血浆制得:

- (a) 从人血浆制备血浆组分,作为含免疫球蛋白的溶液;
- (b) 将辛酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白,其中所述辛酸以0.075kg/kg血浆组分至0.2kg/kg血浆组分的浓度添加,经混合的溶液的pH为4.5~5.5,温度为10℃~35℃;
- (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,

其中,所述抗体制剂具有特异性补体活化活性,其中,制备所述抗体制剂的所述方法能够实现无包膜病毒的大于 $3\log_{10}$ 的去,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,所述抗体制剂产生的C5a和/或C3a的量为仅用人血清时产生的C5a和/或C3a的量的30%至170%。

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

3. 如权利要求1所述的抗体制剂,所述抗体制剂包含占抗体总量的至少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至少15重量%的IgM。

5. 如权利要求1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. 如权利要求1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. 如权利要求1所述的抗体制剂,其中,用于确定所述抗体制剂产生的C5a的量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 $\mu$ 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℃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。

8. 如权利要求1所述的抗体制剂,其中,用于确定所述抗体制剂产生的C3a的量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 $\mu$ 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℃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。

9.如权利要求1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。

10.如权利要求9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。

11.如权利要求1所述的抗体制剂,其中,所述制剂的抗补体活性低于1.0CH<sub>50</sub>/mg蛋白。

12.如权利要求11所述的抗体制剂,其中,所述抗补体活性低于0.75CH<sub>50</sub>/mg蛋白。

13.如权利要求1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%。

14.如权利要求1所述的抗体制剂,所述抗体制剂在未执行于40℃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。

15.如权利要求1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。

16.如权利要求15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。

17.如权利要求1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。

18.如权利要求1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部分的活性为生物参照制剂的相应活性的90%至110%。

19.一种从人血清制造权利要求1-6、9-16和18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)将辛酸与所述溶液混合,并用振动搅拌器处理经混合的溶液以沉淀出污染性蛋白,其中所述辛酸以0.075kg/kg血浆组分至0.2kg/kg血浆组分的浓度添加,经混合的溶液的pH为4.5~5.5,温度为10℃~35℃;

(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。

20.一种根据权利要求19所述方法制备的抗体制剂,其中以占抗体总量的百分比计,所述抗体制剂包含至少15%的IgM、大于5%的IgA和大于40%的IgG;并且通过高效尺寸排阻色谱法确定,所述抗体制剂包含占总免疫球蛋白含量少于1.5%的1200kDa以上的聚集体,并且所述抗体制剂通过能够实现无包膜病毒的大于3log<sub>10</sub>的去除的方法制得。

21.如权利要求20所述的抗体制剂,抗补体活性低于0.75CH<sub>50</sub>/mg蛋白,并且按照2011年4月版《欧洲药典》2.7.9“用于免疫球蛋白的Fc功能的测试”确定,在所述制剂中至少90%的抗体具有生物活性。

22. 如权利要求1~18、20或21中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂用于医药应用。
23. 如权利要求22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。
24. 如权利要求23所述的抗体制剂,其中,所述免疫紊乱性疾病是IgM缺陷疾病。
25. 权利要求1~18、20或21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。
26. 如权利要求25所述的应用,其中,所述免疫紊乱性疾病是IgM缺陷疾病。

## 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,因为其可以引起不合需要的副作用,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条件下由抗原来激活。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细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、 $\beta$ -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 $\beta$ -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0.6~0.8CH<sub>50</sub>/mg蛋白,但是必须对其进行稳定化和用 $\beta$ -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 $\leq 1$ CH<sub>50</sub>/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) $\times$ 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 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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1.0CH<sub>50</sub>/mg蛋白、优选低于0.75CH<sub>50</sub>/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 $\beta$ -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 $^{\circ}$ C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 $3\log_{10}$ 、优选大于 $4\log_{10}$ 、最优选大于 $5\log_{10}$ 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 $115\text{mg IgM/kg体重/小时}$ 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 $\pm 10\%$ 、更优选 $\pm 5\%$ 。

[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型人血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℃~8℃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℃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℃~8℃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℃~27℃)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。特别而言，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的免疫球蛋白组合物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UVivatec®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/m<sup>2</sup>~500J/m<sup>2</sup>、更特别以200J/m<sup>2</sup>~300J/m<sup>2</sup>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≥4log<sub>10</sub>)。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0.2μm过滤器,随后再进行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4log<sub>10</sub>。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 $\mu$ l(约500 $\mu$ 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:1=30mm, $\varnothing$ =7.8 mm,

[0125] -固定相:Tosoh Bioscience TSK-Gel G4000SWXL,适于相对分子质量为20000Da~7 $\times$ 10<sup>6</sup>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(>1200kD),10分钟~13分钟

[0130] • IgM(1200kD~750kD),13分钟~19分钟

[0131] • 二聚体/IgA(750kD~350kD),19分钟~20分钟

[0132] • IgG(350kD~100kD),20分钟~26分钟

[0133] • 片段(<100kD),26分钟~40分钟

[0134] • 片段(<100kD),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 $5 \times 10^8$ 个红血球总量中的 $2.5 \times 10^8$ 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倍的巴比妥缓冲液:83克氯化钠、10.192g巴比妥钠于2升水中,pH 7.3)中。将200 $\mu$ 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 $C(U/L)=313S \times \Delta Abs/分钟 \times F$ (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( $\Delta Abs/分钟$ )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 $\mu$ 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 $C(U/L)=313 \times \Delta Abs/分钟 \times F$ (C=蛋白水解活性;F=稀释因子)由



起始吸收差( $\Delta$  Abs/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( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ),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 $\mu\text{m}$ 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 $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 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 $\mu\text{m}$ 过滤。

[0154] 使蛋白溶液过滤通过0.1 $\mu\text{m}$ 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/m<sup>2</sup>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 $\mu\text{m}$ 过滤器,并在 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 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: $14^\circ\text{C} \sim 30^\circ\text{C}$

[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滅—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 $22^\circ\text{C}$ 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 $4\log_{10}$ 和大于 $5\log_{10}$ 的量级被有效去除。此外,超过 $3\log_{10}$ 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( $\log_{10}$ )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	$2.15 \pm 0.32$	$3.39 \pm 0.36$
REO	$2.34 \pm 0.38$	$5.46 \pm 0.28$
SV40	$2.05 \pm 0.4$	$4.71 \pm 0.34$

[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 $4\log_{10}$ 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 $200\text{J}/\text{m}^2 \sim 400\text{J}/\text{m}^2$ 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 $5.81/\text{h}$ 的流速将蛋白含量为约 $55\text{g}/\text{l}$ 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 $200\text{J}/\text{m}^2$ 的剂量。以 $3.9\text{L}/\text{m}^2$ 的流速将蛋白溶液泵送通过该系统,从而实现 $300\text{J}/\text{m}^2$ 的剂量。以 $2.9\text{L}/\text{m}^2$ 的流速将蛋白溶液泵送通过该系统,从而实现 $400\text{J}/\text{m}^2$ 。

[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 <sup>2</sup> 的 UVC 照射后	IgM 产品 300 J/m <sup>2</sup> 的 UVC 照射后	IgM 产品 400 J/m <sup>2</sup> 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 片段<100 kD	面积% 面积%	1.9 0.66	2.6 0.73	3.3 0.76	4.0 0.79
ACA	CH50/mg 蛋白	0.68	0.48	0.46	0.46
PA	U/I	< 8	< 8	< 8	< 8

[0174] 在200J/m<sup>2</sup>~400J/m<sup>2</sup>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/m<sup>2</sup>~300J/m<sup>2</sup>,因为200J/m<sup>2</sup>足以使无包膜病毒灭活,而在300J/m<sup>2</sup>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/m<sup>2</sup>。

[0175] 以5.81/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/m<sup>2</sup>~300J/m<sup>2</sup>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 <sup>2</sup>	UVC: 225 J/m <sup>2</sup>	UVC: 250 J/m <sup>2</sup>	UVC: 300 J/m <sup>2</sup>
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。在该最终产品中亦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/m<sup>2</sup>)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 <sub>10</sub> )	>12.5	>10.1	>12.7	>8.4 <sup>a</sup>	>13.7 <sup>a</sup>	9.2	>11.0	>8.4

[0185] <sup>a</sup>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17log<sub>10</sub>(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>17.5log<sub>10</sub>,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8log<sub>10</sub>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200μl缓冲液与200μl样品(混合并调节温度至37℃)和200μl显色底物溶液混合。使用分光光度计于37℃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/D)	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

[0196]

参数	单位	本发明的 IgM 制剂 平均值	市售产品 Pentaglobin 平均值
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

[0198]

参数	单位	本发明的 IgM 制剂 平均值	市售产品 Pentaglobin 平均值
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 $\beta$ -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°C~8°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°C~8°C下,这些参数无显著变化。甚至在室温(23°C~27°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°C~8°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°C~8°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	
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	
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(100μl)。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 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l)来使所有反应停止。按照制造商的操作规程,进行了后续样品稀释和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 $^{\circ}$ 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产品相比仍显示出有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
<b>对照</b>					
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 $\mu$ 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 $\mu$ 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

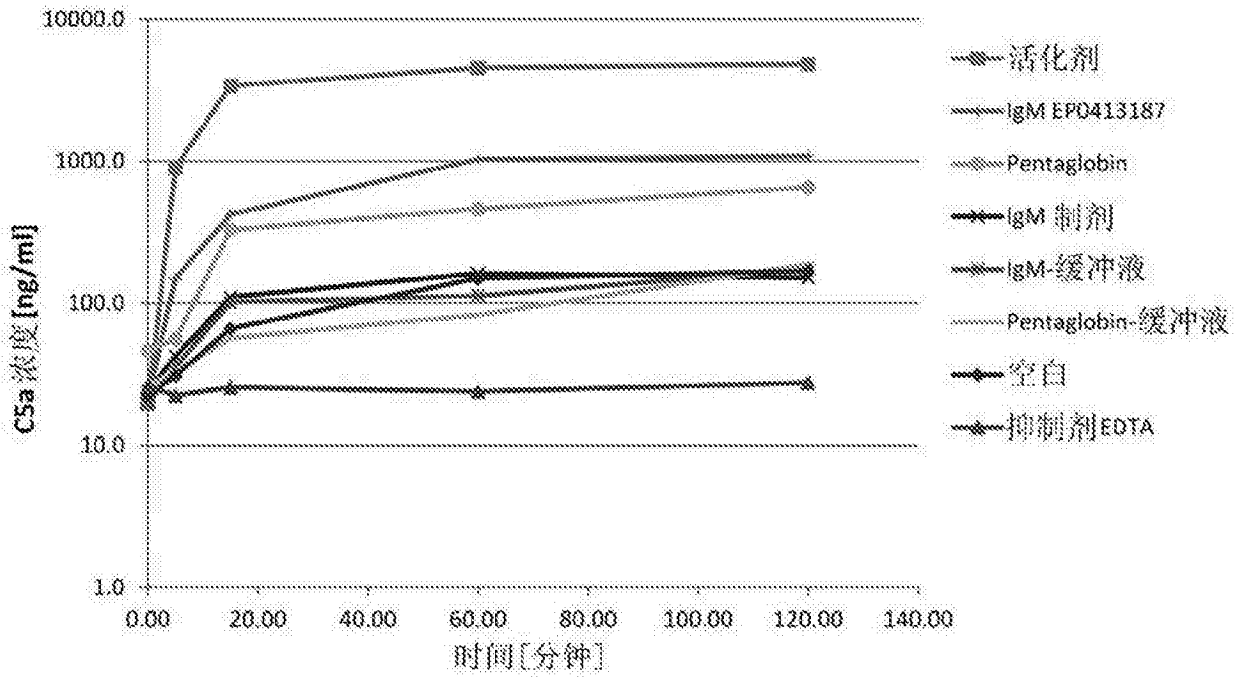


图2

### 体外C3a补体活化

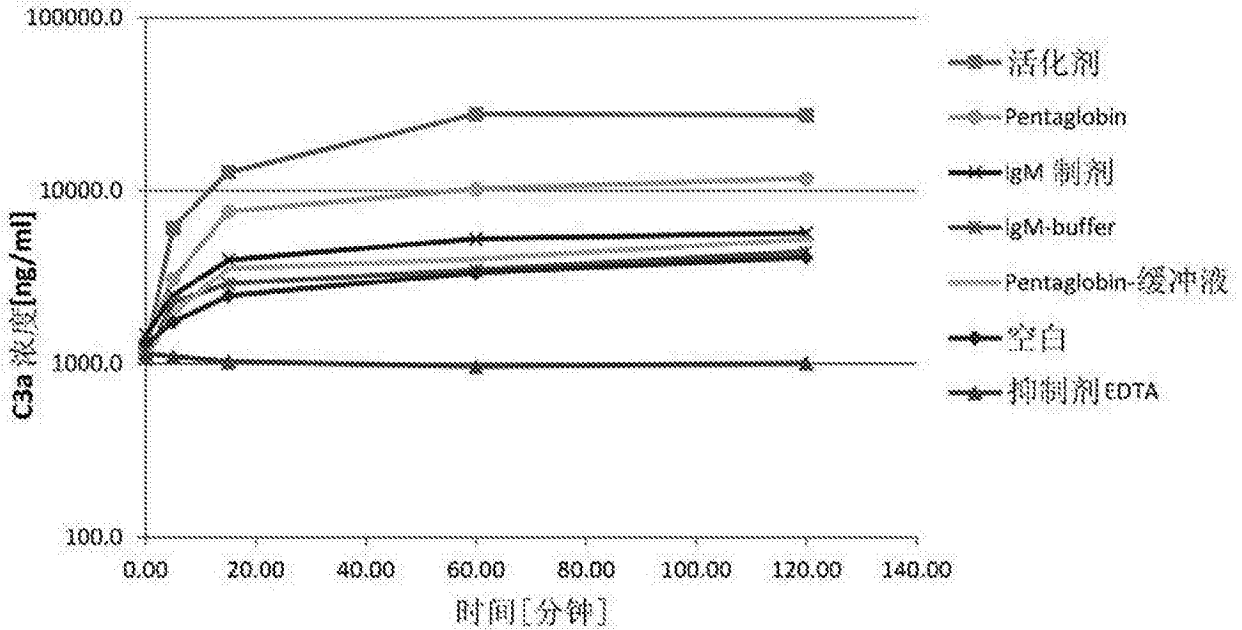


图3