



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1922207 B

(45) 授权公告日 2012.06.06

(21) 申请号 200580005845.9

代理人 顾晋伟 刘继富

(22) 申请日 2005.02.25

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

C07K 16/06 (2006.01)

60/548,107 2004.02.27 US

A61L 2/00 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2006.08.25

CN 1257874 A, 2000.06.28, 全文.

(86) PCT申请的申请数据

EP 0893450 A1, 1999.01.27, 说明书第3页、

PCT/EP2005/050812 2005.02.25

附图1、实施例1.

(87) PCT申请的公布数据

审查员 唐华东

W02005/082937 EN 2005.09.09

(73) 专利权人 奥克特珐玛股份有限公司

地址 瑞士拉亨

(72) 发明人 安德烈亚·布查切

贡特尔·埃贝雷尔 于尔根·勒米施

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限

公司 11227

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

提供纯化的、病毒安全的抗体制剂的方法

(57) 摘要

一种由含抗体和污染物的起始溶液制备纯化的、病毒灭活的和病毒安全的抗体制剂的方法,该方法包括下列步骤:(a) 将起始溶液的 pH 调至约 4.6-约 4.95,尤其是调至约 4.8-约 4.95 以生成中间溶液;(b) 将辛酸盐和 / 或庚酸盐离子加入中间溶液并保持 pH 为约 4.6-约 4.95,尤其为约 4.8-约 4.95,由此形成沉淀并且抗体基本上存在于上清液中;(c) 在辛酸盐和 / 或庚酸盐离子浓度、时间、pH 和温度条件下孵育上清溶液,任选地在调节 pH 之前浓缩和透滤过滤后的溶液;(d) 在允许污染物结合到树脂上而不允许抗体显著结合到树脂上的条件下,将过滤后的溶液施加到至少一种阴离子交换树脂上,并任选地施加到两种不同的阴离子交换树脂上,其中生成了纯化的、病毒灭活的和病毒安全的抗体制剂。

1. 一种由含抗体和污染物的起始溶液制备纯化的、病毒灭活的和病毒安全的抗体制剂的方法,该方法包括下列步骤:

(a) 将起始溶液的 pH 调至 4.8-4.95 以产生中间溶液;

(b) 将辛酸盐和 / 或庚酸盐离子加入中间溶液并保持 pH 为 4.8-4.95, 由此形成沉淀并且抗体基本上存在于上清液中;

(c) 将辛酸盐和 / 或庚酸盐离子加入上清液中并保持 pH 为 4.8-4.95, 任选地在调节 pH 之前浓缩和透滤过滤后的溶液;

(d) 在允许污染物结合到树脂上而不允许抗体结合到树脂上的条件下, 在 pH 为 5.0-5.2 条件下将过滤的溶液施加到至少一种阴离子交换树脂上, 并任选地施加到两种不同的阴离子交换树脂上, 其中生成了纯化的、病毒灭活的和病毒安全的抗体制剂。

2. 权利要求 1 的方法, 其中第二次阴离子交换色谱在 pH 为 6.7-6.9 下进行。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中步骤 (b) 和 (c) 重复至少一次。

4. 权利要求 1-3 的方法, 其中起始溶液包含来源于血浆的抗体。

5. 权利要求 1-4 的方法, 其中在步骤 (d), 将经灭活的溶液在一定条件下与两种不同阴离子交换树脂接触, 所述条件使得污染物选择性地与树脂结合而抗体不与树脂结合。

6. 权利要求 1-5 的方法, 其中抗体是免疫球蛋白 G。

7. 权利要求 5 的方法, 其中在第二次阴离子交换色谱之前将 pH 调至 6.8 ± 0.1 。

8. 权利要求 1-7 的方法, 其中将阴离子交换色谱穿透液浓缩至 60-90mg/ml 并对缓冲溶液进行透滤。

9. 权利要求 8 的方法, 其中所述缓冲溶液为磷酸缓冲液。

10. 权利要求 1-9 的方法, 其中第一次阴离子交换色谱的穿透液用溶剂去污剂处理 4.5-8 小时以灭活脂质包被的病毒。

11. 权利要求 10 的方法, 其中所述去污剂为 Triton X-100 和 TnBP。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所述去污剂为浓度为 1% 的 Triton X-100 和 0.3% 的 TnBP。

13. 权利要求 10 的方法, 其中权利要求 10 的孵育混合物中的去污剂通过固相和液相萃取除去。

14. 权利要求 1-13 至少任一项的方法, 其中至少一种选自 UV-C 处理、热处理、病毒过滤和朊病毒去除或灭活的方法与权利要求 1 的辛酸盐处理相结合。

15. 权利要求 13 的方法, 其中将在固相萃取时的 pH 值调至 6.7-6.9。

16. 权利要求 15 的方法, 其中对溶液进行第二次阴离子交换色谱。

17. 权利要求 16 的方法, 其中将阴离子交换剂穿透液的 pH 值调至 3.5-4.5。

18. 权利要求 17 的方法, 其中将阴离子交换剂穿透液的 pH 值调至 $pH 4.0 \pm 0.1$ 。

19. 权利要求 17 的方法, 其中将所得 IgG 溶液与病毒过滤器接触。

20. 权利要求 17 的方法, 其中将所得 IgG 溶液与纳滤器接触。

21. 权利要求 17 的方法, 其中将所得 IgG 溶液孵育至少 24 小时, 优选地在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ 。

22. 权利要求 17 的方法, 其中将所得 IgG 溶液浓缩至 5% 或 10%。

23. 权利要求 22 的方法, 其中使用适当的添加剂将浓缩液的渗透压调至 200-400mOsmol/kg。

24. 权利要求 23 的方法,其中将所得 IgG 溶液的 pH 值调至 3.5-6.0。
25. 权利要求 24 的方法,其中将所得 IgG 溶液的 pH 值调至 4.0-5.5。
26. 权利要求 24 的方法,其中将所得 IgG 溶液无菌过滤并填充到玻璃瓶或塑料容器中。
27. 一种可根据权利要求 1-26 中一项而获得的含 IgG 的组分。

提供纯化的、病毒安全的抗体制剂的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种由含抗体和污染物的起始溶液制备纯化的、病毒安全的抗体制剂的方法。本发明描述了从人血浆和其它来源纯化 γ -球蛋白的方法。在此描述的制造方法中包括病毒灭活和去除步骤。

背景技术

[0002] 沉淀和随之的病毒去除 / 灭活

[0003] 在二十世纪四十年代 Cohn 等人介绍了人血浆的低温乙醇分级分离法。该方案的几种变化形式使得不同中间体的纯度和 / 或产量增加。在 Cohn 分级分离法中,一些步骤被确定为有助于有效地病毒灭活和去除。在 IgG 方法中尤其 Cohn I+III 组分的分离在这方面是非常有效的。低 pH 和 EtOH 的存在破坏了一些敏感病毒(主要为具包膜的病毒),大部分具包膜的和无包膜的病毒通过分配到通常被丢弃的沉淀 I+III 中而除去。

[0004] 在二十世纪六十年代,表明短链脂肪酸(C6-C12)与 α -球蛋白和 β -球蛋白形成不可溶的复合物而 γ -球蛋白不易沉淀(Chanutin et al.,1960)。Steinbruch 等人(1996)描述了使用辛酸盐(即辛酸盐,C8-饱和脂肪酸)作为沉淀剂用于纯化 IgG 的方法。在使用乙酸缓冲液稀释到最终 pH 为 4.8 之后非免疫球蛋白从人血浆沉淀出来。在剧烈搅拌下加入辛酸盐之后得到 IgG 富集的溶液。纯度和产量依赖于辛酸的量、pH、缓冲液的摩尔浓度和稀释因子。Steinbruch 等人也陈述了,分两步加入有效量的辛酸盐并在中间除去沉淀是有利的。正如分离 I+III 组分的情况,有包膜和无包膜的病毒通过分配到非 IgG 蛋白质的沉淀中而被除去。

[0005] 色谱

[0006] 几个专利描述了以所谓负选模式纯化 IgG 溶液;IgG 穿透而不结合(只有微量)而大部分非 IgG 组分蛋白质与阴离子配体结合(Bertolini et al.1998,WO-A-98/05686;Lebing 1999,US-A-5,886,154;Friesen et al.,1986,CA 1201063)。在很多出版物中描述了辛酸盐沉淀随后与离子交换色谱相结合的 IgG 纯化方法。最早的之一由 Steinbruch 等人(1969)描述。他描述了在辛酸盐沉淀之后用 DEAE-纤维素进行 IgG 的进一步纯化。Lebing 等人(2003)最近的出版物中描述了串联使用两种阴离子交换柱去除 IgM、IgA、白蛋白和其它杂质。Lebing 等人结合了辛酸盐介导的两种作用,即通过沉淀从而用病毒分配基本减少非-IgG 蛋白质,和在分离的孵育步骤中使用脂肪酸灭活包膜病毒的性质。Lebing 等人(2003)所谓的“pH-摇摆”,由在 pH4.2 时重构含 IgG 的糊状物 / 沉淀物开始,并随后加入辛酸盐调节 pH 为 5.2,其重要性被强调对于 IgG 富集过程是关键,因有效地减少非-IgG 蛋白质也需要它。几种其它杂质,如 IgA 和 IgM,以及辛酸盐随后由所述离子交换色谱步骤而被减少。

[0007] 令人惊讶地我们发现,为了在加入辛酸盐和去除生成的沉淀上达到显著的纯化效果,不需要上面概述的和 Lebing 等人描述的 pH-转移。相反,在糊状物重构和辛酸盐孵育和沉淀物去除的整个过程期间保持 pH 恒定为 4.6-4.95,即可实现有效的 IgG 富集。另外,

通过保持 pH 恒定为 4.8-4.95, 杂质尤其是白蛋白的量也更有效地减少了。同时除去了病毒。然后通过离子交换步骤分离残余的杂质和辛酸盐。

[0008] 典型的病毒灭活

[0009] 溶剂去污剂和 pH4 处理是公知方法并广泛用于免疫球蛋白。SD 处理通常由于其对灭活有包膜病毒的优势而被引入这些方法 (Biesert L. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1996 ;14 :47)。尽管有包膜病毒比无包膜病毒受到的影响更大, 有包膜病毒和无包膜病毒都受暴露于低 pH 的影响 (Biesert. *Clinical and Experimental Rheumatology* 1996 ;14 :47, Bos et al. *Biologicals* 1998 ;26 :267, In Seop et al. *J Microbiol Biotechnol* 2001 ;11 :619)。

[0010] 在 EP-A-0525502 中描述了溶剂去污剂和 pH4 孵育相结合作为病毒灭活步骤。

[0011] 病毒过滤

[0012] 在主要基于体积排阻的原理保留病毒的情况下 (Burnouf and Radosevich. *Haemophilia* 2003 ;9 :24), IgG 溶液经非常小孔径 (典型地 15-50nm) 的膜过滤, 从而增加病毒安全性。也使用设计用于经离子交换吸附保留病毒的深度过滤器来过滤免疫球蛋白。

[0013] 发明内容

[0014] 本发明描述了与经典的 Cohn-Onclly 分级分离工艺相比产量增加和工艺时间缩短的 IgG 纯化工艺。IgG 重构于酸性 pH 范围 4.60-4.95, 优选地 pH4.9 的缓冲液中。由两个辛酸盐孵育步骤分离非-IgG 蛋白质, 其中辛酸盐浓度范围为 10-30mM 辛酸盐, 优选地 20mM。

[0015] 为了有效地灭活有包膜病毒, 可以增加作为使用 Triton X-100、Tween 80 等和 TNBP 的溶剂去污剂处理而已知的孵育步骤, 以提高整个工艺的病毒灭活能力。可以将由过滤、即由所谓的纳滤或带电的 (charged) 深度过滤器去除病毒增加到该病毒去除程序中。此外, 也可以与前述处理相结合进行 UVC 处理。例如在 EP-A-0 840 624 或 EP-A-0 422 007 中描述了这种处理。

[0016] 此外, 辛酸盐 / 辛酸可以与庚酸盐 / 庚酸结合或由庚酸盐 / 庚酸替换来实施前述的沉淀和孵育处理步骤。

[0017] 可以由本发明的方法得到的产物是病毒灭活的。由于辛酸盐处理, 朊病毒也被灭活 / 去除。

[0018] 附图说明

[0019] 图 1 和 2 描绘了本发明的方法的具体实施方案的流程图。

[0020] 具体实施方式

[0021] 本发明涉及一种由含抗体和污染物的起始溶液制备纯化的、病毒灭活和病毒安全的抗体制剂的方法, 该方法包括下列步骤:

[0022] (a) 将起始溶液的 pH 调至约 4.6- 约 4.95, 尤其是调至约 4.8- 约 4.95 以制备中间溶液;

[0023] (b) 将辛酸盐和 / 或庚酸盐离子加入中间溶液并保持 pH 为约 4.6- 约 4.95, 尤其是为约 4.8- 约 4.95, 由此形成沉淀物并且抗体基本上存在于上清液中;

[0024] (c) 在辛酸盐和 / 或庚酸盐离子浓度、时间、pH 和温度条件下孵育上清溶液, 任选地在调节 pH 之前浓缩和透滤过滤后的溶液;

[0025] (d) 在允许污染物结合到树脂上而不允许抗体显著结合到树脂上的条件下, 将过

滤的溶液施加到至少一种阴离子交换树脂上,并任选地施加到两种不同的阴离子交换树脂上,其中产生了纯化的、病毒灭活的和病毒安全的抗体制剂。

[0026] 在本发明的一个实施方案中,病毒灭活的溶液在步骤(d)中与至少一种阴离子交换树脂在pH约5.0-5.2接触。如果进行两次阴离子交换色谱,第二次色谱可以在pH6.7-6.9进行。任选地步骤(b)和(c)可以重复至少一次。在pH4.9用辛酸盐处理导致显著去除不需要的蛋白质。

[0027] 典型地,起始溶液包含来源于血浆的抗体。

[0028] 在步骤(d)中,将所灭活的溶液在一定条件下与两种不同的阴离子交换树脂接触是有利的,所述接触条件使得污染物选择性地与树脂结合而抗体与树脂没有明显结合。

[0029] 优选地,抗体是G-型免疫球蛋白。

[0030] 在两次阴离子交换色谱(AEX)步骤之间,可以改变pH,尤其是改变至 6.8 ± 0.1 。可以将AEX穿透液(flow through)浓缩至60-90mg/ml并对例如磷酸缓冲液进行透滤。在本发明方法的另一个实施方案中,用溶剂去污剂处理第一次AEX的穿透液,优选地用Triton X-100和TnBP,优选地在浓度为1% Triton X-100和0.3% TnBP,处理4.5-8小时以灭活脂质包被的病毒。该方法已知为溶剂-去污剂处理并在EP-A-0131 740中公开(通过引用并入本文)。根据本发明,孵育混合物的去污剂尤其可由固相和液相萃取去除。固相萃取之后将溶液的pH调至6.7-6.9。S/D处理和辛酸盐病毒灭活的结合导致更安全的产物。

[0031] 这样调节的溶液可以施加到第二个AEX柱,其中AEX穿透液的pH可以调至例如3.5-4.5,尤其是 4.0 ± 0.1 。根据本发明,调节过pH的IgG溶液与病毒过滤器接触。该任选的步骤与辛酸盐处理结合导致病毒安全性更高。

[0032] 也可以将IgG溶液在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1$ 温度下孵育至少24小时。为了提高抗体产物的病毒安全性,UV-C处理可以与含抗体组分的辛酸盐处理相结合。单独或组合的灭活方法,例如TnBP处理、UV-C处理、病毒过滤或加热,可以与本发明的方法结合。

[0033] 根据本发明的方法可以与去除或灭活朊病毒的方法结合,例如过滤或吸附方法或色谱方法,它们在现有技术如EP-A-0 954 528, Trejo, S.R. et al., Vox Sanguinis, (2003)84, 176-187中已公开。根据本发明获得的IgG溶液由于预期的治疗用途被浓缩,典型地浓缩至浓度为5%或10%,并用适当的添加剂将浓缩液的渗透压调至200-400mOsmol/kg。然而,只要药理学上可接受任何其它值都可以。专业人员熟知这样的添加剂,它们包括但不限于糖、糖醇和氨基酸。可以将IgG溶液的pH调至3.5-6.0,尤其4.0-5.5。最后,将IgG溶液无菌过滤并填充到玻璃瓶或塑料容器中。作为替代,在第一或第二AEX步骤之后的穿透液施加到纳滤器上以得到更安全的产物。

[0034] 更详细地描述本发明的方法,优选地按照概述进行:

[0035] 使用人血浆组分I+II+III或组分II+III作为起始材料。这些组分按照Cohn等人(1946)所述制造。工艺期间用1M乙酸、0.1M NaOH或0.3M HCl调节pH。作为1M辛酸钠储备溶液加入辛酸盐。该储备溶液如下制备,将166g辛酸钠溶解在1升注射用水中(WFI)并且搅拌直到辛酸钠完全溶解。

[0036] 作为SD处理的实例,使用Triton X-100和TnBP。为了除去SD试剂,使用植物油例如豆油或蓖麻油。

[0037] 所有试剂为USP级或更好。

[0038] 使用定量体积排除色谱和 ELISA 来确定 IgG 浓度。使用 Agilent HPLC 系统和 Tosohaas G3000SW 柱进行分析 HPLC。

[0039] 在图 1 中显示了该方法的示意图。该方法从在纯化水中溶解称为糊状物的 IgG 沉淀开始。通常重构糊状物的水体积越大, IgG 产量越高。用 1M 乙酸将溶液的 pH 调至 4.60-4.95, 优选地调至 4.90。搅拌该溶液几个小时以便在溶液中得到尽可能多的 IgG。之后以 1M 储备溶液加入辛酸盐直到浓度为 10-30mM, 优选地 20mM 辛酸盐。加入辛酸盐期间的 pH 保持恒定为 4.80-4.95, 优选地为 4.90。在 IgG 溶液与辛酸盐孵育期间, 非-IgG 蛋白质和脂质沉淀出来。形成的沉淀物由过滤从 IgG 溶液中除去。第一次沉淀步骤之后, 一些杂质保留在 IgG 溶液中。因此第二次辛酸盐处理是必要的。与第一步类似, 以 1M 储备溶液加入辛酸盐直到溶液中浓度高至约 20mM, 加入辛酸盐期间的 pH 保持恒定为 4.80-4.95, 优选地为 4.90。孵育之后通过过滤或离心除去沉淀。为了更好的操作, 在过滤期间使用助滤剂。将过滤的溶液的 pH 调至 5.0-5.2, 优选地为 5.1, 并施加到阴离子交换柱。作为阴离子交换柱, 优选地选择强阴离子交换剂例如 Q-Sepharose-FF、Q-Sepharose HP、Q-Sepharose-XL、Source Q 15 或 30 (Amersham Bioscience)、Q-Thruput、Q-Thruput plus (Sterogene)、Macro Prep Q 和 Macro Prep High Q (BioRad)、Q Hyper D (BioSeptra) 和 Poros HQ (PerSeptive Biosystems)。

[0040] IgG 在选定条件下穿透柱子, 而一些添加剂 / 杂质例如辛酸盐和 IgA 与树脂结合。蛋白质溶液以 40-120mg 蛋白质每 ml 树脂, 尤其 40-90mg 蛋白质每 ml 树脂的比率加载到柱上。将得到的穿透液浓缩至蛋白质浓度为 60-90mg/ml, 优选地 70mg/ml, 并对 5 倍体积的浓度为 5-20mM 磷酸缓冲液透滤, 优选 10mM 磷酸钠。作为任选的病毒灭活步骤可以在透滤之后选择 SD 处理。随后将透滤的溶液使用例如 Horowitz 在 EP-A-0 131 740 中描述的 SD 处理进行病毒灭活。使用 TnBP 和 Triton X-100 作为 SD 试剂。搅拌之后, 溶液在 4-10°C 的温度下孵育直到 8 小时。随后向溶液中加入植物油例如豆油或蓖麻油, 优选蓖麻油, 直到浓度为 3-5% (w/w)。从水相分离油相之后, 过滤水相。因此使用适当的深度过滤器。这些过滤器的实例为 Polysep II (Millipore)、Sartofine PP 和 Sartobran P (Sartorius)。随后的固相萃取以优选的方式使用疏水的支持介质进行, 所述支持介质也用于反相色谱中, 其中凝胶基质由硅胶、苯乙烯-二乙烯苯共聚物 (SDVB)、甲基丙烯酸缩水甘油酯-二甲基丙烯酸乙二醇酯共聚物或芳香聚合物 (polyaromatic) 制成。这些介质的实例为 μ Bondapak (Waters)、Amberchrom CG-161 M 和 S、Amberchrom CG-070 (Tosoh Biosep)、PLRP-S (Polymer Laboratories)、RPC-1 和 Toyopearl Hexyl 650C (Tosoh Biosep)、Source 15 RPC (Amersham Biosciences)、LiChroprep Si60 (Merck)、Chromabond Sorbent HR-P 和 EASY (Machery-Nagel)、ProntoSORB SPE (Bischoff Chrom.)。蛋白质溶液以 0.5-1.5mg/ml 干树脂的速率加载到柱上。在 4-10°C 的温度下固相萃取 (分别地, 或色谱步骤) 的穿透液经 UVC 处理, 然后通过加入 0.1M NaOH 调节其 pH 为 6.7-6.9, 优选地为 6.8。之后将 IgG 溶液施加到第二种阴离子交换柱上。IgG 无保留地流过柱子, 而杂质和聚合物与柱子结合。作为阴离子交换柱, 优选地选择强阴离子交换剂例如 Q-Sepharose-FF、Q-Sepharose HP、Q-Sepharose-XL、Source Q 15 或 30 (Amersham Bioscience)、Q-Thruput、Q-Thruput plus (Sterogene)、Macro Prep Q 和 Macro Prep High Q (BioRad)、Q Hyper D (BioSeptra) 和 Poros HQ (PerSeptive Biosystems)。柱子使用 10mM 磷酸钠缓冲液平衡。施加 IgG 溶液之后

使用平衡缓冲液洗涤柱子以从柱上获得所有未结合的 IgG。蛋白质溶液以 120-300mg 蛋白质/ml 树脂的速率加载到柱上。使用 0.3M HCl 在 4-10°C 的温度下将收集的 IgG 溶液的 pH 调至 3.9-4.1, 优选地为 4.0。随后将溶液无菌过滤并在 37°C 下保存至少 24 小时。在低 pH 处理之后使用 0.1M NaOH 在 4-10°C 的温度下将溶液的 pH 调至 4.7。作为附加的病毒减少步骤可以使用适当的病毒过滤器。为了过滤病毒将 IgG 溶液通过 0.1 μm 过滤器过滤, 随后用孔径为 200-15nm 的病毒过滤器过滤。这些过滤器的实例为 DVD、DV 50、DV 20 (Pall)、Viresolve NFP、Viresolve NFR (Millipore)、Planoya 75、35、20、15N (AsahiKasei Pharma)。也可以使用带电的深度过滤器如 Zeta Plus VR (Cuno)。该过滤步骤也可以在 pH4 孵育之后应用。优选地, 在低 pH 处理之前在工艺中使用该步骤。将高度纯化的 IgG 溶液透滤并浓缩至最终制剂值。作为液体制剂的最终浓度选择蛋白质浓度为 5% 或 10% (w/v)。浓缩之后使用适当的添加剂将渗透压调至适合静脉注射。可以使用糖、糖醇和氨基酸。再次检查 pH 并将其调至 4.5-5.0, 优选地为 4.7。随后进行另一次无菌过滤并将溶液填充到输液瓶中。

[0041] 下列实施例更详细地阐述了本发明:

[0042] 实施例 1:

[0043] Cohn 组分 I+II+III 或 II+III 溶解在 12 倍体积的水中, 使用 1M 乙酸将 pH 调至 4.9, 在 2-8°C 的温度下搅拌溶液最长 5 小时直到大多数 IgG 溶解。之后将辛酸盐以 1M 辛酸钠储备溶液加入 IgG 溶液直到辛酸盐浓度为 20mM, 同时加入 1M 乙酸保持 pH 恒定为 4.9。搅拌该溶液 1 小时。在这些条件下脂质和杂质沉淀出来并通过过滤除去。之后在保持 pH 恒定为 4.9 的条件下再次向溶液中加入辛酸盐直到溶液中浓度为 20mM。再次产生沉淀并通过过滤除去。过滤之后得到澄清的溶液。用 0.1M NaOH 在 7±3°C 的温度下将该溶液的 pH 调至 5.1 并施加到 Source Q 30 柱上。IgG 溶液穿透柱子而杂质和辛酸盐与柱子结合。将收集的 IgG 溶液浓缩至蛋白质浓度为 70mg/ml 并对 5 倍体积的 pH 5.1 磷酸缓冲液透滤。随后, 将 0.3% (w/w) TnBP 和 1% (w/w) Triton X-100 加入溶液, 然后剧烈搅拌。在 7±3°C 的温度下搅拌至少 4.5 小时之后, 加入 5% (w/w) 蓖麻油。在室温下进行油萃取。分离油相和水相并用 Millipore Opticap Polysep 过滤器过滤水相。将过滤的溶液施加到用名称为 μ Bondapak (Waters) 反相基质填充的柱子上。随后用 0.1M NaOH 在 7±3°C 的温度下将溶液的 pH 调至 6.8 并施加到强阴离子交换剂上, 即 Q-Sepharose-XL。IgG 流过柱子而杂质与柱子结合。用 0.1M NaOH 在 7±3°C 的温度下将收集的 IgG 溶液的 pH 调至 4.7。再次进行超滤以调节蛋白质浓度至最终浓度为 50 或 100mg/ml, 随后加入麦芽糖至浓度范围为 2-10% (重量), 优选 8% 或甘氨酸至浓度范围为 0.1-0.5M 尤其 0.1-0.3M, 优选地 0.3M 尤其 0.2M。无菌过滤之后, 将溶液填充到灭菌和硅烷化处理的不同体积 (50、100、200ml) 输液瓶中。用塞子密封输液瓶。

[0044] 实施例 2:

[0045] 此实施例与实施例 1 具体区别在于 pH 4 孵育步骤的实施。Cohn 组分 I+II+III 或 II+III 溶解在 12 倍体积的水中, 使用 1M 乙酸将 pH 调至 4.9, 在 2-8°C 的温度下搅拌溶液最长 5 小时直到大多数 IgG 溶解。之后将 1M 辛酸钠母液作为辛酸盐加入 IgG 溶液中直到溶液中辛酸盐浓度为 20mM, 同时加入 1M 乙酸保持 pH 恒定为 4.9。搅拌该溶液 1 小时。在这些条件下脂质和杂质沉淀出来并通过过滤除去。之后在保持 pH 恒定为 4.9 条件下再次向溶液中加入辛酸盐直到溶液中浓度为 20mM。再次产生沉淀并通过过滤除去。过滤之后得到澄

清的溶液。将收集的 IgG 溶液浓缩至蛋白质浓度为 70mg/ml 并对 5 倍体积的 pH 5.1 的磷酸缓冲液透滤。用 0.1M NaOH 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将该溶液的 pH 调至 5.1 并施加到强阴离子交换剂 Q-Sepharose-XL 上。IgG 穿透柱子而杂质和辛酸盐与柱子结合。随后,将 0.3% (w/w) TnBP 和 1% (w/w) Triton X-100 加入溶液,然后剧烈搅拌。在 $4-10^{\circ}\text{C}$ 搅拌至少 4.5 小时之后,加入 5% (w/w) 蓖麻油。在室温下进行油萃取。分离油相和水相并用 Millipore Opticap Polysep 过滤器过滤水相。将过滤的溶液施加到用 Amberchrom CG-161M 填充的柱上。随后用 0.1M NaOH 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将溶液的 pH 调至 6.8 并施加到强阴离子交换剂 Q-Hyper D 上。IgG 穿透柱子而杂质与柱子结合。用 0.3M HCl 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将收集的 IgG 溶液的 pH 调至 4.0。将溶液无菌过滤并在 $37\pm 3^{\circ}\text{C}$ 保存至少 24 小时。之后用 0.1M NaOH 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将溶液的 pH 调至 4.7。再次进行超滤来调节蛋白质浓度,使得用麦芽糖或甘氨酸配制后其最终浓度为 50 或 100mg/ml。无菌过滤之后,将溶液填充到灭菌和硅烷化处理的的不同体积 (50、100、200ml) 输液瓶中。用塞子密封输液瓶。

[0046] 实施例 3:

[0047] 此实施例与之前的实施例具体区别于,在第一次 AEX 步骤之前将 IgG 溶液浓缩至 70mg/ml 蛋白质浓度及实施纳滤步骤。

[0048] Cohn 组分 I+II+III 或 II+III 溶解在 12 倍体积的水中,使用 1M 乙酸将 pH 调至 4.9,在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 的温度下搅拌溶液最长 5 小时直到大多数 IgG 溶解。之后将 1M 辛酸钠母液作为辛酸盐加入 IgG 溶液直到溶液中辛酸盐浓度为 20mM,同时加入 1M 乙酸保持 pH 恒定为 4.9。搅拌该溶液 1 小时。在这些条件下脂质和杂质沉淀出来并通过过滤除去。之后在保持 pH 恒定为 4.9 条件下再次向溶液中加入辛酸盐直到浓度为 20mM。再次产生沉淀物并通过过滤除去。过滤之后得到澄清的溶液。将收集的 IgG 溶液浓缩至蛋白质浓度为 70mg/ml 并对 5 倍体积的 pH 5.1 的磷酸缓冲液透滤。用 0.1M NaOH 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将该溶液的 pH 调至 5.1 并施加到强阴离子交换剂上。IgG 穿透柱子而杂质和辛酸盐与柱子结合。随后用 0.1M NaOH 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将溶液的 pH 调至 6.8 并施加到第二个强阴离子交换剂上。IgG 穿透柱子而杂质与柱子结合。用 0.3M HCl 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将收集的 IgG 溶液的 pH 调至 4.0。该溶液经过 0.1 μm 过滤器过滤,之后使用孔径开始向下至 20nm 的一系列 PALL 过滤器,即 PALL DVD、DV 50 和 DV 20 进行纳滤。纳滤过的溶液在 $37\pm 3^{\circ}\text{C}$ 保存至少 24 小时。之后用 0.1M NaOH 在 $7\pm 3^{\circ}\text{C}$ 的温度下将溶液的 pH 调至 4.7。再次进行超滤来调节蛋白质浓度,使得通过加入麦芽糖或甘氨酸用麦芽糖或甘氨酸配制后其最终浓度为 50 或 100mg/ml。无菌过滤之后,将溶液填充到灭菌和硅烷化处理的的不同体积 (50、100、200ml) 输液瓶中。用塞子密封输液瓶。

[0049] 比较实施例

[0050] 本发明的方法

[0051] 大约 310g 组分 I+II+III (包括助滤剂) 在 12 倍体积的 WFI 中重构, WFI 的体积由没有助滤剂的组分 I+II+III 的理论重量计算。溶液在 5°C 搅拌 1 小时。随后将 pH 调至 4.9 ± 0.1 (约 950g)。继续在 5°C 重构 2 小时。随后取样品标为“重构的组分 I+II+III”。加入 1M 辛酸盐溶液达到浓度为 20mM。PH 恒定在 4.9。溶液在 5°C 孵育 1 小时。该溶液在 5°C 经深度过滤器和纸片过滤 (约 1050g)。之后用 10mM 氯化钠溶液后洗 (postwash) 过滤器。将滤出液加温到 25°C , 加入 1M 辛酸盐达到附加浓度为 10mM。溶液在 25°C 孵育 1 小时。

离心该溶液,上清液在孔径为 $1\ \mu\text{m}$ 和 $0.5\ \mu\text{m}$ 的过滤器 (1110g) 上过滤。取样品标为“辛酸盐后”。

[0052] 根据 EP 0 893 450

[0053] 大约 310g 组分 I+II+III (包括助滤剂) 在 7 倍体积的 WFI 中重构, WFI 的体积由没有助滤剂的组分 I+II+III 的理论重量计算。溶液在 5°C 搅拌 1 小时。将 pH 调至 4.1 ± 0.1 。在 5°C 继续重构 2 小时。随后取样品标为“重构的组分 I+II+III”。加入 1M 辛酸盐溶液达到浓度为 20mM。加入辛酸盐将 pH 变为 4.9 并调至 5.1。溶液在 5°C 孵育 1 小时。该溶液在 5°C 经深度过滤器和纸片过滤。之后用 10mM 氯化钠溶液 (约 1050g) 后洗过滤器。将滤出液加温到 25°C , 加入 1M 辛酸盐达到附加浓度为 10mM。溶液在 25°C 孵育 1 小时。离心该溶液, 上清液在孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的过滤器上过滤 (1110g)。取样品标为“辛酸盐后”。

[0054] 去除白蛋白和 IgA

[0055]

		pH 4.9 本发明	5.1 EP 0 893 450
实施例	样品	白蛋白	白蛋白
		[$\mu\text{g}/\text{mg}$ IgG]	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ IgG]
1	重构的组分 I+II+III	27.1	32.9
	辛酸盐后	0.2	10.2
2	重构的组分 I+II+III	44.2	32.6
	辛酸盐后	0.2	2.2
3	重构的组分 I+II+III	30.2	31.2
	辛酸盐后	0.8	9.9
4	重构的组分 I+II+III	22.7	33.1
	辛酸盐后	0.9	10.7
	重构的组分 I+II+III 的平均值	31.1	32.5
	重构的组分 I+II+III 的标准偏差	9.3	0.9
	辛酸盐后的平均值	0.5	8.3
	辛酸盐后的标准偏差	0.4	4.0

[0056]

		pH 4.9 本发明	5.1 EP 0 893 450
实施例	样品	IgA	IgA
		[$\mu\text{g}/\text{mg}$ IgG]	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ IgG]
1	重构的组分I+II+III	86	106
	辛酸盐后	40.9	49.3
2	重构的组分I+II+III	74.3	120.7
	辛酸盐后	23.7	60.5
3	重构的组分I+II+III	88.5	114
	辛酸盐后	30.8	56.9
4	重构的组分I+II+III	115.5	113.6
	辛酸盐后	34.4	51.3
	重构的组分 I+II+III 的平均值	91.1	113.6
	重构的组分 I+II+III 的标准偏差	17.4	6.0
	辛酸盐后的平均值	32.5	54.5
	辛酸盐后的标准偏差	7.2	5.1

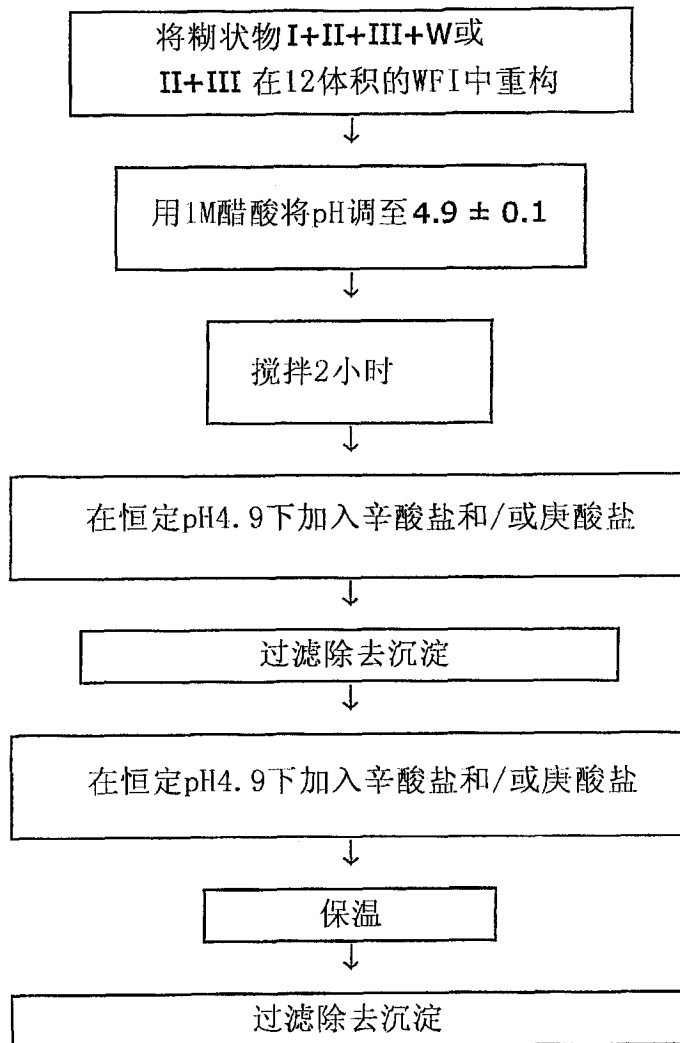
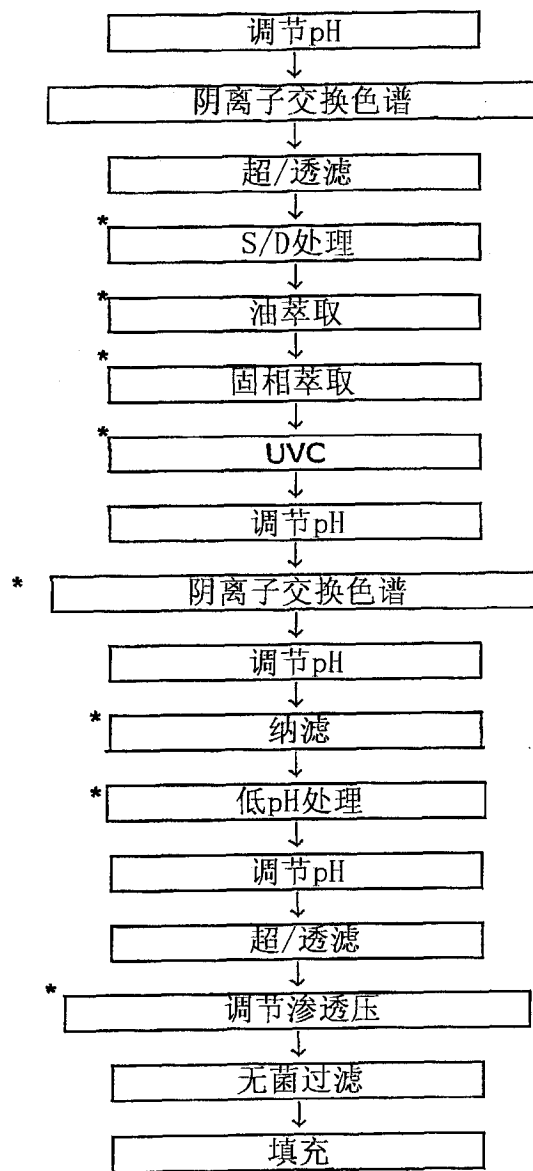


图 1



所有带星号的格子是任选的处理步骤

图 2