



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102939111 A

(43) 申请公布日 2013. 02. 20

(21) 申请号 201180029338. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 04. 21

A61L 2/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 16/06(2006. 01)

1006753. 6 2010. 04. 22 GB

A61K 9/08(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

A61P 31/00(2006. 01)

2012. 12. 14

A61P 37/00(2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/056486 2011. 04. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02011/131786 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

H·德切特穆勒尔 E·费尔切塞格

(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

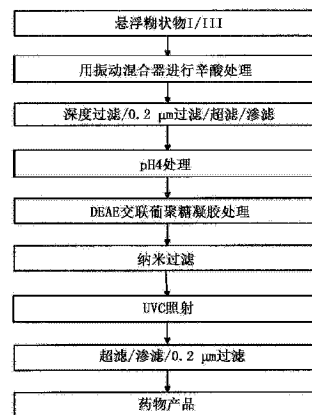
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

(54) 发明名称

制备免疫球蛋白组合物的方法

(57) 摘要

本发明提供一种从包含免疫球蛋白的血浆中制备免疫球蛋白组合物的方法, 以及用该方法制得的抗体制剂。



1. 一种从包含免疫球蛋白的血浆组分中制备含有 IgM 的免疫球蛋白组合物的方法,所述方法包括:

(a) 提供血浆组分,作为含有免疫球蛋白的溶液;

(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使污染性蛋白沉淀;和

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

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,在步骤 (b) 中所述 C₇ ~ C₉ 的羧酸的浓度为至少 0.075kg/kg 血浆组分。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其中,在步骤 (b) 中所述经混合的溶液的 pH 为 4.5 ~ 5.5。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,在步骤 (b) 中所述经混合的溶液的温度为 10°C ~ 35°C。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,在步骤 (b) 中将所述 C₇ ~ C₉ 的羧酸与含有免疫球蛋白的所述溶液温育至少 30 分钟。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述 C₇ ~ C₉ 的羧酸是辛酸。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述血浆组分的免疫球蛋白包含至少 5% 的 IgM。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述血浆组分是 Cohn 组分 I/III 或者 Kistler/Nitschmann 组分 B 或 B+I 的沉淀物。

9. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤 (c) 包括超滤,并且所述免疫球蛋白组合物包含经过滤的溶液。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括在 pH 3.5 ~ 4.5 温育来自步骤 (c) 的所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物以形成经温育的溶液的步骤。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其中,温育来自步骤 (c) 的所述含有 IgM 的免疫球蛋白组合物的所述步骤在 32°C ~ 42°C 进行。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的方法,所述方法还包括使所述经温育的溶液对 DEAE- 交联葡聚糖凝胶进行吸附的步骤,和通过深度过滤将所述 DEAE- 交联葡聚糖凝胶与所述溶液分离的步骤。

13. 如权利要求 12 所述的方法,所述方法还包括对来自所述深度过滤的滤液进行纳米过滤的步骤。

14. 如权利要求 13 所述的方法,其中,所述纳米过滤用具有 35nm ~ 75nm 标称孔径、优选具有 40nm ~ 50nm 标称孔径的过滤器进行。

15. 如权利要求 10 ~ 14 中任一项所述的方法,所述方法还包括用 UVC 照射对权利要求 10 或 11 中的所述经温育的溶液或者权利要求 12 ~ 14 中任一项中的滤液进行处理以形成经 UVC 照射的溶液的步骤。

16. 如权利要求 15 所述的方法,其中,用 200J/m² ~ 500J/m²、优选 200J/m² ~ 300J/m² 的 UVC 照射来处理所述经温育的溶液或所述滤液。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的方法,所述方法还包括在无菌条件下过滤所述经 UVC 照射的溶液以产生适于静脉内施用的抗体制剂的步骤。

18. 如权利要求 17 所述的方法,所述方法还包括将所述抗体制剂配制在 pH 为 4 ~ 5.5 的含甘氨酸的缓冲液中。

19. 如权利要求 15 ~ 18 中任一项所述的方法,所述方法还包括在无菌条件下将权利要求 15 或 16 中的所述经 UVC 照射的溶液或者权利要求 17 或 18 中的所述抗体制剂填充到容器中的步骤。

20. 如权利要求 15 ~ 19 中任一项所述的方法,其中,权利要求 15 或 16 中的所述经 UVC 照射的溶液或者权利要求 17 或 18 中的所述抗体制剂具有低于 8U/1 的蛋白水解活性。

21. 如权利要求 15 ~ 20 中任一项所述的方法,所述方法提供对无包膜病毒的大于 $3\log_{10}$ 的去除。

22. 一种抗体制剂,所述抗体制剂包含能够用权利要求 17 ~ 21 中任一项所述的方法获得的免疫球蛋白。

23. 一种适合于人类静脉内施用的抗体制剂,所述抗体制剂包含免疫球蛋白 IgG、IgA 和 IgM,具有低于 8U/1 的蛋白水解活性,并且其中总免疫球蛋白的至少 5% 是 IgM。

24. 如权利要求 23 所述的含有 IgM 的抗体制剂,所述抗体制剂在 2°C ~ 8°C 储存时稳定至少 2 年。

25. 如权利要求 22 ~ 24 中任一项所述的抗体制剂,其中,所述制剂含有至少 15% 的 IgM。

26. 如权利要求 25 所述的抗体制剂,其中,所述制剂含有至少 20% 的 IgM。

27. 如权利要求 26 所述的抗体制剂,其中,所述制剂含有 20% ~ 30% 的 IgM。

28. 如权利要求 22 ~ 27 中任一项所述的抗体制剂,所述制剂还包含稳定剂。

29. 如权利要求 28 所述的抗体制剂,其中,所述稳定剂是甘氨酸。

30. 如权利要求 22 ~ 29 中任一项所述的抗体制剂,其中,所述免疫球蛋白未受到化学修饰。

31. 一种含有 IgM 的免疫球蛋白组合物,所述免疫球蛋白组合物能够通过权利要求 1 ~ 9 中任一项所述的方法获得。

32. 如权利要求 22 ~ 30 中任一项所述的抗体制剂,所述抗体制剂用于医药应用。

33. 如权利要求 32 所述的抗体制剂,所述抗体制剂用于治疗免疫紊乱性疾病和细菌感染。

34. 如权利要求 33 所述的抗体制剂,其中,所述免疫紊乱性疾病是 IgM 缺陷疾病。

35. 权利要求 22 ~ 30 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和细菌感染的药物中的应用。

36. 一种患者的治疗方法,所述治疗方法包括施用权利要求 22 ~ 30 中任一项所述的抗体制剂。

37. 如权利要求 36 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。

制备免疫球蛋白组合物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种制备病毒安全的免疫球蛋白组合物的方法,以及能够利用此方法制备的抗体制剂和药物组合物。

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。与 IgG 制剂相比,IgM 抗体易于在溶液中聚集。IgM 制剂难以稳定化,尤其是在其与血浆浓度相比有所富集且储存在液体溶液中时。

[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。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的产品,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。然而,这些步骤可能对免疫球蛋白的活性具有负面影响;例如,过长的 UVC 照射时间可以使在最终免疫球蛋白溶液中所获得的天然的具有活性的 IgM 的产率降低。

[0005] 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。

[0006] 除了潜在的病毒以外,还有必要除去例如蛋白酶、蛋白聚集体和变性的免疫球蛋白等其他污染物,从而获得耐受良好的产品。对患者而言,变性的免疫球蛋白尤其是潜在的风险,因为其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。该抗补体活性(ACA)通过《欧洲药典(European Pharmacopoeia)》中描述的标准化测试来测量。

[0007] 为了(1)在静脉内施用后使患者对产品耐受、(2)确保产品符合有关病毒污染的生物安全性准则、(3)使产物在长期储存过程中稳定和(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] 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附步骤。该方法用于生产 Pentaglobin[®]——迄今为止唯一的市售静脉内 IgM 产品。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,并在升高的温度(40°C~60°C)下进行温育步骤。 β -丙内酯是为了使潜在的病毒灭活而在灭菌步骤中使用的公知化学物质。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。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%。

[0009] 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。

[0010] 由于要向患者静脉内施用大量的免疫球蛋白,所以必须获得可耐受的药物制剂。

[0011] 据已有描述,难以将 IgM 制剂制备成用于静脉内应用。就天然性质而言,IgM 在结合抗原后是补体的强力活化剂。因此,对患者而言,变性的 IgM 分子的非特异性抗补体活性比变性的 IgG 分子要危险得多。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 ≤ 1 CH50/mg 蛋白。

[0012] 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。

[0013] 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 通过利用对 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。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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。

[0017] 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/或通过层析进一步纯化,和/或进行温和热处理,则可以制造出具有低抗补体活性的含 IgM 的制剂。

[0018] 但是,产生未修饰的免疫球蛋白制剂的现有技术的方法不能实现针对所有潜在病毒的病毒灭活能力。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。

[0019] 因此,用现有技术的方法制得的具有低抗补体活性的所有含有未经化学修饰的 IgM 的制剂对人的使用而言在无包膜病毒(例如细小病毒)方面都不安全。

[0020] 综上所述,分离出静脉内可耐受的含 IgM 制剂的现有技术方法具有一定缺点,例如,不能有效地灭活或除去无包膜病毒,在保持溶液中 IgM 的高产量的同时消除蛋白水解活性方面能力有限。(蛋白水解活性是指存在于制剂中的蛋白酶总和)。由于液体蛋白制剂必须能够长期(例如 2 年)储存,所以必须消除残余的蛋白酶活性,因为这些活性可以使药物制剂降解。

[0021] 因此,本发明的目的是克服这些缺点。

发明内容

[0022] 在第一方面,本发明提供一种从包含免疫球蛋白的血浆组分中制备 IgM 免疫球蛋白组合物的方法,所述方法包括:

[0023] (a) 提供血浆组分,作为含有免疫球蛋白的溶液;

[0024] (b) 将 $C_7 \sim C_9$ 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使污染性蛋白沉淀;和

[0025] (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。

[0026] 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。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:(i) 未经化学修饰;(ii) 是病毒安全的;(iii) 具有低蛋白水解活性(并因此在长期储存过程中稳定);(iv) 具有低抗补体活性;和(v) 保留了高水平的天然的具有活性的 IgM。通过本文所述的方法实现的病毒安全水平是此前不能取得的。此外,使用本发明的方法可获得具有此前未能取得的具有这些特征的组合的含 IgM 的免疫球蛋白产品或抗体制剂。

[0027] 特别而言,本发明的方法步骤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。

[0028] 本发明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。

[0029] 此外，使用本发明的方法，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。

[0030] 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 $4\log_{10}$ 。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。

[0031] 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 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 下在液体溶液中持续超过 12 个月均非常稳定。

[0032] 因此，在另一方面，本发明提供能够用上文说明的本发明的方法获得的抗体制剂，以及含有 IgM 且蛋白水解活性低于 8U/1 的抗体制剂。特别而言，该抗体制剂适合于人类静脉内施用，且包含 IgG、IgA 和 IgM，其中，总免疫球蛋白的至少 5% 是 IgM。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 现将结合附图仅以举例方式来更详细地描述本发明。

[0036] 图 1 提供了本发明的实施方式的总览，其中示出了能够用来形成适合于静脉内施用的抗体制剂各步骤。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。

具体实施方式

[0037] 如上所述，本发明提供一种从包含免疫球蛋白的血浆组分制备含 IgM 的免疫球蛋

白组合物的方法。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。特别而言,如果药物免疫球蛋白组合物用于施用给人,则从人血浆获得血浆组分。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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 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 Typ 1”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)。

[0041] 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。

[0042] 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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 如上所述,本发明的方法在生产方面具有优势,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。

[0046] 需要进一步的加工步骤来将从步骤(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免疫球蛋白制剂。

[0047] 因此,在优选实施方式中,本发明的方法包括下述额外步骤:以温和的酸条件处理从步骤(c)获得的含 IgM 的免疫球蛋白组合物,并进一步对经酸处理的组合物进行 UVC 照射。

[0048] 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。

[0049] 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。

[0050] 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/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。

[0051] 除了温和酸处理和 UVC 照射外,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过滤步骤。在一个实施方式中,可以使处理中的蛋白溶液吸附到 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附,从而除去不需要的伴随性血浆铜蓝蛋白。

[0052] 在特别优选的实施方式中,使从温和酸处理中获得的经温育的溶液对 DEAE- 交联葡聚糖凝胶进行吸附,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。

[0053] 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。在另一优选实施方式中,对 UVC 照射后得到的免疫球蛋白溶液进行纳米过滤,优选通过孔径为 40nm ~ 50nm 的过滤器。优选的是,该步骤应当在无菌条件下进行。

[0054] 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,可以将该抗体制剂与稳定剂(例如甘氨酸

酸) 配制在一起。特别而言, 可以将该制剂配制在 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。

[0055] 本发明的方法优选不包括涉及对制剂中的抗体的化学修饰、对抗体的酶修饰或对抗体的热处理(例如, 在 40°C 以上的温度对抗体进行 10 分钟以上的处理)中的一项或多项的步骤。更特别而言, 本发明的方法不包括使抗体与 β -丙内酯和 / 或胃蛋白酶接触的步骤。

[0056] 本发明还提供通过上述方法获得的免疫球蛋白制剂或抗体制剂。该免疫球蛋白制剂为多克隆的, 且包含至少 5%IgM、优选包含至少 15%IgM 且更优选包含至少 20%IgM。其他免疫球蛋白为 IgG 和 IgA。优选的是, 该免疫球蛋白制剂包含 5% ~ 30% (更优选 15% ~ 30%) 的 IgM、5% ~ 30% (更优选 15% ~ 30%) 的 IgA 和 40% ~ 70% (更优选 45% ~ 70%) 的 IgG。在最优选的产品中, IgG 含量为约 50%, IgM 和 IgA 的含量各自为约 25%。这些值是指占 IgG+IgA+IgM 之和的百分比, 例如 IgM 占 IgG+IgA+IgM 之和的百分比。但是, 也可以用公知的方法(例如阴离子交换层析)来进一步富集 IgM。这些值可以通过浊度测定法或通过《欧洲药典 (Ph. Eur.)》(当前版本 (2010) 2.9.17) 的免疫沉淀来确定。

[0057] 特别而言, 该免疫球蛋白制剂中的免疫球蛋白未经化学修饰。该免疫球蛋白制剂在其制造过程中未用化学物质(例如 β -丙内酯)进行处理来对产品进行灭菌。类似地, 该制剂未用添加的蛋白酶(例如胃蛋白酶)进行处理来对产品进行灭菌。因此, 该免疫球蛋白基本为天然状态。

[0058] 该抗体制剂的蛋白水解活性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。在此类方法中, 蛋白水解活性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 $C(U/L) = S \times \Delta \text{Abs} / \text{分钟} \times F$ (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 ($\Delta \text{Abs} / \text{分钟}$) 计算得到。根据制造商的操作说明来使用该底物。

[0059] 特别而言, 蛋白水解活性可以通过以下步骤来估算:

[0060] (a) 将 25mg 底物 S-2288 (Chromogenix) 溶解在 7.2ml 注射用水中;

[0061] (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;

[0062] (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;

[0063] (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;

[0064] (e) 通过使用等式 $C(U/L) = 313 \times \Delta \text{Abs} / \text{分钟} \times F$ (C = 蛋白水解活性; F = 稀释因子) 由起始吸收差 ($\Delta \text{Abs} / \text{分钟}$) 计算出样品的蛋白水解活性。

[0065] 该方法的定量测定极限是 8U/l; 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/l。

[0066] 与本领域已知的制剂一样, 本发明的抗体制剂可以储存在 $5 \pm 3^\circ\text{C}$ 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(Pneumococcus saccharide)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。

[0067] 本发明的方法还提供了比现有技术的方法更高水平的病毒去除,从而获得了比现有技术的抗体制剂更安全的抗体制剂,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。本发明的方法能够除去/灭活病毒,特别是无包膜病毒,其除去/灭活程度超过 $3\log_{10}$ 、优选超过 $4\log_{10}$ 且最优选超过 $5\log_{10}$ 。由此得到了基本不含病毒、特别是基本不含无包膜病毒(即,病毒安全)的抗体制剂。另外,本发明的方法能够在不显著影响活性IgM的量或抗体制剂的抗补体活性的情况下实现上述水平的病毒颗粒去除/灭活。因此,能够获得在有包膜病毒和无包膜病毒方面均为病毒安全的抗体制剂,其包含至少15%、更优选至少20%的水平IgM,且抗补体活性 $\leq 1\text{CH}50/\text{mg}$ 蛋白。

[0068] 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,可用本发明的方法制备的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。

[0069] 特别而言,本发明的抗体制剂适合于向患者静脉内施用,特别适合于对人进行静脉内注射。

[0070] 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。

[0071] 现将仅以示例方式来进一步描述本发明。

[0072] 对用于确定抗补体活性的测试方法的说明

[0073] 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)来进行确定抗补体活性的测定。

[0074] 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。

[0075] 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(CH_{50})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。

[0076] 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。

[0077] 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 μ 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。

[0078] 实施例 1—从组分 I/III 制备富集有 IgM 的制剂

[0079] 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°C) 后混合 15 分钟~30 分钟。

[0080] 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 (V 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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 储存。

[0084] 实施例 2—对辛酸处理步骤中的条件的研究

[0085] 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)。

[0086] - 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)

[0087] - 辛酸处理的 pH :pH4.8 ~ 5.3

[0088] - 反应的温度范围 :14°C ~ 30°C

[0089] - 温育时间 :40 分钟 ~ 110 分钟

[0090] 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/l (按下文实施例 6 所述进行计算得到) 的最终产品,8U/l 为定量测定的极限。

[0091] 实施例 3—通过使用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

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096]

	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

[0097] 实施例 4- 对 UVC 处理的评估

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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 $200\text{J}/\text{m}^2$ 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 $400\text{J}/\text{m}^2$ 。

[0101] 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

[0102]

		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

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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

[0106]

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

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 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

[0110] 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)。

[0111] 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。

[0112] 表 4 :IgM 产生方法所致的总病毒消减

[0113]

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

[0114] a 在没有 UVC 照射步骤的验证数据的情况下的消减系数

[0115] 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。

[0116] 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。

[0117] 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

[0118] 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。

[0119] 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
[0120] 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)

[0121] 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。

[0122] 实施例 7:本发明的 IgM 制剂中的抗细菌效价

[0123] 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。

[0124] 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
[0125] 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

[0126] 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
[0127] 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

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 实施例 8 对液体 IgM 产品的储存稳定性研究

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] 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

[0134]

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

[0135] n. t. = 未测试

[0136] 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

[0137]

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

[0138] 实施例 9 用 IgM 产品进行的体内实验

[0139] 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。在施用免疫球蛋白制剂前的某个时刻,向这些动物施用对照剂量的 0.9%NaCl。在注射后确定了血压,从而确定施用是否与对非特异性补体活化的耐受水平相关。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 表 10a 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]
[0143] 平均值	229	240
SD	83	37
N	8	8

[0144] 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。

[0145] 表 10b 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]
[0146] 平均值	204	263
SD	20	61
N	4	4

[0147] 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)。

[0148] 这与安慰剂 0.9%NaCl 溶液的值 (9.4%, 11.7mmHg) 在相同的范围内。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。

[0149] 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。

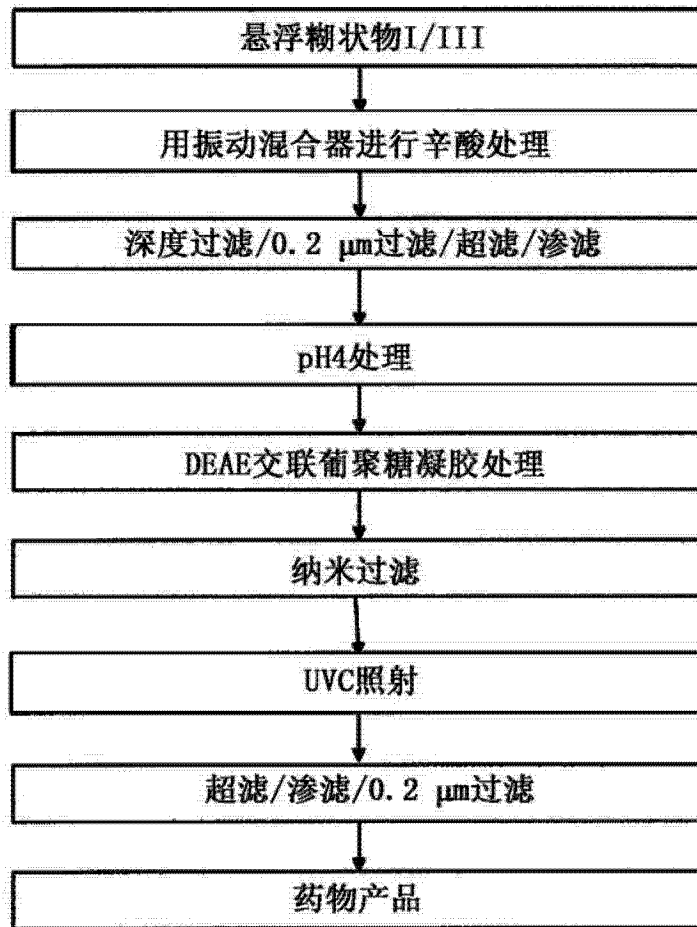


图 1