



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I554283 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 10 月 21 日

(21)申請案號：102109161

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 03 月 15 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

C07K16/18 (2006.01)

B01D15/36 (2006.01)

(30)優先權：2012/03/20 西班牙

201230413

(71)申請人：蓋立復股份有限公司 (西班牙) GRIFOLS, S. A. (ES)

西班牙

(72)發明人：瑞斯特戴伯特 比瑞 RISTOL DEBART, PERE (ES)；格蘭加蓋蒙 沙瓦多

GRANCHA GAMON, SALVADOR (ES)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

(56)參考文獻：

CN 1311797A

CN 101679509A

2010 年, Aghaie, A., et al., " Preparation, Purification and Virus
Inactivation of Intravenous Immunoglobulin from Human Plasma",
Hum. Antibodies, 2010, Vol.19, No.1, P.1-6.

審查人員：林桂滿

申請專利範圍項數：27 項 圖式數：0 共 43 頁

(54)名稱

經由熱處理獲得 I g G 組成物的方法

PROCESS FOR OBTAINING AN IGG COMPOSITION THROUGH HEAT TREATMENT

(57)摘要

本發明係關於由部分純化自人類血漿之 IgG 溶液獲得 IgG 組成物之新穎的方法，其中藉由施予中間熱處理及無使用試劑沉澱高分子量聚集物/聚合物及/或蛋白，達到實質上將此過程期間所產生的 IgG 聚合物整體去除。再者，相較於已知技術中的方法，此方法提供高生產力、低生產成本並且容易執行。除此之外，藉由使用本方法賦予液態的最終產物穩定性。

This invention relates to a new process for obtaining an IgG composition from an IgG solution partly purified from human plasma, in which by applying intermediate heat treatment and without using reagents to precipitate high molecular weight aggregates/polymers and/or proteins virtually total elimination of the IgG polymers generated during the process is achieved. Furthermore this process offers high productivity, lower production costs and is easy to implement in comparison with the processes of the known art. In addition to this, by using this process stability is imparted to the final product in liquid.

公告本

發明摘要

※ 申請案號： 102 109 16 /

※ 申請日：

102. 3. 15

※IPC 分類：

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

B01D 15/36 (2006.01)

【發明名稱】

經由熱處理獲得 IgG 組成物的方法

PROCESS FOR OBTAINING AN IgG COMPOSITION THROUGH
HEAT TREATMENT

【中文】

本發明係關於由部分純化自人類血漿之 IgG 溶液獲得 IgG 組成物之新穎的方法，其中藉由施予中間熱處理及無使用試劑沉澱高分子量聚集物/聚合物及/或蛋白，達到實質上將此過程期間所產生的 IgG 聚合物整體去除。再者，相較於已知技術中的方法，此方法提供高生產力、低生產成本並且容易執行。除此之外，藉由使用本方法賦予液態的最終產物穩定性。

【英文】

This invention relates to a new process for obtaining an IgG composition from an IgG solution partly purified from human plasma, in which by applying intermediate heat treatment and without using reagents to precipitate high molecular weight aggregates/polymers and/or proteins virtually total elimination of the IgG polymers generated during the process is achieved. Furthermore this process offers high productivity, lower production costs and is easy to implement in comparison with the processes of the known art. In addition to this, by using this process stability is imparted to the final product in liquid.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

經由熱處理獲得 IgG 組成物的方法

PROCESS FOR OBTAINING AN IgG COMPOSITION THROUGH
HEAT TREATMENT

【技術領域】

本發明係關於由部分純化自人類血漿之 IgG 溶液獲得 IgG 組成物之新穎的方法，其中藉由施予中間熱處理及無使用試劑沉澱高分子量聚集物/聚合物及/或蛋白，幾乎將此過程期間所產生的 IgG 聚合物整體去除。除此之外，相較於先前技術中的方法，此方法提供高生產力、較低生產成本及較容易執行。經由使用本方法亦賦予液態的最終產物穩定性。

【先前技術】

免疫球蛋白 G(IgG)為人類血清中最豐富的免疫球蛋白同型(8-16 mg/ml)，包括全部免疫球蛋白的約 80%。IgG 適用於治療各種疾病，其中包括，例如原發性免疫缺乏，特別是先天性免疫球蛋白缺乏症和咖瑪免疫球蛋白過低症、免疫性血小板缺乏紫斑症，作為川崎氏症之治療輔助劑及用於骨髓移植、與慢性淋巴性白血病有關的咖瑪免疫球蛋白過低症，於兒科病患中作為 HIV 感染之部分治療。

目前對於多價性帶有廣效人類抗體及具有完全功能性(中和能力、調理作用、平均生命維持)，具完整分子(可結晶 Fc 片段之整體)及等同或相當天然血漿之 IgG 亞群常態分布，特別是少數亞群(IgG3 和 IgG4)之免疫球蛋白 G(IgG)有高度的需求。

IgG 之治療性給藥路徑可為靜脈內、皮下及肌肉內，且除此之外，其可藉由其他非習用的路徑例如口服、吸入或局部路徑來給藥。

然而，靜脈給藥提供最有用的治療適性，無論用於治療原發性免疫缺乏或用於各種常見的免疫缺乏(缺乏 IgG 和 IgA 亞群)(Espanol, T. "Primary immunodeficiencies". *Pharmaceutical Policy and Law* 2009 ; 11(4) : 277-283)、續發性或後天免疫缺乏(例如經病毒如巨細胞病毒感染、帶狀皰疹、人類免疫缺乏)以及自體免疫性之疾病(例如，血小板減少紫斑症、川崎氏症候群)(Koski, C. "Immunoglobulin use in management of inflammatory neuropathy". *Pharmaceutical Policy and Law* 2009; 11(4): 307-315)。

理想上，靜脈用之 IgG(IGIV)應以高濃度調配於液體中且較佳地應能儲存至約 30°C，以幫助產品保存及立即輸注。

對於為了降低可能的 IgG 不耐受反應，必須應無免疫球蛋白 A(IgA)和免疫球蛋白 M(IgM)以及血液類屬凝集素或為不可偵測之量，已有描述。該產品，經由胞漿素或胞漿素原，或血漿激肽釋放酶原，或其活化劑激肽或激肽原，或凝血因子例如 XI 因子/XIa 因子之存在，應實質上應無任何酵素活性，亦為必須的。

換言之，以人類來源之起始血漿獲得多價 IgG 為將病毒或病原傳播之感染風險降至最低所必須。如 Fernandes 等人(ES 500121)和 Hirao, Y.等人(EP 196761 和 EP 253313)所述，可在抗 IgG 變性之保護劑(例如蔗糖、山梨醇、胺基酸)的存在下，有效地進行 IgG 溶液(液體)之熱處理或巴氏殺菌法。就此目的，係將溶液升高至約 60°C 溫度至少約 10 小時，活化或衰減最危險病源。這些病源可能具有脂質外殼，其中包括，例如人類免疫缺乏症病毒(HIV)、C 型肝炎病毒(HCV)和 B 型肝炎病毒(HBV)，或為裸病毒例如脊髓灰質炎病毒、A 型肝炎病毒(HAV)和微小病毒(Uemura Y.等人 "Inactivation and

elimination of viruses during the fractionation of an intravenous immunoglobulin preparation". Vox Sang. 1989; 56: 155-161)。

然而，巴氏殺菌法即使在安定劑的存在下和在最佳的處理條件下，或多或少依照起始的 IgG 的純度而定，不可避免地造成不可逆的高分子量蛋白聚集物例如 IgG 聚合物及/或其他伴隨的蛋白聚合物形成(Hirao, Y.等人, above; and Ristol, P.等人 EP 1225180 and ES 2091161)。

在 1960-1970 十年中，於 IgG 靜脈給藥期間已知為 IgG 聚合物之不可逆高分子量聚集物的出現係與彼等活化之補體的消耗有關(抗補體作用, ACA)，且此現象係與嚴重的不耐受性或觀察到的過敏反應相關聯(Barandum, S.等人 Vox Sang. 7: 157-174, 1962)。因為衛生管理當局規範 IGIV 中聚合物或高於二聚物之分子形式的最高含量限制為 3%(Eur.Ph. Monograph 6.3；及 CMP Core SPC for normal immunoglobulin for intravenous administration: CPMP/BPWG/859/95 rev.2)。此考量對於液體調配物特別重要，因為 3%限制亦必須維持至產品的到期日。因此在巴氏殺菌後及在所得到的最終產品中必須實質上全然無這些 IgG 聚合物存在，以確保這些產品經過長時間不會變壞及確保最高可能的儲存溫度。

目前大部分市售的和與胺基酸調配的液體 IgG 必須維持酸性的 pH 以避免聚集作用(Uemura, Y. "Dissociation of aggregated IgG and denaturation of monomeric IgG by acid treatment". Tohoku J. Exp. Med., 1983; 141: 337-349)，較佳地介於 pH 4.0 – 5.0 間(Tenold, R.等人 US-4396608)及若以 0.2 M 或 0.25 M 甘胺酸使其安定，例如已知的商品名稱 Gamunex®(西班牙 Grifols SA 公司)、Kiovig®或 Gammagard®液(二者係來自美國 Baxter 公司)為 2-8°C 的溫度，或若以 0.25 M 脯胺酸使其安定，例如 Privigen®(德國 CSL Behring 公司)

為至高 25°C，以便於將儲存期間的分子聚集作用減至最低(Jolles, S. 等人 "Clinical uses of intravenous immunoglobulin". Clin. Exp. Immunol. 2005 October ; 142(1): 1-11; Hooper, J.A. "Intravenous immunoglobulins: evolution of commercial IVIG preparations". Immunol Allergy Clin. North Am. 2008; 28(4): 765-778)。

已證明，長時間暴露在過量的酸性 pH 例如於 pH 4.5 或以下，及相對高溫例如 30°C，有利於 IgG 之碎裂(Vermeer, A.等人 "Thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein". Biophys. J. 2000 ; 78: 394-404; Shukla, A.等人 "Strategies to address aggregation during protein A chromatography". Bioprocess International, May 2005)。因此例如文獻中已提出，pH 4.8 $\pm$ 0.2 之經 L-脯胺酸調配的 10% IGIV 組成物就分子聚集作用而言具足夠的穩定性，但觀察到隨著暴露時間有碎裂傾向。因此，於 25°C 的溫度，在 36 個月後碎片量平均為 3.9%(Cramer, M.等人 "Stability over 36 months of a new liquid 10% polyclonal immunoglobulin product (IgPro10, Privigen®) stabilised with L-proline", Vox Sang. 2009. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01143.x)。

IgG 與多醇類，例如與麥芽糖和山梨醇調配防止聚集作用，已有描述(Katakam, M.等人: Aggregation of proteins and its prevention by carbohydrate excipients: Albumins and globulin. J. Pharm. Pharmacol. 1995; 47: 103-107)及因為此屬性，在高至 25°C(含 10%麥芽糖，商品名 Octagam®)及高至 30°C(含 5%山梨醇，商品名 Flebogamma® DIF)穩定的 IgG 溶液係調配於介於 5.0 和 6.0 之間的微酸 pH 範圍(Hirao, Y.等人, 專利 EP-278422)。

然而，最近幾年存在 IgG 中的某些糖類或衍生物已受到質疑 (Szenczi, A.等人: The effect of solvent environment on formation and

stability of human polyclonal in solution. *Biologicals*, 2006; 34(1): 5-14), 因某些嚴重腎衰竭的案例係與含蔗糖之 IgG 製備物的輸注有關。某些含特定糖類(蔗糖)和某些高濃度多醇類((10%麥芽糖)之免疫球蛋白組成物可能存在的其他缺點為輸注此溶液時增加血液黏度之相對能力, 當有過去病歷或該病患係處於風險中, 此項係與某些非常嚴重的血管內栓塞和急性心肌梗塞之案例相關(Radosevich, M. and Burnouf, T. "Intravenous immunoglobulin G: Trends in production methods, quality control and quality assurance. *Vox Sang.*, 2009; 1-17; Katz, U. and Shoenfeld, Y.: Review: intravenous immunoglobulin therapy and thromboembolic complications. *Lupus*, 2005; 14(10): 802-808)。

亦已檢測到某些市售的 IGIV 產品含有活性促凝集酵素(來自其純化過程的殘餘物), 其具有顯著的血栓栓塞效應(TEE), 並已證明 TEE 和 XI/XIa 因子及/或其他促凝血因子(例如激肽釋放素或其類似物)的存在之間的關聯。對於 IGIV 輸注液, 完成消除血栓栓塞力為勢在必行, 以作為耐受性和安全性的最大保證。

在未結合任何特定理論下, 本發明者咸信目前市售的 IGIV 間的主要差異不僅係由於調配物(胺基酸、糖類和多醇, 以及 pH), 亦歸因於獲得 IgG 之方法, 其將影響液態產物之最終的保存條件(溫度-時間), 在其特性中包括, 例如於儲存期間防止聚集或碎裂。其他作者(上述 Cramer, M.等人)已觀察到此液體 IgG 調配物安定性和其純化方法間的依賴性。

【發明內容】

本發明因此係提供克服前面所提及的先進技術之問題用以獲得 IgG 製備物之方法。本發明之方法係以含有經習用方法純化的 IgG

之物質開始，其另外於特定的安定劑、蛋白濃度、導電度、pH 及來自前面沉澱步驟之殘餘試劑濃度之條件下，以熱處理純化，亦稱為巴氏殺菌法，使其可降低蛋白和蛋白分解酵素雜質。此降低雜質和酵素係在此處理期間及/或在選擇性吸附聚合蛋白之後的步驟期間發生，但在任何情況下這二個步驟係單獨用作最終純化，無使用沉澱導入分離技術。

先前技術包括組合聚集物/聚合物沉澱和層析分離之工業規模用途，例如，如 Coval, L.所述(專利 US-4093606 和 US-4165370)及 Uemura, Y.等人(專利 ES-506679 和 EP-246579)，其描述使用聚乙二醇(PEG)之沉澱製程，一種導致高度 IgG 單體-二聚物(共沉澱)回收物流失之低選擇性方法，其根據所用的方法有很大的差異。例如，若熱處理係在尚未完全純化的 IgG 回收液(單體/二聚物)之 IgG 溶液中進行，則一般係介於 70 至 80%間(上述 Uemura, Y.等人)。在純化的 IgG 溶液之情況下，可得到較佳的回收成果，為 80-90%，但就此必須使用複雜的分離技術例如切向流微過濾(TFF)，如先前技術中所述(上述 Ristol, P.等人)。然而 TFF 法與沉澱劑(PEG)、安定劑(山梨醇)和注射用水之高消耗性有關，且當設備需重覆使用時，必須考量許多清潔-衛生操作。再者其係與長的處理時間有關，可能難以掌握，相關的消耗品及/或能源成本高且 IgG 單體/二聚物回收率通常低於 90%。

本發明作者已開發出一種方法，經由該方法將使用試劑所沉澱之如先前技術所述的高分子量聚集物/聚合物及/或蛋白屏除，且令人意外地實質地達到將所產生的聚合物整體移除，相較於先前技術的方法，具高生產力、低生產成本且容易執行。再者，經由使用此方法，使液態最終產物達到安定，較佳地於胺基酸或多醇之存在下調配，且其可在 2 至 30°C 間的溫度和 4.6 或以上及至高 5.8 之 pH 以

液態保存至少 1 年。

本發明因此係關於由人類血漿之部分純化的 IgG 溶液獲得 IgG 組成物之方法，其包括下列步驟：

- a) 滲濾部分純化的 IgG 溶液；
- b) 將步驟 a) 所得到的溶液安定化；
- c) 熱處理步驟 b) 所得到的溶液；
- d) 經由陽離子層析選擇性吸附來自步驟 c) 中熱處理溶液之高分子量聚集物及/或聚合物；及
- e) 滲濾及調配步驟 d) 所得到的溶液。

經由使用此方法，達到顯著地降低高分子量聚集物及/或聚合物含量，亦即該等高於 IgG 二聚物和其他不穩定的蛋白，得到基本上含 IgG 單體/二聚物之溶液，其可調配於微酸媒劑中，並可在周圍溫度以液態保存，而無顯著的不穩定現象，符合針對其較佳的靜脈或皮下或肌肉內施用所建立的規範。

較佳地本發明方法係由純化的人類血漿之 IgG 溶液開始進行，其就總蛋白而言，依照歐洲藥典中所述之方法，如以電泳於纖維素乙酸中測定，澱粉黑著色及光密度定量，係含大於 95%，及更佳地大於 97% 之 IgG 含量。

就起始物，本專利係考慮使用富含-IgG 的分餾液(以本項技術中已知的習用方法由人類血漿分餾所分離出，得到白蛋白)，接著適當純化來開始本發明之方法。

至今大都持續使用並在工業規模上以 Cohn 方法為基礎之乙醇血漿低溫分餾(Cohn, E.J.等人 Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components. J. Am. Chem. Soc. 1946; 68: 459-475)，分離出富含 IgG 的分餾液。此分餾液(Fr-II+III)或同等物(Fr-I+II+III)，含不同純度之大部分($\geq 90\%$)的 IgG 和血漿(一般介於

35 至 65%的 IgG 相對於其他蛋白)，必須經由沉澱，如 Cohn-Oncley 方法 9 所知以乙醇更廣泛地純化(Oncley, J.L.等人: The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta-1 lipoprotein into subfractions of human plasma. J. Am. Soc. 1949; 71: 541-550)直到獲得濃縮的免疫球蛋白分餾液(Fr-II，或濃縮的 Fr-III 之上清液)。另一種可行的選擇係使用 Kistler-Nistchmann 法(Kistler, P. 和 Nitschmann, Hs. Large Scale Production of Human Plasma Fractions. Vox Sang. 1962; 7: 414-424)直到沉澱(或等同的沉澱 A+I)，然後將其純化，得到 GG 沉澱，或沉澱 B 之濃縮的上清液(超濾液)。

以乙醇使用二種沉澱製程可能得到 IgG 溶液(來自 Fr-III 上清液、Fr-I+III、Fr-II、沉澱的 GC 或沉澱 B 之上清液)，其符合 $\geq 95\%$ 之 IgG 的最小純度特性(於乙酸纖維素上經由電泳)及較佳地 $\geq 97\%$ 之 IgG，此項為必須的，以便於可用作本發明方法之起始物。將肌肉內或皮下路徑可接受的 IgG 轉變為靜脈注射可耐受之製備物。

在任何情況下，目前係使用其他較佳的組合物增加起始物的純度(例如 Fr-II+III 或沉澱 A)，例如，藉由沉澱大部分的污染物及/或吸附於陰離子樹脂上及/或無機吸附劑(聚乙二醇、辛酸、離子交換層析、膨潤土、珍珠岩). Documents Ristol, P.等人 EP-1225180; Lebing, W.等人 EP-0893450; Teschner, W.等人：一種以新進劑述方法高度純化之新穎的液態、靜脈免疫球蛋白產品(10% IGIV)。Vox sang. 2007; 92(1)：42-55 有關供純化之有效方法，係在進行本專利之純化處理之前，經由以乙醇、PEG 或辛酸，結合離子交換層析沉澱以增加中間 IgG 分餾液(例如 Fr-II+III)純度達到 $\geq 95\%$ 的 IgG，及較佳地 $\geq 97\%$ 的 IgG。

進行本發明方法之步驟 a 中的滲濾，其目的為將衍生自標準 IgG 純化過程中不欲組分的濃度降至可能影響本發明方法之濃度值以

下。例如，一不欲的組份為乙醇，且經由此滲濾步驟(a)其應可降至低於 0.5%(重量/體積)之濃度，較佳地低於 0.1%。若有其他非變性沉澱試劑例如 PEG、辛酸、相容的非離子清潔劑或任何其混合物存在，則其濃度亦必須降至 2%(重量/體積)以下，且在任何情況下，直到在步驟 c)後其不會產生高於 3%的聚合物。

再者，在滲濾步驟中，起始的 IgG 溶液可調整至導電度低於 1 mS/cm 之離子強度，及將 pH 調整至 4.0 至 5.5 間，較佳地二者之情況。滲濾可以注射用水或較佳地以低離子強度之緩衝溶液，例如 ≤ 5 mM 乙酸溶液或以鹼或稀酸調整至 pH 4.0 - 5.0 的乙酸鈉溶液來進行。

滲濾步驟(a)較佳地係在切向流模式穿過例如聚醚磺或同等物之超過濾膜，使用介於 10 kDa 至 100 kDa 之分子截留來進行。有利地，在本發明方法中，滲濾步驟(a)亦用於將蛋白濃縮至低於 5%(重量/體積)之濃度，較佳地介於 2%至 4%(重量/體積)。

一旦得到步驟(a)溶液，則將其例如經由添加山梨醇作為安定劑至高 50%(重量/重量)，較佳地介於 30%至 35%重量比，加以安定化。除此之外，以本項技術中已知的方法，經由添加酸(例如鹽酸或乙酸)或鹼(例如氫氧化鈉)，將 pH 調整到 4.2 至 6.0 間，較佳地 pH 4.6 至 5.2 之間。

本發明方法之步驟(c)中溶液的熱處理或加熱為一特別的程序亦稱為巴氏殺菌法，且係在介於 55°C 至 63°C 之溫度間進行 1 至 24 個小時的時間。雖然此溶液可在上述範圍內之任何溫度熱處理至任何時間，但熱處理較佳地係在 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 進行 10-11 小時。在任何情況下，應產生不超過 3%的高分子聚合物/聚集物，及較佳地介於 1%至 2%。同樣地蛋白分解活性由於可能有促凝集因子，例如 XI/XIa 或其他蛋白酶存在，如本項技術中所述(參見實例 3)對不同基質

(S-2302、S-2288 和 S-2238)的顯色測量，相較於其最初的含量降低至少 5 倍。

隨後將溶液冷卻，較佳地介於 18°C – 30°C 間並稀釋，較佳地以至少 33%(重量比)之注射用水，或更佳地以含相容鹽類(例如乙酸钠、磷酸鹽、檸檬酸鹽或其類似物)之較佳地 ≤ 20 mM 濃度得緩衝溶液。一旦經稀釋，溶液含有山梨醇濃度 $\geq 5\%$ 重量比和蛋白濃度 ≥ 5 mg/ml。將完全可電離的相容鹽類，較佳地氯化鈉，為固體或濃溶液，例如 3 M (莫耳/公升)加到此溶液中直到得到介於 0.20 M(莫耳/公升)至 0.50 M(莫耳/公升)，較佳地介於 0.25 M (莫耳/公升)至 0.40 M(莫耳/公升)之氯化鈉溶液。若需要，pH 可藉由添加較佳地稀鹽酸或乙酸及/或氫氧化鈉調整至 4.2 至 5.5 間，及較佳地 4.5 至 5.0 之間。

將以上述方法所調整的溶液，亦即稀釋、調整鹽濃度和 pH 之後其含有最高 5%的二聚物，注射至含強陽離子交換灌流樹脂之層析管柱，該樹脂具有少一陽離子磺酸基團(磺醯基、磺酸或磺丙基：S、HS、SP 基團)與一合成不可溶和實質上不可壓縮的灌流基質共價連結，其包括聚甲基丙烯酸酯或聚苯乙烯之剛性粒子，及較佳地包括一聚苯乙烯之粒子基質或載體，介於 20 - 100 μ m 之聚乙烯苯。該樹脂可裝在適當包覆直徑之圓柱軸流管柱中，較佳的佔約 5 – 20 cm 樹脂高度，或裝在帶有較佳地介於 10 – 15 cm 路徑之徑流管柱中。在此二種情況下，每 kg 需純化的(乾)IgG 係使用至少 1 公升及較佳地 1 至 10 公升的該樹脂，其相當承載介於 100 至 1000 mg 的 IgG/ml 凝膠。較佳地裝在所用管柱中的樹脂量，每 kg 的 IgG 係介於 2 至 5 公升(相當承載 200 – 500 mg IgG/ml 的凝膠)。在注射產品之前，管柱係以含較佳地約 5 至 50 mM (毫莫耳)及更佳地 10 mM (毫莫耳/公升)之乙酸钠，及大約等於或相當於產物之濃度的氯化鈉濃度(若其為所選加到產物中的鹽)的緩衝溶液平衡。較佳的注射流速係不大於

50 個管柱體積/小時，及更佳地介於 5 – 30 個管柱體積/小時，較佳的溫度為 18°C – 30°C。IgG 單體/二聚物自由地通過管柱，達到大於 90%的總單體加上流出物中回收的應用二聚物(吸收<10%的單體/二聚物)，及較佳的≥93%的回收率，此流出物係回收在一蓄池中至適當的體積。

同時聚集物/聚合物係以樹脂捕捉至≥85%其起始含量之量，相當於 5-倍以上的降低量，較佳地降低量≥95% (≥20 倍)的起始含量，在源自熱處理的物質中，在管柱流出物池中發現含有≤0.3%的聚合物及較佳地≤0.1%或≤0.06%(未吸附)。同樣地，藉由適當增加管柱之承載和施予後清洗，例如以至少二個管柱體積的溶液，等同或相當於用於平衡管柱之量，單體/二聚物回收率可能甚至增加(最佳地)高達 ≥95%。因此可達到≥95%的回收率，將再產生的分溶液注射到相同的管柱，適當的稀釋和調整至起初承載所用的條件或較低離子強度。以漸增的梯度注射，如已指出的，亦可促進 IgG 單體/二聚物之回收率，且熟習本項技術者以此法或類似的方法可容易地達成≥95%的產物回收率。為了進行此項，載入係以根據 pH 之最大鹽濃度開始，以便於在第一次施用量時將超吸附現象降至最低，當離子強度降低時逐漸增加樹脂能力，直到完成承載的量。例如，較佳地可使用，相較於其結束時在開始載入時所選的產物之鹽濃度間至高 15% 漸減的梯度。

視需要本發明方法可包括一或多個病毒失活/消除處理，補充溶液之熱處理。在可用於本發明方法之病毒失活處理中，係於酸性 pH 培養(例如 pH 3.8 – 4.2 於 37 ± 2°C 進行 4-24 小時，在有或無胃蛋白酶(pepsin)，或非離子清潔劑例如 Pluronic、Triton、Tween 及其類似物之存在下)；以烷基磷酸酯有機溶劑(0.3%三正丁基磷酸酯或 TNBP)；清潔劑(1%Triton X-100 或 Triton X-45)(Neurath 等人 Patent

US-514375)，較佳地調整 IgG 溶液至 pH 4.2 – 6.0 及調整溫度至 4 – 30°C，培養 1 – 12 小時，及更佳地於 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養約 6 小時，及病毒滯留膜奈米過濾(再生纖維素、聚醚砜、聚偏氟乙稀)，經由正切流或端流，以匣式或夾心(平面)、濾心(摺疊、片狀、圓盤)或中空纖維形式，較佳地經由孔徑 $\leq 50\text{ nm}$ ，約介於 10-50 nm 及較佳地介於約 15 – 35 nm 及較佳地 $20 \pm 2\text{ nm}$ 孔徑之末端奈米過濾。這些失活/消除步驟可在熱處理步驟之前或之後進行，但當使用奈米過濾時，其較佳的應在熱處理前使用。

一旦本發明方法之步驟(d)完成，將得到的溶液以注射用水，或較佳地以例如可含有 $\leq 5\text{ mM}$ 、pH 4.0 – 5.5 之乙酸，及視需要安定劑或供最終調配之賦形劑的低離子強度緩衝溶液加以滲濾。最終的滲濾係藉由正切流經由聚醚砜或同等物之超過濾膜，使用較佳的介於 10 kDa 至 100 kDa，及更佳的介於 30 kDa 至 50 kDa 之分子截面來進行。經過適當的滲濾體積量來降低鹽濃度後，較佳地降至 $\leq 2\text{ mS/cm}$ 的導電度，蛋白較佳地係濃縮在 5%、10%、16%或 20%之標稱濃度，或任何介於約 5%至 22% (w/v)之中間濃度。溶液較佳地係經由添加多醇或胺基酸使其安定。在任何情況下，所生成的溶液之滲透壓將 $\geq 240\text{ mOsm/kg}$ ，及大約為等張。較佳地 pH 係調整至 5.2 ± 0.6 並作檢查以確保 pH 係落在 4.6 至 5.8 之間，若需要以稀酸或鹼再調整。

將調整的溶液以本項技術中已知的方法，經由 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 孔徑之絕對膜無菌過濾。將得到的液體溶液無菌地計量至適當的容器中，並於 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 進行培養(隔離)不少於 14 天，較佳地觀察各個別的計量單位之任何不穩定或污染跡象。將包含的產物於與隔離相同的條件下(周圍溫度 $25 \pm 5^\circ\text{C}$)或於冰箱($5 \pm 3^\circ\text{C}$)中儲存。由本發明方法所得到的產物在 2 – 30°C 之溫度仍維持穩定(基本上不會變化)至少 1 年，在其物理性質(外觀、顏色、濁度、沉澱物、粒子或纖維)或其

規格分析參數，例如根據歐洲藥典(高分子量聚集物、碎片、抗補體活性或 ACA、前激肽釋放酶活化劑、IgG 之亞群等)皆無顯示任何顯露降解之跡象。

【實施方式】

參照實例本發明係更詳細說明於下。然而並不希望這些實例限制本發明之技術範圍。

實例

實例 1.

由適合分餾的冷凍人類血漿之混合物開始，將其於介於 0 至 4°C 的溫度冷沉澱。將冷沉澱物以連續流動離心法[韋斯伐里亞(Westfalia)離心]於相同的冷沉澱溫度分離。依照 Cohn 分餾法 6(Cohn 等人，上述)使用冷乙醇處理上清液，直到獲得 Fr-II+III。將得到或沉澱的糊狀物(Fr-II+III)以壓濾法分離並於 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 冷凍。隨後，以 Cohn-Oncley 分餾法 9(Oncley, J.等人，上述)處理 Fr-II+III，直到獲得 Fr-II。將得到的 Fr-II 儲存於 $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 。

將 Fr-II 懸浮於等張的甘胺酸和氯化鈉溶液中並調整至約中性 pH。將此溶液以無機吸附劑處理，以離心分離(RINA 離心法)及然後於孔深 $\leq 0.5\ \mu\text{m}$ 之過濾器上淨化。

使用 0.5 M HCl 將濾液調整 pH 至介於 5.5 至 6.0 間並經由具有標稱分子截留 10 kDa 之聚砜膜加以超過濾。先將體積減低及然後以定容於 2 – 8°C 以注射用水開始滲濾。一旦完成此項，將超過濾設備後沖洗並將溶液調整至(於 280 nm) $60 \pm 5\ \text{AU}$ 之蛋白光學密度。每 kg 的溶液加入 0.5 kg 量的固體山梨醇及溶解後使用 0.5 M HCl 將溶液的 pH 調整至 5.5 ± 0.5 。

然後於恆溫容器中經由外罩再循環熱流進行熱處理，以此法將

產物升至 60 至 61°C 並保持在此處歷時 10 – 11 小時。然後將溶液冷卻至 2 – 8°C。

所得到的 3 個個別批件之平均結果係如表 1 所示。

表 1

方法之步驟	總蛋白(%) (O.D. 280 nm)	純度 (% IgG 電泳)	聚合物(%)	乙醇 (% v/v)	導電度 (mS/cm)
懸浮液 Fr-II	6	≥97	~0.2	3.3 (3.2-3.4)	~10
超過濾溶液	4	≥97	0.21 (0.19-0.23)	≤ 0.1	≤0.5
經加熱溶液(10 h 於 60 – 61°C)	3	≥97	1.58 (1.30–1.86)	≥0.1	≤0.5

上述結果係顯示先前 Fr-II+III 純化(以電泳測定，FrII 懸浮液 ≥97%)及減少變性劑(乙醇)在熱處理期間對聚集作用之效應，僅含 1.58%的聚合物，使其得以進行後續的合成陽離子樹脂之吸附作用。

實例 2

由人類血漿庫開始，此方法與實例 1 所述相同，直到獲得 Fr-II+III(試驗 a)及接著 Fr-II(試驗 b)。為了建立純化以及變性劑存在於熱處理期間對聚合作用之效應，程序係如下：

a)將 Fr-II+III 於 2 – 8°C 以 1:3.5 重量比之比例懸浮於注射用水中，在得到均質的懸浮液後，以 0.5 M HCl 使 pH 為 5.25 ± 0.25 。隨後於傾析器中將其離心(離心力介於 200 g – 1000 g)，產生澄清的懸浮液。

b)如實例 1 處理 Fr-II，直到經由深度過濾得到淨化的溶液。

藉由於每 kg 的起始上清液加入 0.5 kg 量之固體山梨醇使各上述

溶液安定。待山梨醇溶解後，若需要，將 pH 調整至 5.5 ± 0.5 。將各溶液加熱至 $60 - 61^{\circ}\text{C}$ 歷時 10 – 11 小時。然後將其冷卻至 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 。

將巴氏殺菌產物於試驗 a)和 b)所得來的結果，與實例 1 相比較，係如表 2 所示。

表 2

試驗或方法	總蛋白(%) (O.D. 280 nm)	IgG 純度 (%)	聚合物(%)	乙醇 (% v/v)	導電度 (mS/cm)
試驗 a)	4	75	15	2.5	2
試驗 b)	4	≥ 97	5.03	2.5	≤ 0.5
實例 1 方法	4	≥ 97	1.58	≤ 0.1	≤ 0.5

試驗 a)和 b)之結果驗證了起始的 IgG 之純度效應及達到 $\geq 97\%$ 數值之需求。另一方面，將試驗 b)與實例 1 的方法相比較，源自乙醇分餾之殘餘的乙醇之效應及需要消除為明顯的。因此推論僅實例 1 中的條件可被本發明方法接受。

實例 3

將血漿以與實例 1 相同之方法分餾直到 Fr-II+III，並將此物質以 PEG 或陰離子交換樹脂純化，直到獲得足夠純度的產物。

就最初的 Fr-II+III 純化，係應用如專利 EP 1225180 說明書中所述的相同方法條件，在此實例中，係將 Fr-II+III 懸浮於含山梨醇、磷酸二鈉和乙酸之水溶液中，直到所有的 IgG 有效地溶解。藉由添加至高 4%的 PEG 將主要伴隨的蛋白沉澱出。之後加入無機吸附劑和過濾輔助劑。將 pH 調整至 5.0 ± 0.5 ，之後以壓濾法(纖維素壓濾器)將沉澱分離出。將糊狀物分離並將濾液收集一起。注射至含 DEAE-Sepharose®(瑞典 Amersham Biosciences 公司)型陰離子交換樹脂之層析管柱，在進入管柱前，調整 pH 和淨化梯度過濾至 ≤ 0.5

μm。收集所有在載入含純化的 IgG 產物期間所得流出物。

將上述流出物以 0.5 M HCl 調整至 pH 4.4 ± 0.2 並經由具有標稱分子截留 100 kDa 之聚砜膜加以超過濾。最初體積減少約 4 倍產生濃度 2% 的蛋白，及然後以含 4 mM 乙酸(毫莫耳/公升)和 5% 山梨醇、經 0.5 M NaOH 調整至 pH 4.2 ± 0.2 之 4 體積的注射用水以定容於 2-8°C 開始滲濾。一旦完成此項，將超過濾設備後沖洗產生(於 280 nm)55 ± 5 AU 蛋白之光學密度。隨後加入 0.5 M HCl 至 4.0 ± 0.1 之 pH，接著於 37 ± 1°C 培養 4 小時。

然後每 kg 的溶液(33%重量/重量)加入 0.43 kg 量的固體山梨醇，及待其溶解後以 0.5 M NaOH 將溶液的 pH 調整至 4.9 ± 0.1。

熱處理係於恆溫容器中經由外罩再循環熱流來進行，因而將產物升至 60 至 61°C 並保持在此處歷時 10 – 11 小時。然後將溶液冷卻至 2 – 8°C。用於監測此過程之分析組合物結果係如表 3 所示。

表 3

方法之步驟	總蛋白 (%)	IgG 純度 (%)	聚合物(%)	乙醇 (% v/v)	PEG (%)	導電度 (mS/cm)
Fr-II+III 懸浮液	n.d.	70	12	1	0	1.5
純化的管柱流出物溶液	n.d.	≥98	≤0.06	0.8	4	1.2
超過濾溶液	4.0	≥98	≤0.06	≤0.1	0.8	≤0.5
經加熱的溶液 (10h 於 60°C)	2.8	98	1.5	≤0.1	0.5	≤0.5

n.d.：未測定

表 3 之結果係顯示 0.8% 之殘餘的 PEG 含量不會影響熱處理期間之聚合化程度(1.5% 的聚合物)。同樣地此聚合作用不會受先前所

用的純化方法所影響，無論是單獨使用乙醇或乙醇+PEG+陰離子層析(參見實例 1 和 2)，其限制條件為達到相同等級的純度($\geq 97\%$ 的 IgG)。

同樣地就不同顯色基質之分析測定係如先前實例 3 所述，以相同方法處理之製備規模於其他批件上進行，以便於評估此等步驟具有使蛋白分解酵素(主要地促凝血劑)失活之能力。根據先進技藝所述之技術為基礎，使用基質 S-2302、S-2288 和 S-2238(對凝血酶原複合物、凝血酶、胞漿素原/胞漿素、FXI/FXIa、FXII、PKA 等凝血因子具專一性)，計算相對於所用的蛋白濃度(g/ml)之每分鐘(min)光學密度(O.D.)吸收單位中顯色反應之動力學梯度。在巴氏殺菌之前和之後這些步驟之比率(O.D./min)/(g/ml)係如表 4 所示。

表 4

方法之步驟	蛋白質分解活性 (O.D./min)/(g/ml)		
	S-2302	S-2208	S-2238
純化的管柱流出溶液	1.69	2.03	0.23
超過濾溶液	0.87	1.1	0.14
經加熱溶液 (10h 於 60°C)	0.12	0.14	0.017

從表 4 中的結果將可看出在特定的巴氏殺菌之條件下，相較於最初的含量(超過率溶液)，根據所用的三種不同顯色基質所得到的值，蛋白質分解活性(主要促凝血因子)可降低 5 倍以上。

實例 4

可利用以與實例 3 相同的方法處理直到各自得到巴氏殺菌溶液

為止之 3 種不同產物批件。將各溶液以 10 mM (毫莫耳/公升)乙酸鈉溶液於約 20-25°C 稀釋約 4 倍，達到約 10 AU 的光學密度(於 280 nm)，及約 8%重量比的山梨醇濃度，加入使產物到達 0.4 M (莫耳/公升)最終濃度所需之 NaCl 量。經由添加稀 HCl(0.1 M – 0.5 M)將溶液調整至 pH 4.5。

將溶液注射至強聚苯乙烯陽離子層析管柱(POROS HS® 50 µm，美國 Applied Biosystems 公司)，體積約 8 ml(高 10 cm x 0.8 cm² 橫截面)。將管柱以約 10 個管柱體積之 pH 和 NaCl 濃度等於欲載入產物的 10 mM 乙酸鈉溶液緩衝液平衡。將產物以約 20 個管柱體積/小時之流速注入，其中從注射開始，收集所有來自管柱之流出物。得到 16 個管柱體積之固定體積的流出物樣本，相當約 155 mg 的 IgG/ml 凝膠之載量，以 O.D.(280 nm)測定蛋白及以 HPLC 測定聚合物含量，用以計算 IgG(單體/二聚物)的回收率%及所達成的聚合物降低%。表 5 係顯示所得到的結果。

表 5

PROCESS	O.D. (280 nm)稀釋溶液(AU)	蛋白回收率 (%)	起初聚合物 (%)	最終聚合物 (%)	聚合物降低 (%)
A 批件	10	n.d.	1.90	0.11	94
B 批件	10	n.d.	1.82	0.09	95
C 批件	10	96	2.51	0.15	94

n.d.：未測定

與先前的結果相符，得到聚合物含量非常顯著及一致的減少 94%至 95%，及就最初的 1.8%至 2.5%之聚合物含量得到 0.09 至 0.15 之最終含量。在另一方面，96%之 IgG 回收率(單體/二聚物)與超過 100 mg IgG/ml 之凝膠承載能力及低於 2 小時的處理時間(平衡及載

入)應為顯著的。

實例 5

所用的方法係與實例 4 相同，但於實例 4 所建立的條件下，檢測不同注射體積之承載能力。取得不同施用量之流出物樣本，以 O.D.(280 nm)測定蛋白及以 HPLC 測定聚合物含量用以計算 IgG (單體/二聚物)之回收%及不同承載值所達到的聚合物減少%(IgG/ml 凝膠之 mg)。結果係如表 6 所示。

表 6

施予的管柱量 (CV)	注射載量 (MG IgG/ml 凝膠)	聚合物(流出 物)(%)	聚合物減少 (%)	蛋白回收率 (IgG) (%)
最初承載溶液	0	2.51	0	100
2	14	≤0.06	≥ 98	87
16	115	0.15	94	95
32	230	0.19	92	95
50	360	0.25	90	97

此等結果非常明顯地驗證，在每小時至高 20 個管柱體積之正常流速條件下，可達到 360 mg 之 IgG/ml 凝膠的承載值，以最大 IgG 回收率，在至高 50 個施予管柱體積下以穩定方式維持減少聚合物至 0.3%以下。所用的載入之處理時間不超過 3 小時。

實例 6

為了瞭解建立 pH 4.5 之 NaCl 濃度的操作範圍及藉由最大化 IgG 回收率來最佳化聚合物消除，製程係如實例 4，但係探討介於 0.35 至 0.425 M 之不同的 NaCl 濃度，取樣 2 CV、25 CV 和 50 CV 之管

柱流出物以 O.D. (280 nm)測定蛋白及以 HPLC 測定聚合物，用以計算蛋白的回收%及聚合物降低量。所得到的結果係如表 7 所示。

表 7

施予的管柱體積(CV)	注射載量 (mg IgG/ml gel)	不同 NaCl 濃度之流出的聚合物(%)			
		0.425 M	0.40 M	0.375 M (n = 2)	0.35 M
最初承載溶液	0	1.88	2.12	2.13-2.14	1.99
2	14	0.10	n.d.	≤0.06	≤0.06
25	180	0.27	0.11	≤0.06	≤0.06
50	360	0.33	0.31	≤0.06	≤0.06
50 CV 時之承載流出物儲庫	360	n.d.	n.d.	≤0.06	≤0.06

n.d.：未測定

表 8 係顯示最後最大施予承載值(50 CV)之流出物中的 IgG 回收率及聚合物減低量。

表 8

pH 4.5 時之 NaCl 濃度(M)	IgG 回收率(%)	聚合物減低量
0.425	95.2	n.d.
0.40	93.0	n.d.
0.375 (n=2)	94.2 – 93.2	≥97
0.35	90.8	≥97

n.d.：未測定

上述結果驗證了在最佳的 NaCl 濃度條件下，聚合物減低量不會因施予承載量增加至 50 CV(或 360 mg IgG/ml 凝膠)而減少。同樣地已查明可使用從 0.40 M 至 0.35 M 之 NaCl 範圍，獲得最低聚合物含量(≤0.06% - 0.31%)及介於 90.8%至 94.2%之 IgG 回收率(單體/二聚物)之最大承載力。

在 pH 4.5、0.375 M 之 NaCl 濃度時得到最佳結果，其中 O.D. (280 nm) 為 10 AU 而注射流速為 20 CV/h。其已顯示在 50 CV(360 nm IgG/ml gel)時，殘餘的聚合物為≤0.06%(雙重複試驗)，其中 IgG 回收率 93.2% - 94.2%。處理時間不超過 3 小時。

實例 7

為了瞭解其中可使用 0.35 M 之 NaCl 濃度的 pH 範圍及藉由最小化 IgG 回收率來最佳化聚合物消除，係使用實例 4 之製程，探討介於 4.5 至 5.0 之 pH 範圍，及在 2 CV、21-25 CV 和 50 CV 之末端獲得管柱流出物之樣本，以 O.D.(280 nm)測定蛋白及以 HPLC 測定聚合物，並計算蛋白的回收%及聚合物降低量。所得到的結果係如表 9 所示。

表 9

所用的管柱量(CV)	注射載量 (mg IgG/ml 凝膠)	不同 pH 值時之聚合物(%)流出物			
		pH 4.96	pH 4.88	pH 4.76	pH 4.50
最初承載溶液	0	2.25	1.72	1.95	1.99
2	14	0.45	0.20	0.17	≤0.06
21-25	151-180	1.06	0.59	0.24	≤0.06
50	360	1.25	0.66	n.d.	≤0.06
總共載入流出物至高 50 CV	360	1.13	0.63	n.d.	≤0.06

n.d.：未測定

表 10 係顯示最後最大施予承載值(50 CV)之流出物中的 IgG 回收率及聚合物減低量，及在半數最大施予承載值(約 25 CV)之流出物中的聚合物減低量。

表 10

pH	IgG 回收率(50	聚合物減低量	聚合物減低量
----	------------	--------	--------

S

	CV)(%)	(50 CV) (%)	(25 CV) (%)
4.96	96.8	49.8	52.9
4.88	96.6	63.3	65.7
4.76	94.3 (*)	n.d.	87.7
4.5	90.8	≥97	≥97

(*)於 21 CV 之流出物中所測；n.d.：未測定

上述結果驗證了 pH 和 NaCl 之間對於在最小化 IgG 流失下有效減低聚合物之強烈的依賴性。已發現在 0.35 M 之 NaCl 濃度時試驗範圍內的最適 pH 大約係介於 4.76 至 4.50 間，因此殘餘的聚合物係介於 ≤ 0.06% - 0.24%(施予 21 – 50 CV)而 IgG 回收率係介於 90.8%至 94.3%間。處理時間為 2 至 4 小時。

實例 8

此製程係與實例 6 相同，但建立的 pH 係介於 4.85 至 4.88 間，以便於探討介於 0.1 M 至 0.4 M 間之最佳的 NaCl 濃度條件。結果係如表 11 所示。

表 11

管柱量 (CV)	注射載量 (mg IgG/ml 凝膠)	不同 NaCl 濃度之流出物						
		0.4 M (n=2)	0.375 M	0.35 M	0.325 M	0.3 M (n=3)	0.275 M	0.1 M
最初承載 溶液	0	1.55 2.19	1.71	1.72	1.28	1.94 1.33 1.57	2.11	1.51
2	14	0.52 0.56	0.25	0.20	0.06	≤0.06 ≤0.06 ≤0.06	≤0.06	≤0.06

25	180	0.98 1.18	0.84	0.59	0.25	0.10 0.13 0.12	≤0.06	≤0.06
50	360	1.23 1.34	0.94	0.66	0.25	0.13 0.16 0.15	≤0.06	≤0.06
50 CV 時之 承載流出 物	360	n.d.	0.87	0.63	0.17	≤0.06 n.d. 0.13	≤0.06	≤0.06

n.d.：未測定

表 12 係顯示最後最大施予承載值(50 CV)之流出物中計算 IgG 回收率及聚合物減低量之結果。

表 12

NaCl 濃度 (莫耳/公升) pH 4.85 – 4.88	(%) IgG 回收率	(%)聚合物減低量
0.4 M	95-97	n.d.
0.375 M	96.3	49.1
0.35 M	96.6	63.4
0.325 M	94.9	86.7
0.3 M	93.7	≥97
	93.6	n.d.
	93.7	91.7
0.1 M	76.0	≥96

n.d.：未測定

上述結果係顯示此方法在 pH 4.85 – 4.88，於 0.325 M 至 0.275 M 的 NaCl 範圍內，就最大承載力(50 CV, 或 360 mg IgG/ml 凝膠)為可行的，具有最小殘餘聚合物含量(≤0.06% - 0.17%)及介於 92.5%至

94.9%之 IgG 回收率(單體/二聚物)。以 0.3 M 的 NaCl 濃度得到最佳結果，以此達到流出物中 93.7%之回收率及 0.13%之殘餘的聚合物。在 0.1 M 之較低的 NaCl 濃度時，聚合物完全減少，但 IgG 回收率低於 90%。

比較此實例 8 和實例 6 之結果，pH 和 NaCl 間強烈的依賴性很明顯，且這些參數必須調整在適當的範圍內，以達到最佳的聚合物降低量及 IgG 回收值。上述實例驗證了就殘餘聚合物 $\leq 0.3\%$ 及降低量 $\geq 85\%$ ，和 IgG 回收率(單替/二聚物) $\geq 90\%$ 而言，在 pH 4.5 至 pH 4.9 以 0.275 M 至 0.4 M 之 NaCl 濃度，得到所欲的結果。

實例 9

此試驗的目的係評估在使用習用的層析法時，POROS HS®樹脂(美國 Applied Biosystems 公司)之承載力，其包括吸附所有的 IgG 供後續溶離，接著將得到的結果與前面的本發明實施例作比較。習用的層析法係於不同的注射流速，於 IgG 完全吸附至樹脂飽和之條件下進行。

由實例 3 相同的方法所處理的生產批件開始直到獲得巴氏殺菌溶液，將溶液以約 4 倍的 10 mM (毫莫耳/公升)乙酸鈉溶液於約 20 – 25°C 稀釋，以得到約 10 AU 光學密度(於 280 nm)含約 8% (w/w)山梨醇。將此溶液經由添加稀 HCl(0.1 M – 0.5 M)調整至 pH 4.5。

注射至約 4 ml 體積(高 4 cm 及截面積 1 cm²)之強聚苯乙烯合成樹脂陽離子層析管柱(POROS HS® 50 μ m, 美國 Applied Biosystems 公司)。以約 10 個管柱體積、pH 4.5 之 10 mM 乙酸鈉緩衝溶液平衡管柱。將產物以介於 5 至 20 個管柱體積/小時之不同的載入流速注射。由起初注入的不同管柱體積來採集管柱流出物之樣本，以 O.D.(280 nm)測定蛋白，以便於在約 5%蛋白質價之注射溶液中計算

動力流條件下的最大承載能力。所得到的結果係如表 13 所示。

表 13

注射流速 (CV/小時)	承載能力 (IgG/ml 凝膠之 mg)
5	63
10	58
20	55

從此等結果推論，發現用於 IgG 完全吸收之樹脂的最大能力，於最佳流速動力條件下，以習用的層析法，每 ml 樹脂係在 60 mg IgG 左右，且實質上在 5 – 20 CV/h 之注射流速研究期間仍未改變。得到此遠遠(低約 6 倍) >360 mg IgG/ml 凝膠之實例 6 和 8 中所得到的結果，施予本發明此方法條件，其驗證了本發明方法之生產力係遠優於先前技術中所描述之習用層析法。

實例 10

在此實例中，此試驗係設計用於全層析循環條件(載入、清洗和溶離)下以整體吸收 IgG(習用層析)測定層析解析(聚合物分離)及回收的 IgG，並將得到的結果與前面本發明方法之實例相比較。

程序係與實例 9 相同，但將在約 5 CV/h 流速時相當於 80%之其最大承載力的 IgG 溶液之起始量(約 50 mg IgG/ml 之凝膠)注射至管柱中。待所有的產物載入，以約 8 CV 的緩衝溶液，等同包含 10 nM 乙酸 pH 4.5 鈉之起始平衡溶液，進行後清洗。隨後施予從 0 至 1 M(莫耳/公升)含 0.5 M 甘胺酸 pH 4.5 之 NaCl 濃度梯度以總計約 25 CV 溶離 IgG。收集溶離的 IgG 分溶液供後續的蛋白分析(O.D. 280 nm)及分子分布分析(HPLC)。結果係如表 14 所示。

表 14

分溶液	量 (CV)	聚合物 (%)	IgG 總回收率 (%)
施予溶液	14	2	100
載入+後清洗溶出物	22	n.d.	n.d.
第 1 分溶液	16	≤0.06	64
第 2 分溶液(尾)	2.5	19	6
第 2 波峰	4	57	16
再生	5	50	4

n.d.：未測定

依照上述結果，已驗證載入 50 m IgG/ml 之凝膠，就聚合物含量≤0.06%，得到 64% IgG (單體/二聚物)之最大回收率，大部分的 IgG 混合不可回收的聚合物係在尾部分溶液中及第 2 溶離峰中發現。此回收值無法與其中施用本發明方法及已證明具令人滿意的聚合物消除量及大於 90% IgG 回收率之前面實例中所得到的回收值相比。

實例 11

另一試驗係設計用於研究 pH 限制和可使用的離子強度 (NaCl)，以及了解 IgG 對承載之效應。

以經巴氏殺菌、含以實例 3 相同方法處理之不同產物批量的 IgG，進行各種試驗。然而，其中一個試驗係使用 4-倍稀釋液(至 O.D. 280 nm = 10 AU)，而其餘 1.5 – 2 倍稀釋液(至 O.D. 280 nm = 20 – 23 AU)，大約使用 10 mM 乙酸鈉，並於各稀釋液中加入達到 0.275 M 至 0.45 M 之所欲最終濃度所需的 NaCl，分別調整到 4.2 至 5.5 之最終 pH。使用稀乙酸來作這些 pH 調整。將調整過的溶液以如實例 4 所述的獨立循環注射到 POROS® HS 50 管柱(美國 Applied

Biosystems 公司), 但在此案例, 於進行的試驗中係使用約 150 至 750 mg IgG/ml 之凝膠。

以 HPLC 測定聚合物和二聚物含量並就不同的承載值測定 IgG 回收率(%)。所得到的值係如表 15 所示。

pH	[NaCl] (M)	起初 O.D. 280	使用量 (CV)	承載量 (mg IgG/ml 凝膠)	起初		最終聚 合物 (%)	IgG 回 收率 (%)	聚合 物降 低量 (%)
					聚合 物 (%)	二聚 物(%)			
4.2	0.45	10	32	230	2.45	≤1	≤0.06	91.0	≥98
5.0	0.275	23	20	330	2.61	N.D.	≤0.06	n.d.	≥98
			35	580			0.07	92.6	97
4.85	0.275	20.6	10	147	1.76	2.5	≤0.06	92.5	≥96
			25	369			≤0.06	99.5	≥96
			40	590			0.12	97.2	93
			50	737			0.61	96.0	65
5.5	0.20	22.4	2	32	2.76	4.5	≥0.06	80.1	≥98
			25	403			0.38	96.9	86
			50	806			1.34	94.5	51

N.D.：未偵測

n.d.：未測定

以具有相當及低於 3%之最初聚合物含量的不同巴氏殺菌批件為基準，其已驗證對於此實例中所探討之極限值(pH 4.2 – 5.5 及 NaCl 0.20 – 0.45 M)內的任何調整，可能選擇性吸附聚合物高達介於 ≤0.06% - 0.12%之值，相當於 93%-98%降低量，而 IgG 回收率超過 80%(在 pH 4.2 至 5.0 間達到 91.0 – 99.5%)。同樣地應指出，當產物溶液中的蛋白濃度增加至 23 AU 之 280 nm O.D.值時，相當於 14.7 – 16.5 mg 之 IgG/ml，管柱的承載力和效率並未變小，達到 580 –

590 mg IgG/ml 凝膠之承載量。在 pH 範圍的上限(pH 5.5)時，鹽溶液必須略微降低(從 0.45 M 降至 0.2 M)以便於達到顯著的聚合物下降量。同樣地觀察到承載力比低 pH 值時更小，因為當使用 403 mg IgG/ml 凝膠時，測量到較大的聚合物含量，其下降量僅 86%。此效應可能係歸因於在 pH 5.5 時有較大量的二聚物分子存在，相較於 pH 4.2，其比例隨 pH 增加。

實例 12

從先前的實例 6、8 和 11，決定 POROS®-HS 50 聚苯乙烯灌注樹脂之實驗公式(1)，從該公式可能更精確建立所需的 NaCl 濃度以得到就最終聚合物和回收率作為所用 pH 函數之希望結果。運算式：
(1) $[NaCl] = 0.24 + (5.2 - pH)/5 = 1.28 - 0.2 \times pH$ 得到在所建立的 pH 範圍內(pH 4.2 – 5.5)對所研究的樹脂之大約希望值。以此實例之數據為基準，就最終的聚合物較佳地 $\leq 0.1\%$ 及不低於 90%的回收率，在不同 pH 時所需的 NaCl 濃度(觀測值和根據公式之計算值)係如表 16 所示。

表 16

pH	觀測值 (M)	計算值 (M)
4.20	0.45	0.44
4.50	0.375	0.38
4.85-4.88	0.300-0.275	0.31
4.96	0.275	0.29
5.20	n.d.	0.24
5.50	0.20	0.18

表 16 之結果係顯示觀測值和公式計算值之間良好的線性相



關，包括極端的 pH 值。

實例 13

將血漿以實例 1 之相同方法以乙醇分餾處理(根據 Cohn-Oncley 法)，得到純化的多價 IgG 溶液(純度≥97% IgG)。將得到的 Fr-II 經由 10 kDa 膜滲濾至 60 AU 及隨後在 33% d-山梨醇(重量/重量)之存在下及 pH 5.5 ± 0.5 巴氏殺菌(10-11 小時於 60–61°C)。將巴氏殺菌過的溶液以 pH 4.85 之 10 mM 乙酸鈉稀釋約 4 倍，因而使 280 nm O.D 從 42.8 AU 改變至 10.7 AU，及加入 NaCl 直到得到每公升溶液含 0.275 莫耳之最終濃度，使用 0.1 M HCl 調整 pH 至 4.85。以 HPLC 測定聚合物的比例為 0.88%。之後立刻將其以聚苯乙烯陽離子交換樹脂及 8.0 ml 體積(截面 0.8 cm² x 高 10 cm)以大約 20 CV/小時之流速，注射至管柱中(50 μm POROS- HS®)。得到不同施予載量(CV)之管柱流出物的樣本及就最終的匯集液，以 HPLC 測定分子分布(高分子量聚合物)及所得到的降低量。測得值係如表 17 所示。

表 17

載入		聚合物 (%)	聚合物降低量 (%)
承載量(CV)	mg IgG/ml 凝膠		
2	15	≤ 0.06	≥ 93
25	192	≤ 0.06	≥ 93
50	385	≤ 0.06	≥ 93
匯集液	385	≤ 0.06	≥ 93

所得到的結果顯示，以最佳的吸附處理條件，以高注射載量(385 mg 之 IgG/ml 樹脂)其可保留在先前以乙醇分餾純化的 IgG 巴氏殺菌液中所形成的所有聚合物(高達≤0.06%)。

實例 14

此試驗係設計用來測定當不同純化步驟合併成單一步驟時，此方法之可行性。決定測量聚合物吸附是否能與先前以溶劑-清潔劑處理和後續吸附這些試劑之選擇性步驟組合。

為了進行此項，以 Fr-II+III 為起始物並以與實例 3 相同的方法處理，得到大量的巴氏殺菌溶液。將此溶液稀釋至 28 ± 1 AU 之 280 nm O.D.(大約 2%的蛋白)並加入包括三正丁基磷酸酯和 Triton X-100 之濃的溶劑-清潔劑溶液(x 10 倍)以分別達到 $0.3 \pm 0.1\%$ 和 $1.0 \pm 0.3\%$ 之最終濃度。將溶液升至 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 並均質約 30 分鐘。然後將其轉置於另外適合的容器中以便於在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 培養約 6 小時。處理後，將溶液以 100 mM 乙酸鈉和 2.75 M NaCl 稀釋至約 10%，因而最終濃度為加入溶液的 1/10 分量而蛋白濃度為 16.5 mg/ml。若需要，以 0.1 M HCl 將溶液的 pH 調整至 4.85 ± 0.05 ，得到 167 ml 之體積。

在此之前，將體積 17.5 ml 和高度 10 cm 疏水性樹脂及帶有矽烷醇基團之基質(SDR-HyperD®，美國 Pall 公司)的管柱(C8 碳氫化物)和體積 8.0 ml 之另外的 POROS-HS®陽離子樹脂管柱(50 μm ，美國 Applied Biosystems 公司)加以調適。將二支管柱以第一管柱(SDR-HyperD®)供應第二管柱(POROS-HS®)之方式連續相連接，並藉由以含 10 mM 乙酸鈉、0.275 M NaCl 之 pH 4.85 ± 0.05 的平衡溶液，以相當第一和第二管柱分別為 6 CV/h 和 13 CV/h 之流速穿流過，將其加以調適。

將先前製備的 IgG 溶液(167 ml)注射到第一 SDR-HyperD®管柱並將第一管柱之流出物供應至第二 POROS-HS®管柱。所計算的各管柱之承載值為：1) SDR-HyperD®管柱為 $167 \text{ ml}/17.5 \text{ ml} = 9.5 \text{ CV}$ ；2) POROS-HS®管柱為 $167 \text{ ml}/8.0 \text{ ml} = 21 \text{ CV}$ 。整個過程中之注射流速就第一和第二管柱分別為 6 和 13 CV/h。在載入結束時以約 2 CV

的平衡溶液進行後清洗，將所有的管柱流出物匯集至一儲池中。

各步驟之分子分布(HPLC)和蛋白(以 280 nm O.D.)結果係概述於表 18 中。

表 18

步驟	聚合物(%)	蛋白(%)	回收率(%)
經巴氏殺菌	2.22	2.75	100
SD 處理	3.67	1.80	100
經調整	3.67	1.65	100
SDR+POROS 流出物	≤0.06	1.58	95.7

上述結果顯示，聚合物吸附過程可較佳地合併並與方法中的其他步驟同時進行，因此整體時間減少，連同先前調適和後續清洗中之試劑消耗。

實例 15

試驗不同市售陽離子樹脂之聚合物保留能力以完成有關 IgG 單體/二聚物最佳可能的分離。為了進行此項，針對瓊脂(Sepharose®)比較不同來源的樹脂基體，特別是丙烯酸(Toyopearl®)。將樹脂裝入 1.75 cm² 截面之管柱，裝入高度 100 mm (XK16®來自 GE-Healthcare 公司)，各含 GigaCap Toyopearl-S 650®和 SP-Sepharose XL®樹脂。

起始物為如實例 3 中所處理之不同批的巴氏消毒 IgG 溶液之混合物，於其中加入 NaCl 至 0.275 M 及 0.20 M，若需要以 0.1 M HCl 調整 pH 至 4.85 ± 0.05。溶液具有約 22 AU 之蛋白濃度並以約 15 CV/h 之流速將至高 50 CV 注射至已準備及經相同 NaCl 調適過且 pH 濃度如試驗下的 IgG 溶液之管柱中。

將使用不同管柱體積所得到的聚合物回收結果與最初的相比係

如表 19 所示。

表 19

樹脂	載量		(%)聚合物回收率	
	CV	Mg 蛋白/ml 凝膠	NaCl (0.275M)	NaCl (0.200M)
GigaCap ToyoPearl-S 650 M	0	0	100	100
	10	158	97	15
	25	396	100	73
	40	633	104	97
	50	791	110	110
SP-Sepharose XL	0	0	100	100
	10	158	98	89
	25	396	100	95
	40	633	103	95
	50	791	95	91

就 SP-Sepharose XL 樹脂，總蛋白回收率係在 98%至 100%間變化，而 GigaCap-S 650M 係從 90 至 100%(10 CV 和 0.2M NaCl 時約 98%)。

上述結果顯示，丙烯酸陽離子樹脂(GigaCap-S® 650M 型)如同 POROS-HS®(陽離子聚乙烯)能選擇性保留由 IgG 之巴氏殺菌液所形成的聚合物，以降低存在的聚合物至 85%(15%回收率)之能力，就 158 mg/ml 凝膠之蛋白承載及 98%的蛋白回收率。明顯地，所得到結果可就 pH(降低)最適化，促進承載能力，以達到例如約 25 CV(396 mg 蛋白/ml 凝膠)。

已發現瓊脂型之非合成基體的樹脂(Sepharose XL)，在承載的流出物中於選擇性吸附聚合物之外在條件下，不具有足夠的解析能力將聚合物與 IgG 單體/二聚物分離。

同樣地可看到最適合的 pH 和 NaCl 濃度條件對所用的合成灌流樹脂為特定的。因此 GigaCap-S® 650M 型丙烯酸樹脂在 pH 4.85 時需要 0.2 M 以下的 NaCl，而 POROS-HS® 50 µm 樹脂則需要 0.3 M 的 NaCl。

顯然，熟習本項技術者可就各合成灌流樹脂類型找出 pH 和 NaCl 濃度間最適合的關係。

實例 16

然後檢查步驟中過程的可伸縮性至最終調配和濃縮為帶有 10% 蛋白之 IGIV 產物，檢驗產物的組成物特性。

將 1000 公升以上的血漿以乙醇分餾，得到 Fr-II+III 並持續純化直到獲得如實例 3 中所述的巴氏殺菌之大量溶液。

以注射用水稀釋至 27.98 AU (280 nm) 的光學密度及 0.26 mS/cm 的導電度後，取 6.34 kg 的上述巴氏殺菌溶液(相當約 26.2 公升的起始血漿)，檢測其 pH 為 4.65。於約 5 – 10 min 內劇烈攪拌下加入約 0.70 kg 濃的 3% 三正丁基磷酸酯之溶液(x 10 倍)和 10% Triton X-100。藉由添加 0.1 M NaOH 將 pH 調整至 4.79。得到 7.04 kg 的溶液並於周圍溫度(18 – 25°C)培養至 6 小時。以氣相層析測定三正丁基磷酸酯含量為 0.28%(2800 ppm)。

隨後加入含 10 mM 乙酸鈉 pH 4.85 之 1.5 M NaCl 溶液達到 0.275 M 之最終 NaCl 濃度。生成的 pH 為 4.81。隨後得到 6930.9 g 的溶液並注射至含 770 ml 的 SDR-HyperD® 樹脂(來自 Pall 公司)之直徑 140 mm 管柱，樹脂高度為 50 mm。注射係於周圍溫度及相當 6.1 CV/小時之流速下進行，而使所有溶液之載入在 2 小時以下。所產生的總承載比例為 9 CV (6.93 kg/0.770 L = 9.0 CV)。隨後使用 3 CV 的 0.275 M NaCl 和 10 mM 乙酸鈉溶液以 pH 4.85 進行後清洗。得到於產物溶

液注射期間所回收的 6.93 kg 管柱流出物，pH 為 4.82 及導電度為 16.75 mS/cm。以氣相層析分析測定三正丁基磷酸酯含量為 ≤ 5 ppm。

取 5.772 kg 的上述流出物並注射至 POROS HS®樹脂(50 μ m)之 222 ml 管柱，管柱直徑為 50 mm 而床基高度為 113 mm。將溶液於周圍溫度以約 10 CV/小時之流速注射至管柱中，因而此過程持續約 2.5 小時。收集載入產物期間得到的所有管柱流出物並與 1 CV 含 0.275 M NaCl、10 mM 乙酸鈉和 17%山梨醇(重量/重量)溶液 pH 4.85 之後沖洗液組合。得到 5.776 kg 之注射產物溶液期間所回收的管柱流出匯集液，光學密度為 18.508 AU (280 nm)，pH 為 4.84 而導電度為 6.95 mS/cm。

將上述的流出匯集液藉由過濾通過 0.1 μ m 加以淨化，及然後連續以 35 nm (Planova® 35N) + 20 nm (Planova® 20N)的孔徑梯度奈米過濾。當產物的奈米過濾完成後，將其以相當用於 POROS HS®管柱之 5%回收量之相同的後沖洗溶液進行後清洗，總計處理時間為約 18 小時。所得到的奈米濾液之量為 6.797 kg，pH 為 4.83，濁度 2.71 NTU 及導電度 17.1 nS/cm。

將奈米過濾的溶液經由標稱分子截留 10 kDa 之聚砜膜超過濾。將產物先濃縮 3.3 倍，從 14.4 AU (280 nm)之光學密度至大約 50 ± 10 AU (280 nm)，及然後將其以包含 2 mM 乙酸，以 NaOH 調整至 pH 4.2 ± 0.2 約 7 體積之透析液，於定容下滲濾。檢驗導電度(220 μ S/cm)後，加入足量的濃 33%山梨醇溶液，使最終的山梨醇濃度達約 5%(重量/體積)。最後將其濃縮 3.5 倍達到 140 ± 5 AU (280 nm)之光學密度，相當約 10%的蛋白，並以 0.1 M NaOH 調整 pH 至 5.25 ± 0.25 。得到 552.1 g 的溶液，最終 pH 為 5.26，濁度為 5.45 NTU 而導電度為 1.18 mS/cm。將此溶液經由 0.22 μ m 過濾並配分劑量至瓶中，pH 為 5.34，滲透壓 330 mOsm/kg，濁度 4.62 NTU 及導電度

1.34 mS/cm。此步驟的處理時間約 9.5 小時。

將計量瓶保持在 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 和 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 歷時 15 天以上，無顯示任何凝膠、或混濁或沉降、顏色改變或可看得見的纖維或粒子外觀之跡象。

表 20 係顯示整個取得過程之不同步驟中聚合物、二聚物、單體和分溶液的結果。

表 20

過程之步驟	聚合物 (%)	二聚物 (%)	單體 (%)	分溶液 (%)
巴氏殺菌	2.0	3.2	94.8	0
SDR 流出物	2.7	2.6	94.1	0.6
POROS 流出物	≤ 0.06	1.9	98.1	0
奈米過濾	≤ 0.06	3.0	96.5	0.5
作中濃縮液(0.2 μ)	≤ 0.06	4.3	95.6	0.1

從上述結果，顯然如前面所說明在先前實例中經由調整 pH 和鹽濃度已達到二聚物含量之控制($\leq 5\%$)，在產物中，於 POROS 管柱(巴氏殺菌和 SDR 流出物)能進行極佳吸附所出現的聚合物($\leq 0.06\%$)之前，將二聚物 IgG(於 SDR 流出物中 2.6%，及於 POROS 流出物中 1.9%)之損失降至最低。

由此結論出，得到 IGIV 之整個過程，藉由合併消除聚集物/聚合物與 SD 處理及其分離之步驟，連同奈米過濾、滲濾和最終調配整體為可行的並為可伸縮的，就最終產物有關聚合物含量($\leq 0.06\%$)和分溶液(0.1%)而言得到卓越的數值。

實例 17

將實例 16 中所得到的產物(10% IGIV)以每瓶 10 ml 計量置入

20 ml 玻璃瓶中，以 20 mm Ø 丁基橡膠塞密封，於周圍溫度 ($25 \pm 5^\circ\text{C}$)、避光存放 12 個月。在其安置約 1 年的時間後，將其以肉眼檢查(物理外觀)及分析測定最具代表的安定性參數。儲存開始($t = 0$)和結束($t = 1$ 年)所得到的數值係如表 21 所示。同樣地亦包括使用先進技術(專利 ES-200100101)以工業規模所得到的數值。

表 21

參數	時間=0	時間=1 年 (T:20-30°C)	規範 (Eur.Ph.)
pH	5.34	5.28	4.0-7.4
濁度(NTU)	4.62	7.09	n.e.
導電度(mS/cm)	1.34	0.63	n.e.
滲透壓(mOs/kg)	330	357	≥ 240
聚合物(% HPLC)	≤ 0.06	0.27	≤ 3.0
碎片(% HPLC)	0.09	0.92	≤ 5.0
IgG ₁ (%)	67.7	67.5	(相當於血漿)
IgG ₂ (%)	26.2	26.2	(相當於血漿)
IgG ₃ (%)	3.3	3.1	(相當於血漿)
IgG ₄ (%)	2.7	2.6	(相當於血漿)
PKA(UI/ml)	< 2	< 2	≤ 25
ACA(CH ₂₀ /mg)	0.79	0.89	≤ 1

n.e. : 未建立 ; Eur.Ph. : 歐洲藥典

對於可視的外觀而言，在粒子呈現(纖維、凝塊或沉降物)、或濁度(透明)或色澤(無色)之結果，並無發現樣本中有任何惡化。由此結論出，所得到的產品在 $25 \pm 5^\circ\text{C}$ 之周圍溫度下儲存 1 年基本上不會改變(聚合物、酵素例如 PKA、ACA 等)，該產品遵照歐洲藥典 (Eur.Ph.) 所規定之數值。

實例 18

將一批件以相當於實例 16 之製備規模大小，僅改變一項病毒失活步驟之順序加以處理，因此 SD 處理係在最初滲濾材質上進行及然後將這些試劑以 SDR-HyperD®樹脂吸附，及然後以與實例 16 相同之方法進行得到本發明產物所需之其餘的方法步驟，亦即在山梨醇的存在下進行巴氏殺菌及使用 POROS HS 灌流樹脂捕捉分子聚集物。最後，將得到的產物，經 5%山梨醇安定化，變成 10%蛋白濃度之 IGIV，以過濾殺菌並計量置入 20 ml 玻璃瓶中。將玻璃瓶以丁基橡膠塞密封並儲存於 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中約 1 年，及然後測定最明顯的安定性參數，包括肉眼檢視。開始時($t = 0$)和儲存後($t = \text{約 } 1 \text{ 年}$)所得到的結果，連同 Eur.Ph.規範係如表 22 所示。

表 22

參數	時間=0	時間=1 年 (T:2-8°C)	規範 (Eur.Ph.)
pH	5.23	5.18	4.0-7.4
濁度(NTU)	7.6	6.0	n.e.
導電度(mS/cm)	1.45	0.64	n.e.
滲透壓(mOs/kg)	384	399	≥ 240
聚合物(% HPLC)	0.30	0.40	≤ 3.0
碎片(% HPLC)	0	0.32	≤ 5.0
IgG ₁ (%)	67.6	70.2	(相當於血漿)
IgG ₂ (%)	25.4	26.9	(相當於血漿)
IgG ₃ (%)	4.2	4.0	(相當於血漿)
IgG ₄ (%)	2.8	3.2	(相當於血漿)
PKA (UI/ml)	<2	<2	≤ 25
ACA (CH ₂₀ /mg)	0.64	0.85	≤ 1

n.e.：未建立；Eur.Ph.：歐洲藥典

對於可視的物理性外觀而言，經由粒子呈現(纖維、凝塊或沉降物)、或濁度(透明)或色澤(無色)，並無發現樣本中有任何惡化。所得到的產品在 $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 之溫度下儲存約 1 年以上基本上不會改變(例如聚合物/碎片和蛋白質分解酵素例如 PKA)，該產品遵照歐洲藥典 (Eur.Ph.)所定之數值。

申請專利範圍

105年8月4日修正替換頁

1. 一種由部分純化自人類血漿之 IgG 溶液獲得 IgG 組成物之方法，其包括下列步驟：
 - a) 滲濾部分純化的 IgG 溶液，其中該部分純化的 IgG 溶液為純化自人類血漿，就總蛋白而言具有 95% 以上之 IgG 含量的 IgG 溶液；
 - b) 將步驟 a) 所得到的溶液安定化；
 - c) 於介於 55°C 至 63°C 溫度間，熱處理步驟 b) 所得到的溶液 1 至 24 小時的時間；
 - d) 經由陽離子交換層析選擇性吸附步驟 c) 之高分子量聚集物及/或聚合物；及
 - e) 滲濾和調配步驟 d) 所得到的溶液，並添加安定劑於最終調配物，其中最終調配物的 pH 係介於 4.6 至 5.8 之間。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該部分純化的 IgG 溶液為純化自人類血漿，就總蛋白而言具有 97% 以上之 IgG 含量的 IgG 溶液。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該部分純化的 IgG 溶液包含乙醇，且該滲濾步驟 a) 係進行直到乙醇濃度低於 0.5% (重量/體積)。
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該部分純化的 IgG 溶液包含非變性沉澱試劑，且該滲濾步驟 a) 係進行直到所產生之溶液中非變性沉澱試劑在步驟 c) 後不會產生大於 3% 的聚合物。
5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該滲濾步驟 a) 係進行直到該部分純化的 IgG 溶液的離子強度低於 1 mS/cm。
6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 pH 值在步驟 a) 結束時係在 4.2 至 6.0 的範圍內。
7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該滲濾步驟 a) 係以注射用水或以低離子強度之緩衝溶液來進行。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該低離子強度之緩衝溶液為 $\leq 5\text{mM}$ 的乙酸或乙酸鈉溶液，其具有介於 4.0 至 5.0 之 pH。
9. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該滲濾步驟 a)係以切向流模式穿過具有 10 kDa 至 100kDa 分子截留的膜來進行。
10. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中該滲濾步驟 a)中人類血漿中的蛋白係濃縮至不超過約 5%(重量/體積)之濃度。
11. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該安定步驟 b)中係使用山梨醇作為安定劑。
12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中用於安定步驟(b)中之山梨醇濃度係低於 50%(重量/重量)。
13. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中該安定步驟 b)中 pH 係調整到 4.6 至 5.2 間。
14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該熱處理(步驟 c))係於 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 之溫度，進行 10-11 小時。
15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該選擇性吸附步驟(步驟 d))係以強陽離子交換層析管柱來進行。
16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該強陽離子交換樹脂係包括至少一陽離子磺基團與一包括聚甲基丙烯酸酯或聚苯乙烯酯之不可溶、合成的灌流基質共價連結，其粒子大小係在 20 至 100 μm 間變化。
17. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該選擇性吸附步驟 d)係以注射流速為 5-30 個管柱體積/小時進行。
18. 如申請專利範圍第 1 中任一項之方法，其中將氯化鈉加到步驟 c)之經熱處理的溶液中達 0.2 至 0.5 M(莫耳/公升)的最終濃度。
19. 如申請專利範圍第 18 項之方法，其中添加氯化鈉後，步驟 c)中溶液的 pH 係調整到 4.2 至 5.5 之間。
20. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中選擇性吸附步驟 d)中每 kg 需純

化的 IgG(乾)係使用 1 至 10 公升的樹脂，其相當於承載 100 至 1000 mg 的 IgG/ml 樹脂。

21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中選擇性吸附步驟 d)中，係使用漸減的食鹽水梯度來進行溶離。
22. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該方法係進一步包括至少一種額外的病毒失活/消除處理步驟。
23. 如申請專利範圍第 22 項之方法，其中該額外的病毒失活/消除處理步驟係在熱處理步驟之前或之後進行。
24. 如申請專利範圍第 22 項之方法，其中該額外的病毒失活/消除處理步驟係藉由於酸 pH，在有或無胃蛋白酶之存在下培養，或藉由以非離子清潔劑、離子溶液處理或藉由奈米過濾來進行。
25. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該滲濾步驟 e)係以注射用水或以低離子強度緩衝溶液來進行。
26. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該滲濾步驟 e)係以切向流模式通過具有 10 kDa 至 100kDa 分子截留的膜來進行。
27. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該滲濾步驟 e)中蛋白係濃縮到 5% 至 22%(w/v)間的數值。