



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202400621 A

(43) 公開日：中華民國 113 (2024) 年 01 月 01 日

(21) 申請案號：112116169

(22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 05 月 01 日

(51) Int. Cl. :

C07K1/14 (2006.01)

C07K1/36 (2006.01)

A61K35/16 (2015.01)

A61P25/28 (2006.01)

(30) 優先權：2022/05/02 美國

63/337,439

2023/04/26 美國

63/498,470

(71) 申請人：日商武田藥品工業股份有限公司 (日本) TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (JP)

日本

(72) 發明人：馬特利 埃凡諾 MARTELLI, IVANO (IT)；米瑟伯格 奧利佛 MIESELBERGER, OLIVER (AT)；米切利 法蘭契絲卡 MICHELI, FRANCESCA (IT)；澤登柏 亞歷山大 ZAYDENBERG, ALEXANDER (US)；韓森 傑洛 HANSON, JARROD (US)

(74) 代理人：閻啓泰；林景郁

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：3 共 54 頁

(54) 名稱

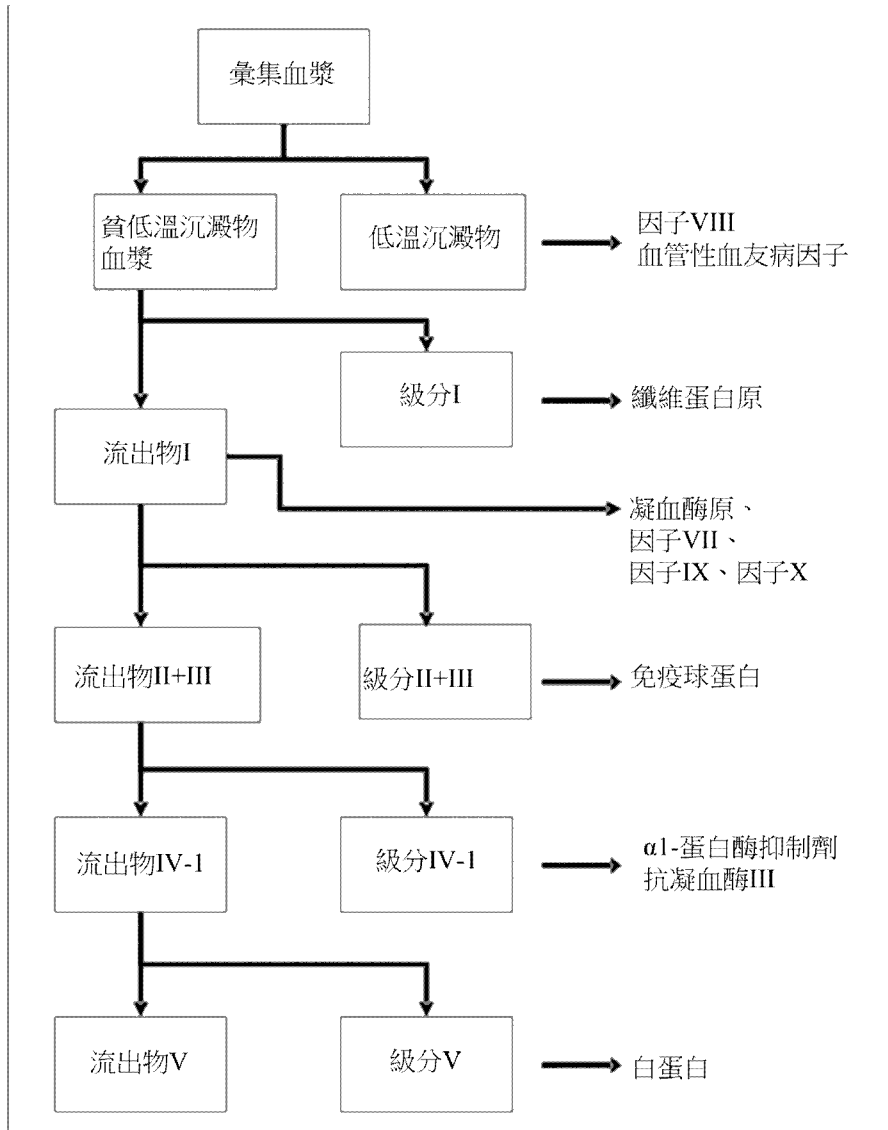
經由超濾自血漿製備科恩池濃縮物之方法

(57) 摘要

本發明提供在一些實施例中使用科恩分級程序對人類血漿進行分級之方法。改良包括使用生理活性濃縮血漿作為分級程序之起始材料。

The present invention provides a method of fractionating human plasma, in some embodiments, using the Cohn fractionation procedure. The improvement comprises the use of physiologically active concentrated plasma as the starting material for the fractionation procedure.

指定代表圖：



【圖1】



【發明摘要】

【中文發明名稱】 經由超濾自血漿製備科恩池濃縮物之方法

【英文發明名稱】 METHODS OF PREPARING COHN POOL
CONCENTRATE FROM BLOOD PLASMA THROUGH
ULTRAFILTRATION

【中文】

本發明提供在一些實施例中使用科恩分級程序對人類血漿進行分級之方法。改良包括使用生理活性濃縮血漿作為分級程序之起始材料。

【英文】

The present invention provides a method of fractionating human plasma, in some embodiments, using the Cohn fractionation procedure. The improvement comprises the use of physiologically active concentrated plasma as the starting material for the fractionation procedure.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 經由超濾自血漿製備科恩池濃縮物之方法

【英文發明名稱】 METHODS OF PREPARING COHN POOL
CONCENTRATE FROM BLOOD PLASMA THROUGH
ULTRAFILTRATION

【技術領域】

【0001】 本發明屬於自血漿分離治療活性血漿蛋白之血漿分級領域。

【先前技術】

【0002】 在過去的十年中，基於血漿蛋白之療法的臨床利用穩步增加。例如，隨著對原發性免疫缺陷疾病(PID)認識的提高，在受PID影響之患者群體中，靜脈注射免疫球蛋白(IVIG)之有效臨床使用有所增加。IVIG越來越多地用於標籤外適應症以及諸如慢性炎症性脫髓鞘性多發性神經病變(CIPD)之病狀。

【0003】 2019年，預計血漿產品市場以6.8%之CAGR增長，自2018年之\$20.5B達到2023年之\$28.5B。2016年，全球年分級產能為約7070萬公升。

【0004】 血漿分級過程為基礎設施/設施密集型且受到高度監管之過程。為了滿足對血漿衍生療法日益增長之需求，現有基礎設施必須能夠滿足此需求，或者必須改造或增加基礎設施，其中此等選項中之後兩者需要大量資本支出、生產線之潛在中斷以及經改造或新設施之潛在監管審查及認證。因此，在不對現有基礎設施進行大量改造的情況下提高現有基礎設施之效率的選項非常有吸引力。

【0005】 減少分級過程中所輸入之液體血漿之體積的方法可以達成最大化現有分級基礎設施之生產率以及減少血漿分級期間所需資源水準的雙重益

處。在本發明之前顯然未開發之方法為以下方法，在該方法中對減少體積之液體進行處理以產生與自較大體積之液體例如新鮮冷凍血漿(FFP)產生之血漿衍生蛋白產品相同量的血漿衍生蛋白產品。

【0006】 因此，直到本文所述本發明為止，各種級分(例如，冷乙醇級分)中之蛋白質可藉由對一定量的濃縮血漿科恩池進行分級來回收係不為人知的，該等量為有充分意義的，使得對濃縮生理活性血漿進行濃縮並且分級的代價為值得付出的。此外，尚不清楚在科恩分級(或其已知修改形式)中，濃縮血漿科恩池是否以與新鮮冷凍血漿類似的方式來運作。發明人發現源於濃縮血漿科恩池之分級途徑為真正可行的。濃縮科恩池為經濟上可行之分級過程的組成部分，該過程例如科恩分級或Kistler-Nitschman分級，或以濃縮血漿科恩池開始的其他方法(例如，Gerlough、Hink及Mulford方法)。參見例如Kistler等人, *Vox. Sang.* (1962); 7(4), 第414-424頁；Graham等人 *Subcellular Fractionation, a Practical Approach*. Oxford University Press. 1997。

【發明內容】

【0007】 鑒於諸如免疫球蛋白組成物、白蛋白、蛋白酶抑制劑、凝血因子、凝血因子抑制劑及補體系統之蛋白質的治療性血漿衍生血液蛋白組成物的應用越來越廣泛，確保充足、經濟、環保之有效且安全的血漿衍生血液蛋白組成物且可持續獲得該等組成物為至關重要的。

【0008】 現在發現藉由將濃縮血漿科恩池輸入標準血漿蛋白分級過程中來改進該過程產生過程效率，該等效率由於減少待分級之液體之體積而產生並且在一些實施例中，令人驚訝地，與引入該過程中之血漿輸入之濃度的增加基本上成比例。經改良之方法導致處理設備之利用增加以及產出量增加，其在一些實施例中與濃縮因數大致成比例並且因此可為顯著的。在各種實施例中，本發明提

供具有此等改良性質中之一或多者的改良血漿分級方法。亦提供使用改良程序來製備之血漿蛋白產品。

【0009】 藉由本發明，已經發現濃縮血漿科恩池為藉由對濃縮科恩池進行分級來製備蛋白治療劑的有效起始材料。在各種實施例中，通常存在於濃縮血漿科恩池下游之各種科恩級分中之蛋白質以一定產率及純度存在於此等級分中，該等產率及純度與在例如貧低溫血漿(cryo poor plasma)、一或多個吸收步驟之後之血漿、回收血漿、來自血漿除去術之血漿、冷凍血漿、解凍血漿及其類似血漿之(未濃縮)血漿原料來開始的過程中，存在於對應級分中之蛋白質之產率及純度類似。

【0010】 本發明之示例性方法包括：(a)使濃縮血漿科恩池經受一或多個血漿分級過程(例如，冷乙醇分級)。在示例性實施例中，本發明提供在(a)之前，(b)製備濃縮血漿科恩池。

【0011】 因此，在各種實施例中，本發明提供對血漿進行分級之改良過程。改良包括用濃縮血漿科恩池來啟始血漿分級過程。在各種實施例中，改良進一步包括在使濃縮輸入經受第一醇分級步驟之前，將血漿輸入濃縮。示例性血漿輸入為濃縮貧低溫血漿。

【0012】 在各種實施例中，血漿輸入體積之減少及伴隨的血漿蛋白濃度之增加導致一種血漿分級方法，該方法藉由體積之減少/血漿蛋白濃度之增加來表徵(達到意外程度)。

【0013】 在各種實施例中，本發明提供在確定時間量內繼續完成選定步驟的改良血漿分級過程。血漿分級過程之改良包括相對於在其他方面相同(除了相對於輸入在其他方面相同之過程中的血漿，輸入本發明方法中之第一醇分級步驟中之血漿為濃縮的以外)的血漿分級過程，在減少之時間內完成選定最終步驟。示例性血漿輸入為濃縮貧低溫血漿，因而在此實施例中，濃縮貧低溫血漿為濃縮

科恩池。

【0014】 例如，以相對於標準血漿分級輸入，濃縮約10%、約20%或約30%之科恩池來啟始之分級過程導致與以未濃縮輸入來開始之類似過程相比，使用少約10%、約20%或約30%的試劑。類似地，以相對於標準血漿分級輸入，濃縮約10%、約20%或約30%之科恩池來啟始之分級過程導致與以未濃縮輸入來開始之類似過程相比，自開始至結束耗費少約10%、約20%或約30%的時間。此結果出乎意料，因為在濃縮輸入與未濃縮輸入之間，濃縮輸入中之血漿蛋白之質量基本上沒有變化。

【0015】 在示例性實施例中，本發明提供自血漿製備蛋白級分的改良方法，其中級分富含選自以下之血漿蛋白產物：凝血因子(例如，因子V、VII、VIII、IX、X、XI、XII、及XIII)、凝血酶原複合物、血管性血友病因子、因子VIII/血管性血友病因子、纖維蛋白、纖維蛋白原、凝血酶、多價及高免疫(諸如抗RhO、抗B型肝炎、抗狂犬病、或抗破傷風)免疫球蛋白(IgG)、蛋白酶抑制劑(諸如 α 1抗胰蛋白酶及C1抑制劑)、抗凝血劑(諸如抗凝血酶)、C1酯酶抑制劑、蛋白C、及白蛋白、及其組合。改良包括濃縮血漿輸入，製備濃縮科恩池，然後將濃縮科恩池引入血漿分級方法之第一醇分級步驟。示例性血漿輸入為濃縮貧低溫血漿。

【0016】 本改良過程適用於任何血漿分級過程，例如，科恩、Gerlough、Hink、Mulford、Kistler Nitschmann、熱乙醇分級、Hao等。

【0017】 本發明亦提供血漿處理系統，較佳符合cGMP之系統，其尤其用於對來自例如濃縮貧低溫血漿之濃縮科恩池輸入的血漿進行分級。

【圖式簡單說明】

【0018】

【圖1】為示例性科恩分級程序之一般流程圖。

[圖2]為將起始血漿濃縮以便形成輸入分級過程中之濃縮科恩池的示例性流程圖。

[圖3]例示出本發明之示例性改良分級過程，其中過濾步驟用紅色點來鑑別並且定位。

【實施方式】

I. 介紹

【0019】 佔全血之總體積之約55%，血漿為血細胞及全血之其他成分懸浮於其中的全血組分。血漿進一步含有超過700種蛋白質及額外物質之混合物，該等物質執行身體健康所需的功能，尤其包括凝血、蛋白質儲存、及電解質平衡。當自全血中提取時，血漿可用於置換體液、抗體及凝血因子。因此，血漿廣泛用於醫學治療。

【0020】 如上文及以下部分闡述，藉由用濃縮血漿科恩池來開始分級，本發明向分級過程賦予許多效率及其他優勢。

【0021】 現在將詳細地參考如附圖例示出的本揭示案之示例性實施例之實行方案。在整個附圖及以下具體實施方式中將使用相同參考標記來指代相同或相似部分。普通熟習此項技術者將理解以下具體實施方式僅為說明性的並且不意欲以任何方式進行限制。本揭示案之其他實施例將容易為受益於本揭示案之熟習此項技術者思及。

【0022】 為了清楚起見，沒有示出及描述本文描述之實行方案之所有常規特徵。應理解，在任何此實際實行方案之開發中，為了達成血漿產品生產者之特定目標，諸如遵守應用相關之限制及業務相關之限制，做出許多實行方案特定決策，並且此等特定目標將在各個實行方案之間，以及在各個血漿產品生產者之間有所不同。此外，將理解，此開發工作可能為複雜且耗時的，但是對於受益於本

揭示案之普通熟習此項技術者而言，仍然為工程設計之例行任務。

【0023】 在不脫離示例性實施例之精神及範圍的情況下，可以對本揭示案中闡述之示例性實施例進行許多修改及變化，此對熟習此項技術者而言將為顯而易見的。本文所述之具體示例性實施例僅以舉例方式提供，並且本揭示案僅受所附申請專利範圍之條款以及此等申請專利範圍有權享有之等同物之全部範圍限制。

II. 縮寫及定義

【0024】 除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語一般具有與普通熟習本發明所屬的技術者通常所理解相同之含義。通常，本文使用之命名法及有機化學、醫藥調配物、及醫學成像中之實驗室程序為在此項技術中熟知並且通常使用之彼等。

b. 定義

【0025】 冠詞「一(a)」及「一(an)」在本文中用於指代一個或多於一個(亦即，指代至少一個)冠詞之語法對象。舉例而言，「蛋白質」意謂一種蛋白質或一種以上蛋白質。

【0026】 「科恩過程」、及「科恩分級」在本文中可互換使用並且如通常理解，係指經由產生富含某些血漿蛋白之級分的一系列步驟來分離人類血漿的方法，該等步驟包括不同濃度下之乙醇沉澱、pH之改變、溫度之改變、離子強度之改變。參見例如美國專利第2,390,074號。**圖1**提供科恩過程之示例性流程圖。如本文使用，術語「科恩過程」及「科恩分級」亦係指此開創性過程之許多變化及改良，例如，Kistler-Nitschmann過程(Kistler等人 (1952), *Vox Sang*, 7, 414-424)。用於本發明方法之其他過程包括美國專利第8,940,877號中闡述之分離IgG之方法。

【0027】 「血漿」為將血液離心(例如)以便移除諸如紅血球、白血球及血

小板之細胞材料之後保留的流體。血漿通常為黃色並且為透明至不透明。經捐獻並且處理以便將血漿與其他某些血液組分分離，並且未冷凍的血液被稱為「未冷凍」血漿。在8小時內冷凍至本文所述溫度的血漿在本文中稱為「新鮮冷凍血漿」(「FFP」)。其含有血液之溶解成分諸如蛋白質(6-8%；例如，血清白蛋白、球蛋白、纖維蛋白原等)、葡萄糖、凝血因子(凝血蛋白)、電解質(Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 HCO_3^- 、 Cl^- 等)、激素等。全血(WB)血漿為自全血中分離之血漿，其中除了抗凝血劑以外，未添加劑。如名稱指示，檸檬酸磷酸右旋糖(CPD)血漿含有作為抗凝血劑添加的檸檬酸、磷酸鈉及糖，通常為右旋糖。

【0028】 「回收血漿」係指在全血之失效日期之後不遲於5天分離並且儲存於1至6°C下的血漿。液體血漿中之血漿蛋白之概況未得到充分表徵。液體血漿中之凝血蛋白之水準及活化狀態視細胞、以及儲存條件及持續時間而定並且隨著與細胞接觸之時間而變化。此組分充當血漿蛋白之來源。凝血蛋白之水準及活化狀態可變化並且隨著時間的推移而變化。

【0029】 「解凍血漿」係指以下血漿，該血漿衍生自來源、FFP或FP24，使用無菌技術(封閉系統)來製備，在約10至約37°C下解凍，並且保持在約1至約6°C下直至最初24小時解凍後時段已經過去之後約4天。解凍血漿含有與FFP之濃度類似的濃度下之穩定凝血因子諸如因子II及纖維蛋白原，但是含有可變地減少量之其他因子。示例性解凍血漿為第一分級步驟之組分，其中將血漿(來源、回收、FF等)自塑膠容器中移除並且在夾套容器(具有高至37°C之溫度的交換流體)中解凍。

【0030】 「新鮮冷凍血漿」(「FFP」)係指自全血或單採收集來製備並且在如相關血液收集、處理、及儲存系統之用法說明中指定之時間範圍(time frame)內，在約-18°C或更冷溫度下冷凍(例如，在抽取八小時內冷凍)的血漿。平均而言，單位含有200至250 mL，但是單采產生之單位可含有多達400至600 mL。FFP

含有包括所有凝血因子的血漿蛋白。FFP含有較高水準之不穩定凝血因子V及VIII。

【0031】 如本文使用，「因子」繼之以羅馬數字係指經由酶催化反應之複雜級聯而相關的一系列血漿蛋白，該等反應涉及將較大蛋白質分子依序裂解以便產生肽，每一種肽將非活性酶原前體轉化為活性酶，從而導致形成纖維蛋白凝塊。它們包括：因子I(纖維蛋白原)、因子II(凝血酶原)、因子III(組織促凝血酶原激酶)、因子IV(鈣)、因子V(促凝血球蛋白原)、因子VI(不再被視為具有止血活性)、因子VII(轉化素原)、因子VIII(抗血友病因子)、因子IX(血漿促凝血酶原激酶組分；克雷斯馬斯因子(Christmas factor))、因子X(Stuart因子)、因子XI(血漿促凝血酶原激酶前身)、因子XII(Hageman因子)、及因子XIII(纖維蛋白穩定因子)。

【0032】 「血漿蛋白」包括例如凝血因子(諸如，因子V、VII、VIII、IX、X、XI、XII、及XIII)、凝血酶原複合物、血管性血友病因子、因子VIII/血管性血友病因子、纖維蛋白、纖維蛋白原、凝血酶、多價及高免疫(諸如抗RhO、抗B型肝炎、抗狂犬病、或抗破傷風)免疫球蛋白(IgG)、蛋白酶抑制劑(諸如 α 1抗胰蛋白酶及C1抑制劑)、抗凝血劑(諸如抗凝血酶)、C1酯酶抑制劑、蛋白C、及白蛋白、及其組合。

【0033】 如本文使用，術語濃縮血漿「科恩池」係指在本發明方法中，濃縮並且隨後經歷血漿分級過程的血漿池(例如，貧低溫、貧凝血因子、貧抑制劑血漿)。示例性濃縮血漿科恩池為生理上活性血漿，其自其原始體積(例如，自供體或供體池中收集、藉由分級機構接收等時之體積)濃縮約10%至約30%，並且包括未被破壞至基本上失去所有其生理活性之程度的蛋白質。

【0034】 在示例性實施例中，濃縮過程導致隨後藉由對濃縮科恩池進行分級來分離(或富集)之例如IgG、A1PI、因子等之選定血漿蛋白的活性基本上沒有

減少。在各種實施例中，自生理活性濃縮科恩池分級之選定血漿蛋白之活性為濃縮之前的血漿原料中之選定血漿蛋白之活性的至少約99%、至少約90%、至少約85%或至少約80%。在各種實施例中，選定血漿蛋白為多價或高免疫IgG。

【0035】 「疾病」為動物之健康狀態，其中動物不能保持體內平衡，並且其中若疾病不改善，則動物之健康繼續惡化。在各種實施例中，來自分級生理活性濃縮科恩池之一或多種蛋白質用於治療一或多種疾病。

III. 實施例

A. 組成物及裝置

【0036】 本揭示案之實施例針對方法將生理活性血漿原料濃縮以便形成濃縮科恩池並且隨後使用此項技術認可之分級過程，對所得生理活性濃縮科恩池進行分級。示例性分級過程包括醇分級步驟作為其第一步驟。亦提供藉由以濃縮科恩池開始之分級過程來製備的血漿蛋白製劑。

【0037】 在示例性實施例中，本發明提供生理活性濃縮血漿。當與產生濃縮血漿之起始血漿相比時，濃縮血漿之生物及生理活性基本上未降級。基本上未降級意謂對於任何選定血漿蛋白，其在濃縮血漿中之活性為其在起始血漿中之活性的至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、或至少約99%。在示例性實施例中，此適用於至少兩種選定血漿蛋白，至少五種選定蛋白質或至少十種選定蛋白質。在示例性實施例中，當與起始血漿相比時，濃縮血漿之總血漿蛋白活性基本上未降級。

【0038】 在示例性實施例中，與存在於起始血漿中之血漿蛋白聚集物相比，本發明之濃縮血漿基本上不包括更大分數之血漿蛋白聚集物。基本上沒有更大分數之血漿蛋白聚集物意謂在wt%基礎上至多約2%、至多約5%、至多約10%、至多約15%或至多約20%更多聚集物。wt%基礎根據濃縮血漿池及起始血漿中之總蛋白重量計算，亦即，濃縮血漿池中之血漿蛋白之至多約X%作為聚集物存在。

【0039】 在示例性實施例中，根據本發明方法來分離之血漿蛋白級分具有與使用此項技術認可之方法，以相同的方式自未濃縮之血漿(例如，冷凍血漿)來分離之相同級分基本上一致的特徵。在各種實施例中，血漿蛋白級分之特徵與使用此項技術認可之方法，以相同的方式自未濃縮之血漿分離之相同蛋白級分不同。在一個較佳實施例中，在兩種血漿蛋白級分之間不同的特徵對應於批准銷售治療性血漿蛋白所必需的一或多個監管相關參數，並且該特徵在此一或多個參數之範圍內，以被視為相對於該級分之相關監管要求無關緊要之量變化，亦即，併入濃縮血漿下游之血漿級分或自該血漿級分分離之蛋白質的醫藥調配物不需要新的監管考量或銷售批准。在各種實施例中，自濃縮血漿下游分離之血漿級分或蛋白質與自未濃縮血漿分離之對應血漿級分或蛋白質基本上相同。

【0040】 在示例性實施例中，濃縮血漿池為經改良之分級過程之起始輸入。在各種實施例中，濃縮血漿池藉由有助於及/或促進以下中之一或多者來改良該過程：**(i)**降低分級時間，**(ii)**降低分級材料支出，**(iii)**降低廢棄物，例如VOC之污染物之使用，及**(iv)**增加使用現有分級廠基礎設施之產出量。在示例性實施例中，此等結果在基本上不減少選定血漿蛋白級分之產率的情況下達成。在此情況下，基本上不減少產率意謂，當與以未濃縮血漿輸入來開始之相同分級過程相比時，血漿蛋白之總產率為以未濃縮輸入來開始之過程之血漿蛋白之總產率的至少約2%、至少約5%、至少約10%、至少約15%或至少約20%。

【0041】 在各種實施例中，生理活性濃縮血漿之處理藉由添加在血漿分級中使用的一或多種例如醇、酸、鹼的組分來進行。在示例性實施例中，保持生理活性濃縮血漿或使其穿過分級系統之組成部分，並且併入使用此系統之過程中。在示例性實施例中，分級系統為科恩分級系統，或此系統之已知修改形式。

【0042】 在示例性實施例中，本發明提供以生理活性濃縮血漿來開始之血漿分級過程的一或多種血漿蛋白級分、產物。在示例性實施例中，血漿蛋白級分

為科恩級分，如此術語在此項技術中為人所理解。

【0043】 在各種實施例中，本發明提供在生理活性濃縮血漿輸入之下游之一種、兩種、三種、四種、五種或更多種獨特血漿級分組成物。在各種實施例中，組成物為級分I漿料並且包含纖維蛋白原、或級分I上清液。在各種實施例中，組成物為級分II+III (或級分I+II+III)漿料並且包含IgG、或級分II+III (或級分I+II+III)上清液。在一些實施例中，組成物為級分IV-1漿料並且包含A1PI及/或AT-III、或級分IV-1上清液。在示例性實施例中，血漿級分組成物為級分IV-4漿料及/或級分IV-4上清液。在各種實施例中，血漿級分組成物為級分V漿料並且包含白蛋白、或級分V上清液。在示例性實施例中，一或多個級分為一或多個科恩級分。

【0044】 在示例性實施例中，本發明提供藉由本發明方法來製備之蛋白酶抑制劑之製劑。在各種實施例中，蛋白酶抑制劑選自 α 1抗胰蛋白酶、C1抑制劑等)及其組合。

【0045】 在示例性實施例中，本發明提供藉由本發明方法來製備之白蛋白之製劑。

【0046】 在示例性實施例中，該方法提供含有至少約5體積%或至少約25體積%之白蛋白的白蛋白水溶液並且適合於人類受試者之靜脈內注射，該溶液在暴露於約45°C之溫度一個月時期之後，保持穩定而沒有白蛋白之沉澱。在示例性實施例中，此溶液藉由對本發明之生理活性濃縮人類血漿進行分級來分離。

【0047】 在示例性實施例中，本發明提供自生理活性濃縮人類血漿分離之IgG製劑。該製劑包含其中自未濃縮血漿(例如，新鮮冷凍血漿)分離IgG之相同製劑中存在之量的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%之量的IgG。在各種實施例中，IgG之活性為自未濃縮血漿(例如，新鮮冷凍血漿)分離之IgG之活性的至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%。IgG可為多價或高免疫IgG。

【0048】 在示例性實施例中，本發明提供自分級生理活性濃縮人類血漿之級分IV-1分離之血漿蛋白，其選自A1PI、AT-III及其組合。在示例性實施例中，血漿蛋白以自未濃縮血漿(例如，新鮮冷凍血漿)分離此蛋白質之產率的至少約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、或約95%之產率來分離。在各種實施例中，自生理活性濃縮人類血漿分離的級分IV-1中之蛋白質具有自未濃縮血漿(例如，新鮮冷凍血漿)分離之蛋白質之活性的至少約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、或約95%之活性。

【0049】 在一些實施例中，本發明提供一種方法，其中自生理活性濃縮人類血漿之級分V分離之白蛋白以自例如新鮮冷凍血漿之未濃縮血漿輸入來分離此蛋白質之產率的至少約80%之產率來分離。在各種實施例中，自生理活性濃縮人類血漿分離之白蛋白具有自未濃縮血漿(例如，新鮮冷凍血漿)分離之白蛋白之活性的至少約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、或約95%之活性。

【0050】 在各種實施例中，本發明提供醫藥調配物，其包含藉由本發明方法產生之血漿蛋白級分中之一者，或自此級分進一步純化之一或多個此種級分的蛋白質組分。各種醫藥調配物亦包括醫藥學上可接受之媒劑，血漿級分或處於/來自該級分之蛋白質(或當進一步純化時，處於下游)在該媒劑中調配。

【0051】 在各種實施例中，本發明提供包裝於裝置中之本發明之醫藥調配物，該裝置用於將醫藥調配物投與至需要此投與之受試者，例如，注射器、輸注袋及其類似裝置。在各種實施例中，裝置含有投與至需要此投與之受試者的活性蛋白質之單位劑量調配物。在示例性實施例中，單位劑量為用於受試者的此項技術認可之單位劑量。

B. 方法

【0052】 在各種實施例中，本發明提供以本發明之生理活性濃縮血漿作為

輸入來開始的新穎血漿分級方法。本發明之示例性方法包括提供在示例性實施例中藉由超濾來製備之生理活性濃縮血漿溶液；及使生理活性濃縮血漿經受一或多個分級過程。為科恩分級(圖1)、及其變化形式。

【0053】 在示例性實施例中，用於本發明之方法之起始血漿在彙集(貧低溫、貧凝血因子、貧抑制劑血漿池)之後濃縮。科恩池之濃縮可藉由包括但不限於切向流動過濾、超濾及其組合之許多技術來達成。例如，濃縮起始血漿之方法包括：(a)預過濾，繼之以使用UF盒之分批TFF或(b)預過濾，繼之以使用UF盒之單程TFF或(c)具有或不具有預過濾之UF中空纖維系統。

【0054】 圖3例示出本發明之示例性改良分級過程，其中過濾步驟用紅色點來鑑別並且定位。

【0055】 在一個實施例中，生理活性濃縮科恩池經由超濾來濃縮。超濾可以任何可用型式(亦即，添加順序、溫度、稀釋度等)來執行。

【0056】 蛋白質可能藉由許多機制(例如，修剪、氧化、展開、聚集、不溶性顆粒形成)來經歷物理降級。許多蛋白質在溶液中為結構上不穩定的並且由於在純化、處理及儲存期間遇到的各種應力，易受構形變化的影響。此等應力包括溫度變動、暴露於pH變化及極端pH、剪切應力、表面吸附/界面應力等。

【0057】 如熟習此項技術者將理解，任何此等科恩池濃縮模式可單獨或以任何組合或順序來執行。

在各種實施例中，生理活性濃縮科恩池由至少約65 g/L血漿蛋白組成。

【0058】 在各種實施例中，在低溫沉澱之後，將血漿分離至低溫沉澱物及低溫上清液中。低溫上清液或吸附之後之低溫上清液視情況經歷進一步之分級步驟。分離可以諸如不限於離心、過濾或其組合的任何可用方式來完成。

【0059】 在需要將生理活性濃縮血漿冷卻之彼等實施例中，可利用任何可用冷卻手段。在各種實施例中，含有濃縮血漿之容器或管線加護套有冷卻裝置。

在示例性實施例中，將冷卻及/或血漿溶液保持在例如夾套容器之容器中，並且在一些實施例中，血漿溶液在內聯流動期間冷卻(「輻射體方法」)。

【0060】 在一些實施例中，生理濃縮血漿含有約3.5至約5.5 g/dL之量的白蛋白。在各種實施例中，生理活性濃縮血漿之白蛋白濃度為生理活性濃縮血漿之總血漿蛋白含量之約40%至約70%，例如，約50%至約60%。

【0061】 在各種實施例中，在每單位基礎上，生理活性濃縮血漿中之白蛋白保持血漿中之白蛋白之活性之至少約80%、85%、90%、或至少約95%。

【0062】 在一些實施例中，生理濃縮血漿含有約50-300 mg/dL，例如，約100至約200 mg/dL之量的A1PI。

【0063】 在各種實施例中，在每單位基礎上，生理活性濃縮血漿中之A1PI保持血漿中之A1PI之活性之至少約80%、85%、90%、或至少約95%。

【0064】 在各種實施例中，生理濃縮血漿含有約500至約1600 mg/dL，例如，約700至約1500 mg/dL之量的IgG。

【0065】 在各種實施例中，在每單位基礎上，生理活性濃縮血漿中之IgG保持血漿中之IgG之活性的至少約80%、85%、90%、或至少約95%。

【0066】 在一些實施例中，生理活性濃縮血漿具有約30微米或更小之平均粒徑。在一些實施例中，生理活性濃縮血漿具有約100微米或更小之最大粒徑。

【0067】 在一些實施例中，生理活性濃縮血漿包括至少30重量%之血漿蛋白。

【0068】 在一些實施例中，生理活性濃縮血漿為無菌的。

【0069】 在示例性實施例中，本發明提供使用科恩分級程序，例如，美國專利第2,390,074號闡述之程序，將生理活性濃縮人類血漿分級之方法，其中本發明之改良包括使用生理活性濃縮人類血漿作為分級程序之起始材料。**圖1**提供科恩分級方法之示例性過程示意圖。

【0070】 因此，例如，使生理活性濃縮血漿經歷對蛋白進行分級之方法。示例性方法涉及使選定蛋白級分自含有複數個蛋白級分之溶液中沉澱。對溶液進行調整以便具有高於需要沉澱之級分中之一或多種蛋白質的等電點的pH。在示例性實施例中，降低分級溶液之pH以便使同一溶液達到待沉澱之所需級分之大致等電點。示例性方法包括使溶液之離子強度達到0.1與0.2之間。各種方法包括使溶液之溫度降低至大約0°C與溶液之冰點之間。在一些實施例中將血漿蛋白級分之有機沉澱劑添加至蛋白質溶液，所添加之沉澱劑之量諸如導致在該溫度下所需級分自蛋白質溶液中沉澱，並且使沉澱物自溶液中分離。在一個較佳實施例中，對條件進行調整以使得基本上僅所需血漿蛋白級分自溶液中沉澱。

【0071】 在各種實施例中，提供藉由自含有複數個蛋白級分之生理活性濃縮人類血漿之溶液中沉澱，對蛋白質進行分級之方法，該方法包括使溶液之pH達到待沉澱之所需蛋白級分之大致等電點，使溶液之離子強度達到0.01與0.2之間，將溶液之溫度降低至大致0°C與溶液之冰點之間，將用於蛋白質之有機沉澱劑添加至蛋白質溶液，所添加之沉澱劑之量、pH、離子強度及溫度諸如導致僅所需級分自蛋白質溶液中沉澱，並且使沉澱物自溶液中分離。

【0072】 在各種實施例中，在對來自生理活性濃縮人類血漿之溶液的蛋白質進行分級的方法中，步驟包括將用於蛋白質之有機沉澱劑與蛋白質溶液混合，將溫度調整至0與-15°C之間，將沉澱劑之量調整為約8%至約40%，將pH調整為約4.4至約7並且將離子強度調整為約0.05至約0.2，並且自所得液體系統中分離不溶於其中的沉澱的蛋白質。

【0073】 在一些實施例中，在對來自生理活性濃縮人類血漿之溶液的蛋白質進行分級的方法中，步驟包括將用於蛋白質之有機沉澱劑與蛋白質溶液混合，調整並且保持溫度高於其冰點但是不高於0°C，調整並且保持沉澱劑之量為約10%至約40%，調整並且保持pH為約4.4至約7並且調整並且保持離子強度為約

0.05至約0.2，並且自所得液體系統中分離不溶於其中的沉澱的蛋白質。

【0074】 在一些實施例中，提供對來自生理活性濃縮人類血漿之蛋白質進行分級的方法，步驟包括將電解質及用於蛋白質之有機沉澱劑兩者添加至含有蛋白質混合物之溶液，電解質以足以使離子強度達到約0.01至0.2之量添加，並且沉澱劑以諸如導致僅所需蛋白級分沉澱之量添加，調整並且保持溶液之pH為約4.4至約7並且調整並且保持其溫度為約0至約-15°C，由此使蛋白質自所得系統中沉澱。

【0075】 在示例性實施例中，本發明提供純化來自濃縮人類血漿之溶液的白蛋白並且使其結晶的方法，該方法包括在約5.5至約6.0之pH、約0.05至約0.5之離子強度下並且在約0°C至約-5°C之溫度下，使不純白蛋白溶解於含有約15至約40%醇之醇溶液中並且將溶液保持在該溫度範圍內直到白蛋白自混合物中結晶為止。

【0076】 在示例性實施例中，在受控溫度及氫離子濃度下，對來自濃縮人類血漿之溶液的具有不同溶解度之物質(例如，蛋白質)進行分級的方法中，移除由此形成之沉澱物並且藉由改變一個或多個因素，使該等物質之複數個連續級分沉澱。

【0077】 在各種實施例中，本發明提供藉由改變通常會導致變性之試劑來預防蛋白質變性之方法，該方法包括藉由經由半透膜來擴散，將試劑添加至濃縮人類血漿之蛋白質溶液。

【0078】 在一個實施例中，提供對來自生理活性濃縮人類血漿之溶液的蛋白質進行分級之方法，該方法包括使生理活性濃縮人類血漿與有機沉澱劑接觸。示例性實施例包括控制接觸沉澱劑之量、溫度、氫離子濃度及所得混合物之離子強度中之一或多者，將所得沉澱物自上清液中分離，並且藉由改變影響其溶解度之複數個該等因素來分離連續蛋白級分。

【0079】 在示例性實施例中，有機沉澱劑在約0°C或小於約0°C之溫度下添加。

【0080】 在示例性實施例中，有機沉澱劑為醇。在各種實施例中，其在約0°C或小於約0°C之溫度下添加。

【0081】 在示例性實施例中，提供對來自生理活性濃縮人類血漿之溶液的蛋白質進行分級之方法，該方法包括藉由生理活性濃縮人類血漿與有機沉澱劑(例如，醇)並且藉由改變生理活性濃縮人類血漿及有機沉澱劑之混合物之溫度，使溫度逐步降低並且使混合物之有機沉澱劑濃度增加，使連續蛋白級分沉澱，來使一個或複數個不同蛋白級分自血漿中沉澱。溫度與醇之百分比為相關聯的，使得在其中存在一定百分比之醇及血漿的情況下，用於使任何給定蛋白級分沉澱之溫度接近於但是高於混合物之冰點。

【0082】 示例性有機沉澱劑包括乙醇、丙酮、二噁烷及其組合。

【0083】 在示例性實施例中，自生理活性濃縮人類血漿中分離之IgG以自新鮮冷凍血漿中分離此蛋白質之產率的至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或至少約95%之產率來分離。在各種實施例中，IgG之活性為自新鮮冷凍血漿分離之IgG之活性的至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或至少約95%。

【0084】 在示例性實施例中，自分級生理活性濃縮人類血漿之級分IV-1分離之選自A1PI、AT-III及其組合之蛋白質以自新鮮冷凍血漿分離此蛋白質之產率的至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或至少約95%之產率來分離。在各種實施例中，自生理活性濃縮人類血漿分離的級分IV-1中之蛋白質具有自新鮮冷凍血漿分離之蛋白質之活性的至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或至少約95%之活性。

【0085】 在一些實施例中，本發明提供一種方法，其中自生理活性濃縮人

類血漿之級分V分離之白蛋白以自新鮮冷凍血漿分離此蛋白質之產率的至少約80%之產率來分離。在各種實施例中，自生理活性濃縮人類血漿分離之白蛋白具有自新鮮冷凍血漿分離之白蛋白之活性的至少約60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或至少約95%之活性。

【0086】 本文提供之方法允許製備具有非常高純度水準的A1PI組成物。例如，在一個實施例中，本文提供之A1PI組成物中之總蛋白之至少約95%為A1PI。在其他實施例中，此組成物中之蛋白質之至少約96%為A1PI，或組成物之總蛋白之至少約97%、98%、99%、99.5%、或更多為A1PI。

【0087】 類似地，本文提供之方法允許製備含有極低污染劑水準的A1PI組成物。例如，在某些實施例中，提供含有少於約10 mg/L污染物之A1PI組成物。在其他實施例中，A1PI組成物將含有少於約5 mg/L污染物，較佳少於約3 mg/L污染物，最佳少於約2 mg/L污染物。

【0088】 在各種實施例中，在每單位基礎上，生理活性濃縮血漿中之A1PI保持血漿中之A1PI之活性之至少約80%、85%、90%、或至少約95%。

【0089】 在一個實施例中，本發明提供包含約150 g/L至約250 g/L之蛋白質濃度的水性IgG組成物。在某些實施例中，IgG組成物之蛋白質濃度為約175 g/L至約225 g/L，或約200 g/L在約225 g/L，或此等範圍內之任何合適濃度，例如處於或約150 g/L、155 g/L、160 g/L、165 g/L、170 g/L、175 g/L、180 g/L、185 g/L、190 g/L、195 g/L、200 g/L、205 g/L、210 g/L、215 g/L、220 g/L、225 g/L、230 g/L、235 g/L、240 g/L、245 g/L、250 g/L、或更高。在一個較佳實施例中，水性IgG組成物包含處於或約200 g/L之蛋白質濃度。在一個尤其較佳實施例中，水性IgG組成物包含處於或約204 g/L之蛋白質濃度。

【0090】 本文提供之方法允許製備具有非常高純度水準的IgG組成物。例如，在一個實施例中，本文提供之IgG組成物中之總蛋白之至少約95%將為IgG。

在其他實施例中，蛋白質之至少約96%為IgG，或組成物之總蛋白之至少約97%、98%、99%、99.5%、或更多將為IgG。

【0091】 類似地，本文提供之方法允許製備含有極低污染劑水準的IgG組成物。例如，在某些實施例中，提供含有少於約100 mg/L IgA之IgG組成物。在其他實施例中，IgG組成物將含有少於約50 mg/L IgA，較佳少於約35 mg/L IgA，最佳少於約20 mg/L IgA。在示例性實施例中，IgG製劑含有少於或等於約0.14 mg/mL IgA。

【0092】 在一些實施例中，本發明提供藉由本發明方法來製備的多價及/或高免疫之免疫球蛋白(IgG)製劑。在各種實施例中，IgG選自抗RhO高免疫之免疫球蛋白、抗B型肝炎高免疫之免疫球蛋白、抗狂犬病高免疫之免疫球蛋白、抗破傷風IgG高免疫之免疫球蛋白及其任何兩者或更多者之組合。

【0093】 在各種實施例中，在每單位基礎上，生理活性濃縮血漿中之IgG保持血漿中之IgG之活性的至少約80%、85%、90%、或至少約95%。

科恩池濃縮過程

【0094】 科恩池之濃縮可藉由包括以下各者之許多技術來達成：(a)預過濾，繼之以使用UF盒之分批TFF或(b)預過濾，繼之以使用UF盒之單程TFF或(c)具有或不具有預過濾之UF中空纖維系統。

【0095】 用於超濾之設備及方法為此項技術中已知的。**圖2**提供用於濃縮起始科恩池之示例性方法/裝置的過程流程圖。

【0096】 具有約300 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)的超濾膜或超濾中空纖維濾膜可用於科恩池之濃縮，其中以再循環或單程組態進行，並且具有或不具有先前預過濾。在另一實施例中，具有約200 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)的超濾膜或超濾中空纖維濾膜可用於科恩池之濃縮，其中以再循環或單程組態進行，並且具有或不具有先前預過濾。在一些實施例中，具有

約100 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)的超濾膜或超濾中空纖維濾膜可用於科恩池之濃縮，其中以再循環或單程組態進行，並且具有或不具有先前預過濾。

【0097】 提供以下實例以便例示出本發明之示例性實施例並且不限定或限制其範圍。

實例

實例1

【0098】 執行4次研究運作直到分別沉澱物G (PptG)及級分V (Fr V)為止。在來自科恩池血漿之不同分級之各種血漿衍生蛋白沒有顯著損失的情況下，獲得所需科恩池血漿體積及蛋白質濃度。

【0099】 對於每一對研究運作，亦即，運作1及對照1、運作2及對照2等，相同科恩池批料用作起始材料。在科恩分級過程之前，在4次測試運作(運作1、運作2、運作3、運作4)中使用超濾膜來濃縮大約5-12公升貧低溫血漿，同時在4次相應對照運作中不執行超濾。對於血漿濃縮步驟，使用具有100 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)之各種預過濾器及各種TFF過濾器。因此，測試運作中之科恩池血漿之起始蛋白濃度比對照運作高10%-27%。研究運作組態展示於**Error! Reference source not found.**中。

表：研究運作組態綜述

描述	運作 1	運作 2	運作 3	運作 4
濃縮因數	27%	25%	17%	10%
預過濾器	1.0 µm PP/ 0.45 µm 耐綸	1.0 µm PP/ 0.45 µm 耐綸	0.65 µm GF	1.0 µm PP/ 0.45 µm 耐綸
TFF 組態	再循環	單程	再循環	再循環
TFF MWCO	100 kDa	30 kDa	30 kDa	100 kDa
TFF 類型	PES	PES	乙酸纖維素	PES

【0100】 對於所關注之各種蛋白質，分別在濃縮測試及未濃縮對照運作中執行比較測試。在測試運作中，上游IgG過程直到沉澱物G (PptG)為止的所有蛋

白含量總體上與對照運作類似，如Error! Reference source not found.-Error!
Reference source not found.展示。

表：蛋白質步驟產率 - 科恩池

		對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
Eq. CPP	L	6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲之 TP	g/ dL Eq CPP	5.5	5.5	5.2	5.1	5.76	5.71	5.72	5.54
IgG		5.62	5.61	5.0	5.0	6.10	6.10	5.5	5.3
白蛋白		32.2	32.3	31.1	29.6	32.3	33.2	33.5	33.0
AAT		1.29	1.23	1.23	1.17	1.30	1.29	1.26	1.24
AMG	g/ L Eq CPP	1.09	1.03	1.05	1.03	1.07	1.11	1.07	1.06
HPT		1.03	0.98	1.00	0.98	1.06	1.09	1.08	1.06
AAG		0.72	0.69	0.70	0.68	0.72	0.72	0.73	0.70
CER		0.21	0.20	0.21	0.20	0.22	0.21	0.20	0.21
纖維蛋白原		2.29	2.11	1.96	1.98	2.94	3.01	2.12	2.33
纖維蛋白原	μg/mL , 5% TP	1976	1892	1802	1949	2554	2635	1853	1895

表：蛋白質步驟產率 - 級分I離心液

		對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
Eq. CPP	L	6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲之 TP	g/ dL Eq CPP	5.80	5.58	5.44	5.07	5.50	5.48	5.45	5.23
IgG		5.58	5.33	5.1	4.9	5.81	5.86	5.52	5.38
白蛋白		32.0	30.9	30.6	29.6	32.3	32.2	32.6	32.8
IgA		1.50	1.42	1.46	1.41	1.55	1.56	1.59	1.54
IgM		0.52	0.45	0.44	0.43	0.55	0.53	0.59	0.51
C3		1.06	0.98	1.03	0.96	1.17	1.12	1.11	1.09
TRF	g/ L Eq CPP	2.11	2.01	2.08	2.01	1.98	2.00	2.16	2.10
AAT		1.24	1.19	1.20	1.19	1.28	1.21	1.23	1.21
AMG		1.06	1.01	1.03	1.03	1.05	1.07	1.09	1.02
HPT		1.00	0.97	0.97	0.95	1.04	1.04	1.06	1.02
AAG		0.70	0.68	0.69	0.68	0.69	0.69	0.72	0.71
CER		0.20	0.18	0.20	0.19	0.21	0.21	0.20	0.21
纖維蛋白原	μg/mL , 5% TP	314	300	359	316	377	369	355	312

表：蛋白質步驟產率 – 級分II+III濾液

Eq. CPP	L	對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
		6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲之 TP	g/ dL Eq CPP	3.60	3.23	3.51	3.25	3.49	3.41	3.43	3.70
IgG		0.12	0.08	0.09	0.08	0.100	0.104	0.13	0.09
白蛋白		28.4	26.0	28.0	25.4	27.6	27.3	29.9	29.4
IgA		0.119	0.070	0.030	0.057	0.037	0.067	0.238	0.085
IgM		0.010	0.007	0.010	0.007	0.010	0.008	0.010	0.009
C3		0.011	0.007	0.011	0.007	0.010	0.009	0.010	0.009
TRF	g/ L Eq CPP	1.75	1.57	1.77	1.63	1.67	1.69	1.75	1.73
AAT		0.59	0.52	0.57	0.58	0.55	0.52	0.74	0.60
AMG		0.15	0.13	0.14	0.16	0.18	0.15	0.15	0.12
HPT		0.87	0.78	0.82	0.79	0.91	0.93	0.89	0.90
AAG		0.61	0.54	0.58	0.56	0.61	0.60	0.61	0.61
CER		0.13	0.10	0.12	0.10	0.12	0.11	0.12	0.11

表：蛋白質步驟產率 – 級分II+III漿料提取物CUNO濾液

Eq. CPP	L	對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
		6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲之 TP	g/ dL Eq CPP	0.57	0.52	0.53	0.54	0.60	0.65	0.60	0.62
IgG		4.51	4.02	4.04	4.03	4.67	4.82	4.52	4.54
白蛋白		0.42	0.60	0.29	0.44	0.49	0.66	0.45	0.60
IgA		0.775	0.708	0.731	0.775	0.831	0.910	0.742	0.815
IgM	g/ L Eq CPP	0.223	0.189	0.148	0.112	0.150	0.254	0.145	0.175
C3		0.120	0.104	0.088	0.077	0.089	0.112	0.104	0.129
AAT		0.05	0.07	0.02	0.04	0.04	0.11	0.02	0.05
AMG		0.71	0.64	0.61	0.58	0.60	0.68	0.65	0.66
纖維蛋白原	ug/mL , 5% TP	26	41	67.5	61.6	71.5	71.6	47.4	69.8

表：沉澱物G蛋白組成物

		對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
Eq. CPP	L	6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲之 TP	g/dL	5.97	6.13	6.12	6.17	6.81	6.34	5.9	6.0
IgG	ug/mL , 5% TP	4420	4200	3983	3993	4017	3893	4153	3795
白蛋白		13.5	13.1	10.4	11.5	14.5	14.7	11.7	15.7
IgA		663	642	628	667	607	638	594	617
IgM		134	136	127	122	115	112	128	144
C3		74	75	85	73	75.6	69.8	83	97
AAT		6.08	5.98	5.13	6.79	8.40	9.93	4.62	10.64
AMG		398	390	345	345	282	321	311	336
纖維蛋白原	ug/mL , 5% TP	29.2	28.3	61.8	60.3	77.0	76.2	47.2	75.4
FXI	E/ml , 5% TP	0.017	0.024	0.025	0.024	0.022	0.024	0.02	0.1
FXII	mU/ml , 5% TP	4.0	4.3	11.2	12.7	6.9	11.7	4.9	5.9
PL-1	nmol/mL min , 5% TP	13.1	8.2	15.1	19.2	18.2	14.8	12.6	15.2
PKA	IE/mL , 5% TP	11.1	7.2	37	49	21	8.5	15.0	26.5
KKA	nmol/mL min , 5% TP	119.0	75.9	118	133	106	80	96.3	122.3

【0101】 通常存在於科恩池濃縮下游之級分IV及V中之蛋白質以一定產率及純度存在於此等級分中，該等產率及純度與在在未濃縮科恩池來開始的過程中，存在於級分IV及V中之產率及純度類似。自科恩池濃縮物產生之彼等血漿衍生產物中間物之示例性分離及純化過程的條件在Error! Reference source not found.-Error! Reference source not found.中闡述。

【0102】 使級分II+III之上清液進一步經歷分級程序。使級分II+III之上清液與25%乙醇接觸以便獲得級分IV-1沉澱物。

表：蛋白質步驟產率 – 級分IV-1濾液

		對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
Eq. CPP	L	6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲 之 TP	g/ dL Eq CPP	2.80	2.39	2.94	2.73	2.70	2.62	2.70	2.70
白蛋白		27.1	23.6	26.1	23.9	25.2	24.6	27.3	25.8
TRF		0.88	0.77	1.08	1.05	0.64	0.64	0.96	0.78
AAT		0.039	0.029	0.015	0.017	0.016	0.019	0.060	0.036
HPT		0.59	0.50	0.58	0.57	0.56	0.53	0.66	0.59
AAG		0.59	0.50	0.58	0.52	0.54	0.53	0.60	0.56
PKA		7.9	20.1	222	330	57	8	59.0	29.9
KKA		27.8	15.3	441	604	201	79	185.1	135.6

表：蛋白質步驟產率 – 級分IV-4濾液

		對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
Eq. CPP	L	6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲 之 TP	g/ dL Eq CPP	2.09	1.60	2.08	1.70	2.09	1.97	2.09	2.03
白蛋白		22.3	17.9	21.1	17.1	20.6	19.7	22.0	20.7
TRF		0.03	0.02	0.03	0.016				
AAT		0.01	0.01	0.01	0.008				
HPT		0.05	0.02	0.23	0.30	0.08	0.06	0.10	0.10
AAG		0.56	0.45	0.50	0.40	0.50	0.49	0.53	0.50
CER		0.007	0.005	0.006	0.004				

表：級分V蛋白組成物

		對照 1	測試 1	對照 2	測試 2	對照 3	測試 3	對照 4	測試 4
Eq. CPP	L	6.0	6.0	6.0	6.31	6.0	6.2	6.0	6.0
按照縮二脲 之 TP	g/dL	6.04	6.19	6.05	6.19	5.97	6.01	5.7	6.1
白蛋白	ug/mL , 5% TP	5548	5601	4509	4434	5212	5263	5306	5319
HPT		27.5	23.4	32.5	29.4	35.0	28.4	5306	5319
TRF		1.5	1.4					35	33
AAT		0.7	0.7	0.74	0.73				
AAG		10.2	11.7	10.1	11.6	8.8	11.5	10.2	11.2
CER		0.38	0.37						
PKA	IE/mL , 5% TP	3.3	4.0	8.3	18.5	23	7.9	14.3	16.8
KKA	nmol/mL min , 5% TP	8.3	8.9	68	107	49	21	24.4	23.9

實例2

第 24 頁，共 47 頁(發明說明書)

【0103】 科恩池濃縮(CPC)旨在增加產能並且減少操作成本，並且最大限度地減少對商業供應之干擾。本發明之過程使得經由超濾來濃縮科恩池血漿為可行的。超濾允許蛋白組分之選擇性分離、濃縮、及純化。在本發明中執行中試規模運作並且在來自科恩池血漿之不同分級的各種血漿衍生蛋白沒有顯著損失的情況下，獲得所需科恩池血漿體積及蛋白質濃度。

【0104】 在科恩分級過程之前，在測試運作(運作1、運作2、運作3)中使用超濾膜來濃縮約100公升貧低溫血漿，同時在對照運作中不執行超濾。對於血漿濃縮步驟，使用具有100 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)的中空纖維過濾器。因此，測試運作中之科恩池血漿之起始蛋白濃度比對照運作高約15%。對於所關注之每一種蛋白質，將分離及純化之蛋白質之技術規格例如回收率、品質製表並且進行分析。

1. 免疫球蛋白回收率及品質不受科恩池濃縮影響

【0105】 在濃縮步驟之後，計算所有運作中之免疫球蛋白含量。針對乙醇處理來製備之科恩池血漿中之所得IgG含量在沒有顯著損失的情況下濃縮。測試運作中之上游IgG效率與對照運作類似，如表1展示。

【0106】 來自沉澱物G (PptG)之純化IgG之回收率亦在測試運作與對照之間進行比較。將由科恩分級過程所產生之級分II+III沉澱物懸浮於懸浮緩衝液中，由此形成IgG懸浮液。將IgG懸浮液過濾，並且將濾液用清潔劑處理。將清潔劑處理之濾液之pH調整至約7.0並且添加乙醇至約20%至約30%之最終濃度之後，形成沉澱物G。表2展示出IgG純化效率不受CPC之過程影響。在中試規模研究中，觀察到測試運作與未濃縮對照運作之間的來自PptG之類似IgG產率。對於所有運作，在藥物產品層次上評估IgG品質。所有結果均滿足所有限制，如表3展示。

表1. 上游處理中之免疫球蛋白餘量

參數 / 步驟	單位	運作 1	運作 1 對照 ¹	德爾塔% (運作 1 相比於運作 1 對照)	運作 2	運作 3
起始材料	N/A		低溫分離之後的科恩血漿		吸附之後的科恩血漿： FEIBA ² ， AT III ³	吸附之後的科恩血漿：因子 IX，因子 VII
科恩血漿(起始體積)	[L]	100.5	100.5		112.7	120.3
用於 EtOH 分級之科恩血漿	[L]	86.4	100		95.7	102.0
總蛋白(濃縮之前的池)	[g/L]	58.9 (濃縮之後)	50.5		53.7 (濃縮之後，63.9)	53.7 (濃縮之後，64.8)
IgG (濃縮之前的池)	[g/L]	5.71 (濃縮之後)	4.92		5.07 (濃縮之後，6.14)	5.22 (濃縮之後，6.10)
總 IgG	[g]	493	494		588	622
提取物濾液	[L]	98.6	120.2		107.8	114.2
IgG	[g/L]	4.67	3.71		4.96	4.85
總 IgG	[g]	460.3	445.9	+3.2%	534.6	553.8
IgG g/L 濃縮之前的血漿	[g/L]	4.55	4.40	+3.2%	4.74	4.53
上游 IgG 效率	[%]	93.1	90.2	+3.2%	93.5	88.2

¹相同起始材料用於「運作 1 對照」及「運作 1」，亦即，將低溫分離之後的科恩血漿劃分並且並行地不使用科恩池濃縮(「運作 1 對照」)以及使用科恩池濃縮(「運作 1」)來進行處理。

²因子八抑制劑旁路活性

³抗凝血酶 III

表2. 純化之後的測試運作及對照運作中之免疫球蛋白餘量

	單位	運作 1 Ppt G	運作 1 對照 Ppt G	德爾塔% (運作 1 相比於運作 1 對照)	運作 2	運作 3
CPP	L	100.5	100.5	0.0	112.7	120.3
在分級中稱重之 PptG	kg	1.744	1.778		2.343	2.199
提取用於懸浮液	kg	0.996	1.002		1.000	1.004
懸浮液中之 TP	g	310.0	288.6	7.4	283.3	307.7
懸浮液中之 IgG	g	264.3	244.9	7.9	222.3	251.0
IgG / kg 之漿料	g IgG/kg PptG	265.3	244.4	8.5	222.2	250.0
漿料中之 IgG/ CPP Eq	g IgG/L CPP	4.60	4.32	6.4	4.62	4.57
加載在過濾器上之 TP	g	260	260		260	260
加載在過濾器上之 TP (減去損失)	g	221	220		212	221
加載在過濾器上之 IgG	g	226.8	225.8	0.4	210.9	216.9
加載在過濾器上之 IgG (減去損失)	g	193.9	192.1	0.9	170.7	184.0
加載在過濾器上之 PptG Eq	kg	0.836	0.903	-7.4	0.918	0.848
加載在過濾器上之 PptG Eq (減去損失)	kg	0.710	0.763	-7.0	0.749	0.720
CPP Eq	L	48.2	51.0	-5.6	44.2	46.4
CPP Eq (減去損失)	L	40.9	43.2	-5.2	36.0	39.4
CM 之後的 IgG	g	176.8	182.5		173.5	172.6
IgG CM/懸浮液產率	%	78.0	80.8	-3.5	82.3	79.6
IgG CM/懸浮液產率(包括損失)	%	86.0	89.5	-3.9	94.1	87.9
最終溶液重量	kg	1.6551	1.6756		1.6196	1.6699
回收之 IgG	g	160.4	162.4	-1.2	156.6	161.6

第 27 頁，共 47 頁(發明說明書)

	單位	運作 1 Ppt G	運作 1 對照 Ppt G	德爾塔% (運作 1 相比於運作 1 對照)	運作 2	運作 3
IG 效率 (純化效率)	%	70.7	71.9	-1.7	74.3	74.5
IG 效率 (純化效率 包括損失)	%	82.7	84.5	-2.1	91.7	87.9
回收之 IgG/ CPP Eq	g IgG/L CPP	3.33	3.18	4.7	3.55	3.48
回收之 IgG/ CPP Eq (包括損失)	g IgG/L CPP	3.92	3.76	4.2	4.35	4.10

表3. 免疫球蛋白藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
白喉抗體	≥ 1.2 U 之美國標準抗毒素/mL	U/mL	10.4	9.8	9.8	12.2
脊髓灰質炎抗體	≥ 0.2	乘以 CBER 參考小兒麻痺症免疫球蛋白批次 176 之抗體水準	1.1	0.9	1.0	1.2
IgA	≤ 0.14	mg/mL	0.06	0.06	0.06	0.07
IgM	≤ 10	mg/dL	< 4	< 4	< 4	< 4
抗 A	NMT 1/64 , 25 g/L 之 IgG	1/	32	16	16	16
抗 B	NMT 1/64 , 25 g/L 之 IgG	1/	8	8	16	16
抗 D 抗體	NMT NIBSC 參考 02/228 (或等同物)	-	令人滿意的	令人滿意的	令人滿意的	令人滿意的
抗補體活性	對應於 1 CH50 U/mg 蛋白之 NMT 50	%	33	38	34	34
總蛋白	9.0-11.0	g/dL	10.0	9.9	10.0	10.0
外觀	液體製劑為透明或輕微乳白色的及無色或淡黃色	-	令人滿意的	令人滿意的	令人滿意的	令人滿意的
甘胺酸	0.20-0.30 / 0.21-0.26	M	0.23	0.23	0.23	0.24
HAV 抗體	≥ 3.5	IU/mL	5.8	8.2	5.9	6.0

測試	驗收標準	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
HBsAg 抗體	≥ 0.20	IU/mL	8.17	7.61	7.09	6.92
分子大小分佈	單體 + 二聚體：≥ 95	%	100	100	100	100
	聚合物：≤ 2	%	0.1	0.1	0.1	0.1
	片段：≤ 3	%	0.3	0.2	0.2	0.2
純度	≥ 98	%	100	100	100	100
滲透壓	240 - 300	mOsmol/kg	268	269	263	264
Parvo B19	≥ 50	IU/mL	414	459	441	367
pH	4.6-5.1 使用 0.9% NaCl，以 1%稀釋	-	4.7	4.7	4.7	4.7
前激肽釋放酶活化劑活性	≤ 10	-	< 5	< 5	< 5	< 5
Tween 80	≤ 100	ppm	< 26	< 26	< 26	< 26
TNBP	≤ 1.0	ppm	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
Triton X-100	≤ 1.0	ppm	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
密度	N/A	g/cm ³	1.03	1.03	1.03	1.03
THP-1/IL-1ra 釋放	NLT 75%	%	115	128	137	126
Ig G 1 亞類分佈	N/A	mg/mL	64.0	65.6		
	52.6 - 68.4	%	62.4	62.4	58.6	59.2
Ig G 2 亞類分佈	N/A	mg/mL	30.9	32.0		
	23.5 - 40.5	%	30.2	30.5	33.3	32.9
Ig G 3 亞類分佈	N/A	mg/mL	5.0	4.8		
	2.9 - 7.8	%	4.8	4.6	5.1	5.1
Ig G 4 亞類分佈	N/A	mg/mL	2.7	2.6		
	1.2 - 3.2	%	2.6	2.5	3.0	2.8
IgE	≤ 149.6	IU/mL	53.9	52.7	42.0	48.6
補體介導之紅血球裂解	≥ 60 (cfr. EP)	%	107	106	91	84
流感嗜血桿菌 Ab	≥ 1:1600	-	1:12800	1:12800	1:12800	1:12800
白蛋白	< 0.22	g/L	< 0.22	< 0.22	< 0.222	< 0.222
PL-1 解胺活性	< 10	nmol/mL x min	< 10	< 10	< 10	< 10
纖維蛋白原	≤ 1.5	μg/mL	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
纖維蛋白溶酶原	≤ 0.3	μg/mL	< 0.12	< 0.12	< 0.12	< 0.12
醇(乙醇)	< 20	μg/mL	< 20	< 20	< 20	< 20

測試	驗收標準	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
鋁	≤ 34	μg/L	< 25	< 25	< 25	< 25
FXIa	控制界限：≤ 1.6 mU/mL FXIa 處置界限：≤ 6.0 mU/mL FXIa	mU/mL	0.47	< 0.3125	< 0.3125	< 0.3125
FXIa , 5%	控制界限：≤ 1.6 mU/mL FXIa 處置界限：≤ 6.0 mU/mL FXIa	mU/mL	< 0.3125	< 0.3125	< 0.3125	< 0.3125
FXI 蛋白	N/A	U/mL	0.11	0.04	0.02	0.01
TGA(凝血酶產生檢定)	< 132 % NP，相當於 1.7 mU/mL FXIa	% NP	120	109	110	105

2. 科恩池之免疫球蛋白分離及純化之過程參數

【0107】 包括科恩池濃縮、級分I沉澱及分離、級分II+III沉澱及分離、級分II+III提取物沉澱及分離、沉澱物G (PptG)沉澱及分離之示例性血漿衍生免疫球蛋白分離過程的條件闡述於表4-8中。

【0108】 在示例性CPC過程中，助濾劑及過濾面積之目標量基於濃縮科恩池之體積，而不是貧低溫血漿(CPP)之體積來計算。科恩池藉由超濾來濃縮至少約14% (w/v)，以便形成第一科恩池濃縮物。在所有運作中，與超濾過程相關之技術協定及參數在表4中指示。

表4. 科恩池濃縮步驟之參數

描述	單位	運作 1	運作 2	運作 3
濃縮之前的科恩池質量	[kg]	102.6	115.1	122.8
濃縮之前的科恩池體積	[L]	100.5	112.7	120.3
用於濃縮之過濾器之類型	N/A	中空纖維 100 kDa MWCO	中空纖維 100 kDa MWCO	中空纖維 100 kDa MWCO
過濾器表面積	[m ²]	0.7	1.8	1.8
所使用過濾器之數目	N/A	1	1	1
過濾時間	[hh:mm]	05:31	02:58	02:44
最大持續 TMP	[巴]	0.52	0.46	0.42
平均滯留物流量	[L/min]	1.08	1.69	1.73
平均滲透物流量	[g/min]	50.3	110.7	119.9
滲透物重量	[kg]	16.66	19.70	19.66

描述	單位	運作 1	運作 2	運作 3
初始濃縮因數(以質量計)	[%]	16.24%	15.87%	16.01%
使用 0.9% NaCl 之後洗滌	[kg]	0.415	0.579	0.576
濃縮及後洗滌之後的科恩池質量	[kg]	88.2	105.6	104.4
濃縮及後洗滌之後的科恩池體積	[L]	86.4	95.7	102.0
最終濃縮因數(以質量計)	[%]	14.04%	14.91%	14.98%
過濾器負載	[L CPP / m ²]	143.6	62.6	66.8
濁度 – 濃縮之前 / 濃縮之後	[NTU]	223 / 249	262 / 288	270 / 309

【0109】 使第一科恩池濃縮物進一步經歷分級程序。使第一科恩池濃縮物與約7.0至7.5之pH下的8%乙醇接觸以便獲得來自分級科恩池之級分I沉澱物及級分I上清液。在所有運作中，與級分I沉澱及分離相關之技術協定及參數在表5中指示。

表5. 藉由8%乙醇之級分I沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
醇之前的 pH	[pH]	7.21	7.19	7.01	7.0
醇之前的溫度	[°C]	0.2	0.0	1.1	0.9
醇添加時間	[hh:mm]	01:00	01:01	01:00	01:00
醇之後的 pH	[pH]	7.38	7.38	7.17	7.17
醇之後的溫度	[°C]	-0.8	-0.5	-0.4	-0.3
最終 pH	[pH]	7.51 → 7.18	7.47 → 7.21	7.41	7.32
總陳化時間	[hh:mm]	13:51	13:51	15:53	17:25
懸浮液重量	[kg]	94.7	110.2	113.3	112.1
分離方法	N/A	CEPA Z61H	CEPA Z61H	CEPA Z61H	CEPA Z61H
上清液密度	[kg/L]	1.008	1.006	1.010	1.010
總上清液體積	[L]	92.7	108.1	103.1	109.2
漿料重量	[kg]	0.709	0.704	1.081	1.047
離心持續時間	[hh:mm]	02:03	02:21	02:36	01:20
平均流量	[L/h]	45.2	46.0	39.7	81.9

【0110】 使級分I上清液進一步與約6.7至約7.3之pH下的約25%乙醇接觸

以便形成級分II+III沉澱物。在所有運作中，與分離來自分級科恩池之級分II+III的蛋白質相關的技術參數在表6中指示。

表6. 藉由25%乙醇之級分II+III沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
醇之前的 pH	[pH]	6.71	6.67	6.68	6.73
醇之前的溫度	[°C]	-0.9	-0.9	-1.0	-1.9
醇添加時間	[hh:mm]	03:00	03:00	03:00	03:00
醇之後的 pH	[pH]	7.18 → 6.92	7.05 → 6.89	7.08 → 6.89	7.20 → 6.89
醇之後的溫度	[°C]	-6.6	-6.5	-6.5	-6.6
總陳化時間	[hh:mm]	16:31	16:25	17:11	18:14
最終 pH	[pH]	7.09	6.96	7.34 → 6.90	7.33 → 6.91
懸浮液重量	[kg]	111.6	129.9	124.4	131.7
分離方法	N/A	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機
過濾器類型	N/A	Becopad P270	Becopad P270	Becopad P270	Becopad P270
有效表面積	[m ²]	1.21	1.32	1.32	1.43
過濾器負載	[L CP/m ²]	83.1	76.1	85.4	84.1
框架厚度(單個)	[mm]	25	25	25	25
框架體積(單個)	[L]	2.20	2.20	2.20	2.20
死體積	[L]	13.1	14.2	14.2	15.3
助濾劑類型	N/A	Fibracel	Fibracel	Fibracel	Fibracel
助濾劑目標	[g/L]	22 g/L CPC	22 g/L CPP	22 g/L CPC	22 g/L CPC
助濾劑量	[kg]	1.901	2.200	2.105	2.243
預沖洗體積(水)	[L]	42.4	46.2	46.2	50.1
預洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	59.1	63.2	68.3	62.1
後洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	13.1	14.2	14.2	15.3
溫度(預洗滌結束)	[°C]	-2.6	-2.8	-4.0	-3.5
平均過濾溫度	[°C]	-4.9	-5.0	-5.2	-5.1
最大持續壓力(過濾)	[巴]	1.0	0.9	1.0	1.1
最終通量	[L/hr/m ²]	42.70	47.87	24.91	25.0
上清液密度	[kg/L]	0.979	0.979	0.981	0.981
總上清液體積	[L]	129.2	150.4	142.4	149.4
漿料重量	[kg]	7.822	8.58	10.07	10.512
過濾持續時間	[hh:mm]	01:53	01:48	03:11	03:17
過濾 + 後洗滌之持續時間	[hh:mm]	02:30	02:23	04:20	04:19

【0111】 將級分II+III沉澱物進一步懸浮於懸浮緩衝液中，由此形成IgG懸

浮液。將細碎二氧化矽(SiO₂)與IgG懸浮液混合至少約30分鐘之後，將IgG懸浮液過濾並且產生濾液及濾餅。在所有運作中，與分離來自級分II+III提取物的蛋白質相關的技術參數在表7中指示。

表7. 級分II+III提取物沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
理論濕漿料產率	[kg]	4.29	4.29	4.78	5.14
懸浮液 pH (初始)	[pH]	5.0	5.1	4.99	4.96
懸浮液之溫度	[°C]	3.9	4.0	4.1	3.9
提取緩衝液中之乙酸	[g/L]	0.42	0.32	0.42	0.42
提取緩衝液重量	[kg]	64.5	83.8	71.7	77.3
緩衝液與理論漿料比率	N/A	15.0	19.5	15.0	15.0
提取時間	[hh:mm]	03:00	03:00	03:00	03:00
最終 pH	[pH]	5.01	5.09	5.01	5.02
懸浮液重量	[kg]	72.3	92.4	81.8	87.9
分離方法	N/A	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機
過濾器類型	N/A	Cuno 50SA	Cuno 50SA	Cuno 50SA	Cuno 50SA
有效表面積	[m ²]	0.88	0.99	0.99	0.99
過濾器負載	[L CP/m ²]	98.2	101.0	113.9	121.5
框架厚度(單個)	[mm]	30	30	30	30
框架體積(單個)	[L]	2.75	2.75	2.75	2.75
死體積	[L]	12.0	13.4	13.4	13.4
Aerosil 目標	[g/L CPP]	2.3	2.3	2.3	2.3
Aerosil 量	[kg]	0.2303	0.2302	0.2549	0.2750
Aerosil 接觸時間	[hh:mm]	03:27	02:23	02:11	02:01
助濾劑類型	N/A	Celpure C300	Celpure C300	Celpure C300	Celpure C300
助濾劑目標	[g/L]	12 g/L CPC	12 g/L CPP	12 g/L CPC	12 g/L CPC
助濾劑量	[kg]	1.0368	1.2003	1.1495	1.2249
預洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	81.0	88.2	83.2	83.2
後洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	24.0	26.8	26.8	26.8
溫度(預洗滌結束)	[°C]	5.0	5.4	4.9	4.7
平均過濾溫度	[°C]	4.6	4.5	4.3	4.5
最大壓力(過濾)	[巴]	1.0	1.0	1.1	1.0
最終通量	[L/hr/m ²]	52.7	115.4	101.6	135.5
上清液密度	[kg/L]	0.999	0.999	0.999	0.999
總上清液體積	[L]	98.5	120.1	107.7	114.1
過濾持續時間	[hh:mm]	01:20	00:45	00:32	00:30

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
過濾 + 後洗滌之持續時間	[hh:mm]	02:07	01:03	01:04	00:51

【0112】 將由級分II+III沉澱物所產生之濾液與清潔劑接觸，形成經處理之濾液。將經處理之濾液之pH調整至約7.0並且添加乙醇至約20%至約30%之最終濃度之後，形成沉澱物G沉澱物。在所有運作中，與自級分II+III沉澱物之Ppt G沉澱及分離相關的技術參數在表8中指示。

表8. Ppt G沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
調整之前的 pH	[pH]	6.55	6.36	6.38	6.40
醇之前的 pH	[pH]	6.95	7.01	7.00	7.01
醇之前的溫度	[°C]	1.5	2.0	1.1	1.8
醇添加時間	[hh:mm]	04:00	04:00	04:01	04:01
醇之後的溫度	[°C]	-9	-9	-9	-9
最終 pH	[pH]	7.20	7.23	7.11	7.07
總陳化時間	[hh:mm]	10:11	10:11	12:05	12:14
懸浮液重量	[kg]	128.0	156.1	140.0	148.3
分離方法	N/A	CEPA Z61H	CEPA Z61H	CEPA Z61H	CEPA Z61H
上清液密度	[kg/L]	0.971	0.971	0.971	0.971
總上清液體積	[L]	126.5	157.4	141.3	149.9
漿料重量	[kg]	1.7436	1.7775	2.343	2.199
離心持續時間	[hh:mm]	02:44	03:26	01:46	01:53
平均流量(近似)	[L/h]	46.3	45.8	80.0	79.6

3. 自分級科恩池之級分IV及V分離之血漿衍生產物不受科恩池濃縮影響

【0113】 通常存在於科恩池濃縮下游之級分IV及V中之蛋白質以一定產率及純度存在於此等級分中，該等產率及純度與在在未濃縮科恩池來開始的過程中，存在於級分IV及V中之產率及純度類似。來自科恩池濃縮物的包括白蛋白、 α -1蛋白酶抑制劑之彼等血漿衍生產物之示例性分離及純化過程的條件在表9-14中闡述。

【0114】 使級分II+III之上清液進一步經歷分級程序。使級分II+III之上清液與25%乙醇接觸以便獲得級分IV-1沉澱物。分離級分IV-1中之蛋白質之技術協

定及參數在表9中指示。

表9. 藉由25%乙醇之級分IV-1沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
陳化之前的 pH	[pH]	5.56	5.51	5.47	5.49
懸浮液溫度	[°C]	-6.5	-6.5	-5.5	-5.5
總陳化時間	[hh:mm]	13:40	13:40	13:09	14:07
最終 pH	[pH]	5.51	5.47	5.41	5.48
懸浮液重量	[kg]	127.3	148.1	140.3	147.1
分離方法	N/A	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機
過濾器類型	N/A	Becopad P270	Becopad P270	Becopad P270	Becopad P270
有效表面積	[m ²]	0.55	0.66	0.66	0.77
過濾器負載	[L CP/m ²]	182.7	152.3	170.8	156.2
框架厚度(單個)	[mm]	25	25	25	25
框架體積(單個)	[L]	2.20	2.20	2.20	2.20
死體積	[L]	6.5	7.6	7.6	8.7
助濾劑類型	N/A	Celpure C300	Celpure C300	Celpure C300	Celpure C300
助濾劑目標	[g/L]	13 g/L CPC	13 g/L CPP	13 g/L CPC	13 g/L CPC
助濾劑量	[kg]	1.1233	1.3002	1.243	1.3263
預沖洗體積(水)	[L]	13.8	16.5	16.5	19.3
預洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	49.5	59.4	66.7	70.0
後洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	10.5	12.5	12.5	14.6
溫度(預洗滌結束)	[°C]	-4.0	-4.0	-3.9	-4.4
平均過濾溫度	[°C]	-5.0	-5.2	-4.7	-4.7
最大持續壓力(過濾)	[巴]	1.5	0.9	1.0	0.9
最終通量	[L/hr/m ²]	57.1	64.5	71.6	70.0
上清液密度	[kg/L]	0.978	0.977	0.979	0.979
總上清液體積	[L]	147.8	165.0	156.7	165.5
漿料重量	[kg]	4.918	5.756	5.525	5.948
過濾持續時間	[hh:mm]	03:55	03:18	02:55	02:33
過濾 + 後洗滌之持續時間	[hh:mm]	04:46	03:56	03:22	03:07

【0115】 使級分IV-1之上清液隨後與40%乙醇接觸以便獲得級分IV-4沉澱物。分離級分IV-4中之蛋白質之技術參數在表10中指示。

表10. 藉由40%乙醇之級分IV-4沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
ISA 之前的 pH	[pH]	5.54	5.50	5.50	5.49
醇之前的 pH	[pH]	5.76	5.79	5.70	5.88
醇之前的溫度	[°C]	-6.6	-6.3	-6.0	-6.0
醇添加時間	[hh:mm]	05:00	05:05	05:00	05:00
醇之後的 pH	[pH]	5.82 → 5.96	5.82 → 5.96	5.80 → 5.93	5.83 → 5.94
醇之後的溫度	[°C]	-5.8	-6.2	-6.1	-6.0
總陳化時間	[hh:mm]	07:46	07:57	10:23	10:29
最終 pH	[pH]	5.96	5.94	5.95	5.97
懸浮液重量	[kg]	179.5	201.1	192.1	202.41
分離方法	N/A	Eaton 400 壓 濾機	Eaton 400 壓 濾機	Eaton 400 壓 濾機	Eaton 400 壓 濾機
過濾器類型	N/A	Cuno 70CP	Cuno 70CP	Cuno 70CP	Cuno 70CP
有效表面積	[m ²]	0.66	0.77	0.77	0.88
過濾器負載	[L CP/m ²]	152.3	130.5	146.4	136.7
框架厚度(單個)	[mm]	25	25	25	25
框架體積(單個)	[L]	2.20	2.20	2.20	2.20
死體積	[L]	7.6	8.7	8.7	9.8
助濾劑類型	N/A	Celpure C300	Celpure C300	Celpure C300	Celpure C300
助濾劑目標	[g/L]	15.5 g/L CPC	17.2 g/L CPP	15.5 g/L CPC	15.5 g/L CPC
助濾劑量	[kg]	1.339	1.720	1.482	1.582
預沖洗體積(水)	[L]	14.9	17.3	17.3	19.8
預洗滌體積(洗滌溶 液)	[L]	47.8	59.7	57.9	59.4
後洗滌體積(洗滌溶 液)	[L]	15.2	17.4	17.4	19.6
溫度(預洗滌結束)	[°C]	-4.4	-4.4	-4.6	-5.1
平均過濾溫度	[°C]	-5.4	-5.6	-5.3	-5.4
最大持續壓力(過濾)	[巴]	0.9	0.9	1.0	1.0
最終通量	[L/hr/m ²]	87.0	93.8	76.9	104.3
上清液密度	[kg/L]	0.953	0.954	未量測	未量測
總上清液體積	[L]	196.0	223.9	約 217.2	約 230.0
漿料重量	[kg]	4.059	4.376	4.803	4.861
過濾持續時間	[hh:mm]	02:54	02:40	03:10	02:55
過濾 + 後洗滌之持 續時間	[hh:mm]	03:23	03:04	03:38	03:29

【0116】 使級分IV-4之上清液隨後與40%乙醇接觸以便獲得級分V沉澱物。本發明之級分V主要包括白蛋白。在所有運作中，分離分級科恩池之級分V

中之蛋白質的技術協定及參數在表11中指示。在運作1與未濃縮對照運作之間，觀察到級分IV-4中之類似總蛋白含量，如表12展示。

表11. 藉由40%乙醇之級分V沉澱及分離之參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
緩衝液添加之前的 pH	[pH]	5.90	5.87	5.94	5.97
緩衝液添加之前的溫度	[°C]	-6.6	-6.4	-6.4	-6.1
緩衝液添加時間	[hh:mm]	06:00	06:00	06:00	06:00
總陳化時間	[hh:mm]	10:27	10:27	12:34	13:15
最終 pH	[pH]	4.80	4.78	4.78	4.79
陳化之後的溫度	[°C]	-6.8	-6.8	-6.8	-6.9
懸浮液重量	[kg]	191.0	218.4	211.0	223.8
分離方法	N/A	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機	Eaton 400 壓濾機
過濾器類型	N/A	Becopad P270	Becopad P270	Ahlstrom 950	Ahlstrom 950
有效表面積	[m ²]	0.66	0.77	0.99	1.10
過濾器負載	[L CP/m ²]	152.3	130.5	113.9	109.3
框架厚度(單個)	[mm]	30	30	30	30
框架體積(單個)	[L]	2.75	2.75	2.75	2.75
死體積	[L]	9.25	10.6	13.4	14.8
助濾劑類型	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
預沖洗體積(水)	[L]	14.9	17.3	N/A	N/A
預洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	50.6	59.1	66.9	83.3
後洗滌體積(洗滌溶液)	[L]	N/A	N/A	N/A	N/A
溫度(預洗滌結束)	[°C]	-4.9	-5.1	-6.0	-6.0
平均過濾溫度	[°C]	-5.4	-5.8	-5.9	-5.9
最大持續壓力(過濾)	[巴]	2.4	2.4	2.0	2.2
最終通量	[L/hr/m ²]	47.4	53.1	109.6	39.4
上清液密度	[kg/L]	0.950	0.951	0.951	0.952
總上清液體積	[L]	143.4	187.2	219.3	232.0
剩餘懸浮液重量 ⁽¹⁾	[kg]	54.8	40.3	N/A	N/A
漿料重量	[kg]	6.911	7.761	11.852	13.189
計算總漿料 ⁽¹⁾	[kg]	9.693	9.518	N/A	N/A
過濾持續時間	[hh:mm]	04:35	04:35	02:01	05:21

表12. 自級分IV-4中分離之蛋白質的餘量

參數	運作 1	運作 1 對照	德爾塔
科恩血漿(起始體積) L	100	100	
用於 EtOH 分級之科恩血漿 L	86.4	100	
總蛋白(濃縮之前的池) g/l		50.5	
Fr. IV4 上清液濾液 L	196.1	223.9	
Fr. IV4 上清液濾液 TP g/L	12.9	11.5	
Fr. IV4 上清液濾液 總蛋白 g	2529	2575	
Fr. IV4 上清液濾液 g/L Alb./TP CP (濃縮之前)	25.3	25.7	-1.56%

【0117】 自級分V中分離之蛋白質之品質經由多種生物化學及免疫學檢定來評估，如表13中展示。將運作1之級分V中之分離蛋白質之品質指示參數與相應未濃縮對照之結果進行對比。

表13. 級分V之擴展表徵測試

測試參數	單位	運作 1	運作 1 對照
白蛋白(Neph)	mg/mL	52,250	52,700
結合珠蛋白	µg/mL	263	330
MSD - HPLC (聚集物)	%面積	0.48	0.72
MSD - HPLC (二聚體)	%面積	8.81	10.14
MSD - HPLC (片段)	%面積	0.26	0.31
MSD - HPLC (單體)	%面積	90.44	88.83
PKA	IE/mL	<4	<4
純度	%	97.2	97.6
總蛋白(縮二脲)	mg/mL	51.4	50.9
轉鐵蛋白	µg/mL	5.82	5.00
α1 抗胰蛋白酶	mg/mL	<0.045	<0.045

【0118】 將自濃縮科恩池血漿分離之級分IV-1中間物進一步處理直到A1PI藥物產品為止。所有相關處理參數在表14中概述。

表14. 來自級分IV-1之A1PI分離及純化的參數

參數	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 1/ 運作 1 對 照 %	運作 2	運作 3
CPP	L	100.5	100.5	0.0	112.7	120.3
在分級中稱重之 FrIV-1	g	4197.2	5756.0	-27.1	5525.0	5948.0
懸浮之 FrIV-1	g	4165.7	4950.9	-15.9	4966.0	4969.9
CPP Eq	L	99.7	86.4	15.4	101.3	100.5
懸浮液中之 TP	g	863.8	904.8	-4.5	764.3	710.0
懸浮液中之 AAT	g	55.2	35.9	53.8	56.0	53.5
懸浮液中之 AAT/CPP Eq	g AAT/L CPP	0,553	0,415	33.3	0,553	0,532
AAT / kg 之漿料	g AAT/kg FrIV-1	13.25	7.25	82.7	11.28	10.76
DEAE-1 之後的回收 AAT	g	34.7	25.7	35.0	38.7	38.0
DEAE-1 之後的回收 AAT/CPP Eq	g AAT/L CPP	0,349	0,298	17.0	0,383	0,379
DEAE-1 步驟產率	%	74.92	79.61	-5.9	81.84	84.43
總體產率	%	63.09	71.85	-12.2	69.23	71.15
CM 之後的回收 AAT	g	34.5	20.3	70.0	30.5	31.1
CM 之後的回收 AAT/CPP Eq	g AAT/L CPP	0,347	0,236	47.3	0,302	0,310
CM 步驟產率	%	95.52	80.40	18.8	84.67	87.41
總體產率	%	63.33	57.37	10.4	55.08	58.84
DEAE-2 之後的回收 AAT	g	26.7	14.9	79.2	23.2	23.9
DEAE-2 之後的回收 AAT/CPP Eq	g AAT/L CPP	0,269	0,173	55.3	0,230	0,239
DEAE-2 步驟產率	%	82.45	82.33	0.1	81.25	82.34
總體產率	%	50.08	43.92	14.0	42.93	46.41
藥物物質之回收 AAT	g	23.2	10.8	114.8	18.6	19.3
藥物物質之回收 AAT/CPP Eq	g AAT/L CPP	0,236	0,127	86.4	0,186	0,195
藥物物質 步驟產率	%	96.51	88.61	8.9	88.41	92.09
直到 藥物物質為止的總體 產率	%	45.4	33.6	35.3	35.8	39.0

【0119】 自濃縮科恩池血漿分離之人類白蛋白及A1PI滿足所有預定義限制。在藥物產品及中間物層次下執行之額外測試之所有結果在預定義範圍內，如表15-17展示。

【0120】 所有結果均滿足中間物及藥物產品層次之預定義驗收標準。基於例示出之結果，可以得出結論，科恩池濃縮不負面地影響A1PI或白蛋白之產品

品質。

表15. 白蛋白運作1及運作1對照之白蛋白藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	運作 1		運作 1 對照	
			巴氏滅菌之前	巴氏滅菌之後	巴氏滅菌之前	巴氏滅菌之後
物理外觀	透明、微黏性液體，幾乎無色、黃色、琥珀色、或綠色		合格	合格	合格	合格
總蛋白	4.70 至 5.30 g/100mL	g/dL	5	5	4.9	4.9
蛋白組成物 (PCA)	白蛋白：最少 96%，球蛋白：最大 4%	%	99%	99%	99%	99%
			1%	1%	1%	1%
N-乙醯基色胺酸	0.064 至 0.096 mmol/g 蛋白質	mmol/g 蛋白質	0.083	0.083	0.081	0.08
辛酸	0.064 至 0.096 mmol/g 蛋白質	mmol/g 蛋白質	0.067	0.067	0.078	0.077
鈉	130 至 160 mEq/L	mEq/L	152	152	149	151
鉀	最大 2 mEq/L	mEq/L	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6
濁度	初始(在 60°C± 0.5°C 下，加熱 10 至 11 hr.)：最大 30 N.U.	NU	初始 8 nu 加熱 9 nu	初始 8 nu 加熱 9 nu	初始 8 nu 加 熱 9 nu	初始 9nu 加 熱 9 nu
	加熱(在 57°C 下 50 hr.)：最大 30 N.U.					
熱穩定性	當與來自相同批次之未加熱樣品相比時，在 57°C 下加熱 50 小時之後，應保持在視覺上不改變		SAT	SAT	SAT	SAT
血紅素含量	A403nm = 最大 0.25	吸光率單位	0.04	0.03	0.04	0.03
PKA		IU/mL	N/A	<4	N/A	<4
Ph	6.85 至 7.05 (6.4 至 7.4)		7	6.9	6.8	6.8

表16. 白蛋白運作2及運作3之白蛋白藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	運作 2		運作 3	
			巴氏滅菌之前	巴氏滅菌之後	巴氏滅菌之前	巴氏滅菌之後
物理外觀	透明、微黏性液體，幾乎無色、黃色、琥珀色、或綠色		合格	合格	合格	合格
總蛋白	4.70 至 5.30 g/100mL	g/dL	5	5	4.9	4.9
蛋白組成物(PCA)	白蛋白：最少 96%， 球蛋白：最大 4%	%	99%	99%	99%	99%
			1%	1%	0%	1%
N-乙醯基色胺酸	0.064 至 0.096 mmol/g 蛋白質	mmol/g 蛋白質	0.085	0.085	0.081	0.08
辛酸	0.064 至 0.096 mmol/g 蛋白質	mmol/g 蛋白質	0.073	0.073	0.077	0.076
鈉	130 至 160 mEq/L	mEq/L	154	149	147	145
鉀	最大 2 mEq/L	mEq/L	<0.6	<0.6	<0.6	<0.6
濁度	初始(在 60°C± 0.5°C 下，加熱 10 至 11 hr.)：最大 30 N.U.	NU	初始 9 nu 加熱 10 nu	初始 10 nu 加熱 11 nu	初始 9 nu 加熱 10 nu	初始 10nu 加熱 11 nu
	加熱(在 57°C下 50 hr.)：最大 30 N.U.					
熱穩定性	當與來自相同批次之未加熱樣品相比時，在 57°C下加熱 50 小時之後，應保持在視覺上不改變		SAT	SAT	SAT	SAT
血紅素含量	A403nm = 最大 0.25	吸光率單位	0.05	0.05	0.07	0.06
PKA		IU/mL	<4	<4	<4	<4
Ph	6.85 至 7.05 (6.4 至 7.4)		6.9	6.9	7.0	7.0

表17. A1PI藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	運作 1	運作 1 對照	運作 2	運作 3
AAT 濃度	16-24 mg/mL	mg/mL	21	22	21	21
AAT 活性	0.7-1.1 mg AAT/mg 蛋白質	mg AAT/mg 蛋白質	1.0	1.0	1.0	1.0
總蛋白	16-24 mg/mL	mg/mL	20	23	21	21
凝膠電泳	與 API 標準共 遷移	模式	與參考概 況一致	與參考概 況一致	與參考 概況一 致	與參考 概況一 致
分子大小分佈	單體 NLT 95% 非單體形式 NMT 5% 片段 NMT 1.6%	%	100 <1.0 <0.5	100 <0.3 <0.5	100 <0.3 <0.5	100 <0.3 <0.5
S/D 清潔劑	殘留 Tween NMT 20 ppm 殘留 TNBP NMT 5 ppm	ppm	≤ 20 ≤ 5	≤ 20 ≤ 5	≤ 20 ≤ 5	≤ 20 ≤ 5
殘留 PEG (UV 光 譜)	NMT 20 ppm	ppm	≤ 20	≤ 20	≤ 20	≤ 20
外觀/肉眼檢查	溶液為透明的 及無色至黃色- 綠色 可含有少許顆 粒	N/A	令人滿意 的	令人滿意 的	令人滿 意的	令人滿 意的
pH	6.8-7.2	-	7.0	7.0	7.0	7.0
鈉	130-170	mEq/L	168	161	160	154
(鈉)氯化物	6-8	mg/mL	7	7	7	7
磷酸	18-22	mM	21	21	21	21
等電聚焦凝膠	與 API 標準類 似之模式	模式	與參考概 況一致	與參考概 況一致	與參考 概況一 致	與參考 概況一 致
總蛋白(Bradford)	16-24	mg/mL	21	22	20	21

實例3

【0121】 在本發明中執行商業規模運作直到沉澱物G (PptG)、級分V (FrV) 及級分IV-1 (Fr IV-1)中間物為止。在來自科恩池血漿之不同分級的各種血漿衍生蛋白沒有顯著損失的情況下，獲得所需科恩池血漿體積及蛋白質濃度。

【0122】 將PptG及Fr IV-1進一步在中試規模下分別純化至免疫球蛋白藥

物產品及A1PI藥物產品。將FrV在商業規模下純化至白蛋白藥物產品。

【0123】 在科恩分級過程之前，使用超濾膜來濃縮約4700公升貧低溫血漿。對於血漿濃縮步驟，使用預過濾(10 μm + 0.5 μm)，繼之以使用具有100 kDa之標稱分子量截止值(NMWCO)之UF盒的分批TFF。因此，測試運作中之科恩池血漿之起始蛋白濃度比對照運作高約15%。對於所關注之每一種蛋白質，將分離及純化之蛋白質之技術規格例如回收率、品質製表並且進行分析。

1. 免疫球蛋白過程性能及產品品質不受科恩池濃縮影響

【0124】 免疫球蛋白含量在濃度步驟之後計算。針對乙醇處理來製備之科恩池血漿中之所得IgG含量在沒有顯著損失的情況下濃縮。

【0125】 發現通常存在於科恩池濃縮下游之沉澱物G及免疫球蛋白藥物產品中之蛋白質的產率及純度與在以未濃縮科恩池來開始之過程中之沉澱物G及免疫球蛋白藥物產品中存在的產率及純度類似。

【0126】 發現上游及下游處理之所有操作參數諸如循環時間及步驟產率與歷史商業製造資料類似。IgG品質在藥物產品層次下評估並且所有結果均滿足預定義限制，如表18展示。

表18. 免疫球蛋白藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	商業規模運作
麻疹抗體	≥ 0.22	乘以 CBER 參考批次 176	0.54
白喉抗體	≥ 1.2 U 之美國標準抗毒素/mL	U/mL	9.4
脊髓灰質炎抗體	≥ 0.2	乘以 CBER 參考小兒麻痺症免疫球蛋白批次 176 之抗體水準	0.8
IgA	≤ 0.14	mg/mL	0.05
IgM	≤ 10	mg/dL	< 4
抗 A	NMT 1/64, 25 g/L 之 IgG	1/	32
抗 B	NMT 1/64, 25 g/L 之 IgG	1/	16

測試	驗收標準	單位	商業規模運作
抗 D 抗體	NMT NIBSC 參考 02/228 (或等同物)	-	令人滿意的
抗補體活性	對應於 1 CH50 U/mg 蛋白之 NMT 50	%	42
外觀	液體製劑為透明或輕微乳白色的及無色或淡黃色	-	令人滿意的
甘胺酸	0.20-0.30 / 0.21-0.26	M	0.23
純度	≥ 98	%	100
滲透壓	240 - 300	mOsmol/kg	259
pH	4.6-5.1 使用 0.9% NaCl，以 1%稀釋	-	4.9
前激肽釋放酶活化劑活性	≤ 7	-	< 5
Ig G 亞類分佈	與正常血漿相似	符合	符合
補體介導之紅血球裂解	≥ 60 (cfr. EP)	%	103

3. 商業規模運作中之科恩池之免疫球蛋白分離及純化的過程參數

【0127】 科恩池藉由超濾來濃縮約15% (w/v)，以便形成第一科恩池濃縮物。與超濾過程相關之技術協定及參數在表19中指示。

表19. 科恩池濃縮步驟之參數

描述	單位	商業規模運作
濃縮之前的科恩池質量	[kg]	4684
濃縮之前的科恩池體積	[L]	4565
預過濾器類型	N/A	PP 過濾器例如，10 μm + 0.5 μm 或等同物
預過濾器表面積	[m ²]	1.6 m ² (過濾器面積選擇取決於所需過濾時間)
預過濾時間	[hh:mm]	06:07
用於濃縮之過濾器之類型	N/A	OMEGA T 系列 100 kDa 或等同物
過濾器表面積	[m ²]	30
所使用過濾器之數目	N/A	12
過濾/濃縮時間	[hh:mm]	1:01
最大持續 TMP	[巴]	1.5
平均滯留物流量	[L/min]	8200l/h
平均滲透物流量	[g/min]	大約 700 L/H

第 44 頁，共 47 頁(發明說明書)

描述	單位	商業規模運作
初始濃縮因數(以質量計)	[%]	15%
使用 0.9% NaCl 之後洗滌	[L]	41 L (達到透明線之最小量)
濃縮及後洗滌之後的科恩池質量	[kg]	3982.9
濃縮及後洗滌之後的科恩池體積	[L]	3882
最終濃縮因數(以質量計)	[%]	15%
過濾器負載	[L CPP / m ²]	152.2
濁度 – 濃縮之前 / 濃縮之後	[NTU]	332/258

【0128】 在示例性CPC過程中，助濾劑及過濾面積之目標量基於濃縮科恩池之體積，而不是貧低溫血漿(CPP)之體積來計算。

【0129】 使第一科恩池濃縮物進一步經歷分級程序。使第一科恩池濃縮物與約7.0至7.5之pH下的8%乙醇接觸以便獲得來自分級科恩池之級分I沉澱物及級分I上清液。

【0130】 使級分I上清液進一步與約6.7至約7.3之pH下的約25%乙醇接觸以便形成級分II+III沉澱物。

【0131】 將級分II+III沉澱物進一步懸浮於懸浮緩衝液中，由此形成IgG懸浮液。將細碎二氧化矽(SiO₂)與IgG懸浮液混合至少約30分鐘之後，將IgG懸浮液過濾並且產生濾液及濾餅。

【0132】 將由級分II+III沉澱物所產生之濾液與清潔劑接觸，形成經處理之濾液。將經處理之濾液之pH調整至約7.0並且添加乙醇至約20%至約30%之最終濃度之後，形成沉澱物G沉澱物。

3. 自分級科恩池之級分IV及V分離之血漿衍生產物不受科恩池濃縮影響

【0133】 通常存在於科恩池濃縮下游之級分IV及V中之蛋白質以一定產率及純度存在於此等級分中，該等產率及純度與在未濃縮科恩池來開始的過

程中，存在於級分IV及V中之產率及純度類似。

【0134】 使級分II+III之上清液進一步經歷分級程序。使級分II+III之上清液與25%乙醇接觸以便獲得級分IV-1沉澱物。

【0135】 使級分IV-1之上清液隨後與40%乙醇接觸以便獲得級分IV-4沉澱物。

【0136】 使級分IV-4之上清液隨後與40%乙醇接觸以便獲得級分V沉澱物。

【0137】 自級分V中分離之蛋白質之品質經由多種生物化學及免疫學檢定來評估，如表20中展示。商業規模運作之級分V中之分離蛋白質之品質指示參數與自未濃縮科恩池開始之歷史商業製造資料類似。

表20. 級分V之擴展表徵測試

測試參數	單位	商業規模運作
PKA	IU/mL	<4
純度	%	97.2

【0138】 自濃縮科恩池血漿分離之人類白蛋白及A1PI在最終藥物產品層次下測試。藥物產品層次下之所有結果均在預定義範圍內，如表21-22展示。

【0139】 所有結果均滿足藥物產品層次之預定義驗收標準。基於例示出之結果，可以得出結論，科恩池濃縮不負面地影響A1PI或白蛋白之產品品質。

表21. 商業規模運作之20%白蛋白藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	商業規模運作
視覺控制	透明、微黏性溶液；幾乎無色、黃色至棕色或綠色	N/A	證實
pH 值	6.7 – 7.3	N/A	7.0
鉀含量	≤ 2	μmol/mL	< 0.9
鋁含量	≤ 200	μg/L	≤ 50 μg/L
血紅素含量	< 0.15	吸光率單位	0.05
聚合物及聚集物(面積 % / 蛋白質%)	歸因於聚合物及聚集物之峰的面積不大於層析圖之總面積之 10 百分比/對應於至多 5%之聚合物及聚集物	%	聚合物 + 聚集物 6% 聚合物 + 聚集物 (蛋白質) 3%
前激肽釋放酶活化劑活性	≤ 35 IU/mL	IU/mL	< 4
鈉含量	≤ 160	μmol/mL	123
蛋白組成物	≥ 96 %人類白蛋白	%人類白蛋白	98.4%
蛋白含量	20 %白蛋白：190 – 210	mg/mL	196
熱穩定性測試	符合(保持不改變)	符合(保持不改變)	符合
細菌內毒素	20 %: ≤ 1.7	EU/mL	< 0.5
無菌性測試	無菌	N/A	無菌
顆粒污染	≥ 10 μm: ≤ 6000 ≥ 25 μm: ≤ 600	顆粒/小瓶	≥ 10 μm: 744 ≥ 25 μm: 24
滲透壓	210 – 400	mOsmol/kg	226

表22. A1PI藥物產品測試結果

測試	驗收標準	單位	商業規模運作
AAT 濃度	16-24 mg/mL	mg/mL	21
AAT 比活性	≥ 0.35 mg AAT/mg 蛋白質	mg AAT/mg 蛋白質	1.0
外觀/肉眼檢查	溶液為透明的及無色至黃色-綠色 可含有少許蛋白質顆粒	N/A	令人滿意的
pH	6.5-7.8	-	7.0

【0140】 在額外實驗室規模過濾實驗中，證明在對科恩池進行濃縮時，對於多達300 kDa分子量截止值之過濾器，滲透物通量為類似的。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種自血漿製備科恩池濃縮物的方法，該方法包括：

(a) 提供來自血漿之科恩池；及

(b) 將該科恩池濃縮至至少約65 g/L之總蛋白濃度，由此形成科恩池濃縮物。

【請求項2】如請求項1之方法，其中將該科恩池濃縮至約50至約65 g/L之蛋白濃度。

【請求項3】如任一前述請求項之方法，其中該科恩池為選自貧低溫血漿、貧因子血漿、及貧抑制劑血漿之成員。

【請求項4】如任一前述請求項之方法，其中步驟(b)使用具有300 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)的超濾膜來執行，該膜以再循環或單程組態來運作，具有或不具有先前預過濾。

【請求項5】如任一前述請求項之方法，其中步驟(b)使用具有300 kDa或更小之標稱分子量截止值(NMWCO)的中空纖維濾膜來執行，該膜以再循環或單程組態來運作，具有或不具有先前預過濾。

【請求項6】如任一前述請求項之方法，其中在該科恩池濃縮物中具有至少約65 g/L之總蛋白濃度。

【請求項7】如任一前述請求項之方法，其中該科恩池濃縮物進一步經受用於製備組成物之純化過程，該組成物選自免疫球蛋白G (IgG)組成物、白蛋白組成物、A1-PI組成物及其組合。

【請求項8】如任一前述請求項之方法，其中在所得科恩池濃縮物中基本上沒有可歸諸於選自總蛋白、IgG、白蛋白、AAT、及纖維蛋白原之成員的蛋白質量損失的情況下，對科恩池進行濃縮。

【請求項9】如任一前述請求項之方法，其進一步包括使該科恩池濃縮物經受血漿分級程序。

【請求項10】如請求項9之方法，其中該分級程序為科恩分級或其修改形式中之一者。

【請求項11】如請求項10之方法，其中該分級程序包括：

(i) 使該科恩池濃縮物與約7.0至7.5之pH下的約6%至約10%乙醇接觸以便獲得級分I沉澱物及級分I上清液；及

(ii) 使該級分I上清液或濃縮科恩池與約6.7至約7.3之pH下的約18%至約27%醇接觸以便形成選自級分II+III沉澱物或替代地級分I+II+III沉澱物之成員。

【請求項12】如請求項11之方法，其進一步包括：

(iii) 使選自該級分II+III沉澱物、該級分II+III (II+III或替代地I+II+III)沉澱物之成員懸浮於懸浮緩衝液中，由此形成IgG懸浮液；

(iv) 將細碎二氧化矽(SiO₂)與該IgG懸浮液混合至少約30分鐘；

(v) 將該IgG懸浮液過濾，由此形成濾液及濾餅。

【請求項13】如請求項12之方法，其進一步包括：

(vi) 使該濾液與清潔劑接觸，形成經處理之濾液；

(vii) 將步驟(vi)之經處理濾液之pH調整至約7.0並且添加乙醇至約20%至約30%之最終濃度，由此形成沉澱物G沉澱物；

(viii) 將該沉澱物G沉澱物溶解於包含選自溶劑、清潔劑及其組合之成員的水溶液中，形成沉澱物G溶液；

(ix) 使該溶液穿過陽離子交換材料，使其中包含之蛋白質吸附在該陽離子交換材料上，並且隨後使該經吸附蛋白質在溶離液中溶離；

(x) 使該溶離液穿過陰離子交換材料，產生順流流出物；

(xi) 使該流出物穿過奈米過濾器，產生奈米濾液；

(xii) 藉由超濾來濃縮該奈米濾液，產生第一超濾液；

(xiii) 使該第一超濾液相對於滲濾緩衝液來滲濾，產生滲濾液；及

(xi) 藉由超濾來濃縮該滲濾液，產生具有約8% (w/v)與約22% (w/v)之間之蛋白濃度的第二超濾液，由此形成富含IgG之級分。

【請求項14】如請求項13之方法，其進一步包括：在(vi)之前，用至少1個壓濾機死體積之具有約4.9至約5.3之pH的洗滌緩衝液來洗滌該濾餅，由此形成洗滌溶液；將該濾液與該洗滌溶液組合，由此形成溶液，並且在步驟(vi)中用清潔劑處理該溶液。

【請求項15】一種血漿蛋白製劑，其中該蛋白質為選自藉由如請求項12之方法來製備之IgG、A1PI、及白蛋白的成員。

【請求項16】一種醫藥調配物，其包含自如請求項1之科恩池濃縮物分離之白蛋白、及醫藥學上可接受之媒劑。

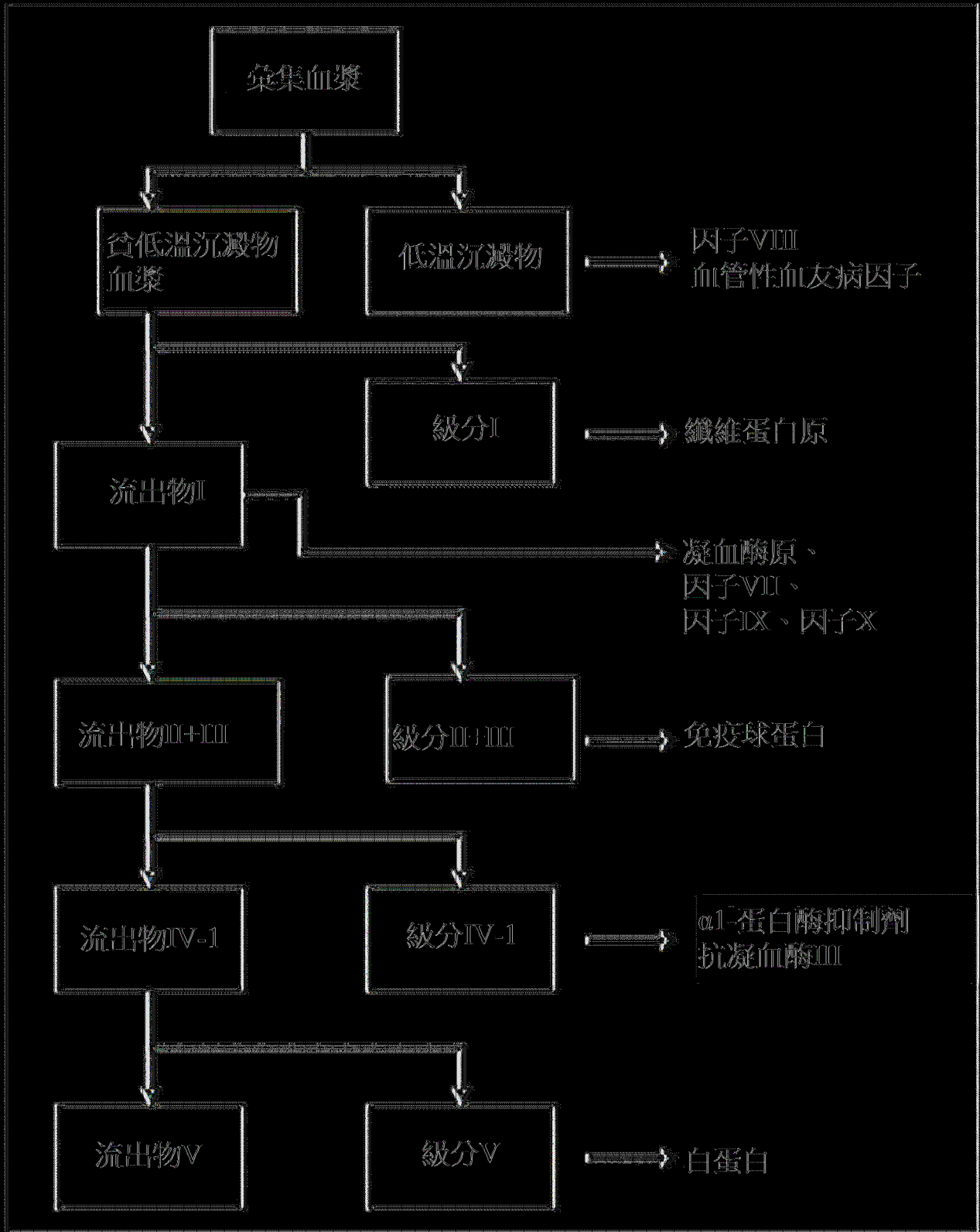
【請求項17】一種醫藥調配物，其包含自如請求項1之科恩池濃縮物分離之AAT、及醫藥學上可接受之媒劑。

【請求項18】一種醫藥調配物，其包含自如請求項1之科恩池濃縮物分離之IgG、及醫藥學上可接受之媒劑。

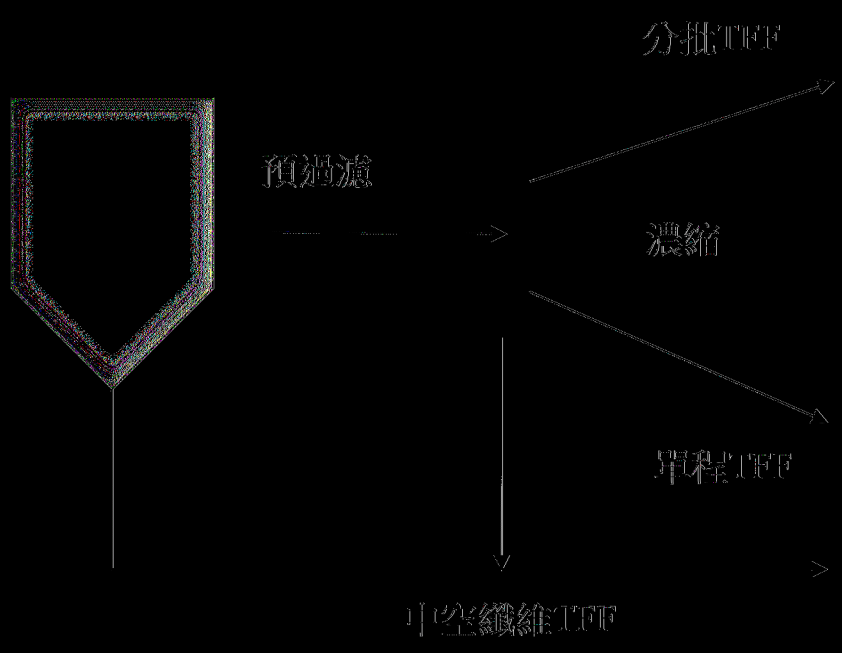
【請求項19】一種醫藥調配物，其包含自如請求項1之科恩池濃縮物分離之纖維蛋白原、及醫藥學上可接受之媒劑。

【請求項20】一種醫藥調配物，其包含自如請求項1之科恩池濃縮物分離之TP、及醫藥學上可接受之媒劑。

(發明圖式)



(圖1)



(圖2)

與膜法超純

