

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780011158.7

[51] Int. Cl.

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

[43] 公开日 2009年4月15日

[11] 公开号 CN 101410138A

[22] 申请日 2007.4.2

[21] 申请号 200780011158.7

[30] 优先权

[32] 2006.3.31 [33] FR [31] 0602802

[86] 国际申请 PCT/FR2007/000561 2007.4.2

[87] 国际公布 WO2007/118987 法 2007.10.25

[85] 进入国家阶段日期 2008.9.26

[71] 申请人 分馏及生物技术法国实验室股份公司

地址 法国雷祖里镇

[72] 发明人 罗兰·施米特赫斯勒尔

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有
限责任公司

代理人 王达佐 崔建丽

权利要求书4页 说明书9页

[54] 发明名称

作为药用产品的对切昆贡亚热特异的免疫球
蛋白的浓缩物

[57] 摘要

本发明涉及用于治疗切昆贡亚热的新的药用产
品，即对切昆贡亚热特异的免疫球蛋白的浓缩物，
以及其制备方法。

1. 作为药用产品的对切昆贡亚热病毒特异的免疫球蛋白的浓缩物。
2. 如权利要求 1 所述的浓缩物, 其中它包含免疫球蛋白 A、G 和 M 的浓缩物。
3. 如权利要求 1 所述的浓缩物, 其中它包含免疫球蛋白 G 的浓缩物。
4. 如权利要求 1 所述的浓缩物, 其中它包含免疫球蛋白 M 的浓缩物。
5. 如权利要求 1 至 4 中任一项所述的浓缩物, 包括 90%至 98%的免疫球蛋白。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的浓缩物, 其中它还包含对切昆贡亚热病毒特异的 F(ab)'2 片段。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的浓缩物, 其中它还包含对切昆贡亚热病毒特异的 Fab 片段。
8. 如权利要求 7 所述的浓缩物, 其中包含 5%至 50%的 F(ab)'2 和/或 Fab。
9. 如权利要求 6、7 或 8 所述的浓缩物, 其中 F(ab)'2 或 Fab 片段是 IgG 和 IgM 的 F(ab)'2 或 Fab 片段。
10. 如权利要求 1 至 9 中任一项所述的浓缩物, 其中将 1 至 10 mmol 的镁加入其中。
11. 如权利要求 1 至 10 中任一项所述的浓缩物, 其中将 1 至 10 mmol

的锌加入其中。

12. 如权利要求 1 至 11 中任一项所定义的浓缩物用于制备治疗切昆贡亚热的药用产品的用途。

13. 如权利要求 12 所述的制备药用产品的用途, 所述药用产品以通过局部、皮下、口服、肌肉或静脉内途径给药的形式存在。

14. 制备如权利要求 1 或 2 中所述的浓缩物的方法, 其中所述方法包括下述步骤:

- 建立至少由 1000 份捐献的血浆组成的库, 每份捐献血浆包含足够滴度的抗-切昆贡亚热的 Ig,
- 以一步法沉淀脂类和蛋白污染物,
- 在上清中回收 Ig 浓缩物。

15. 制备如权利要求 1 至 5 中任一项所述的浓缩物的方法, 其中所述方法包括下述步骤:

- 建立至少由 1000 份捐献的血浆组成的库, 每份捐献血浆包含足够滴度的抗-切昆贡亚热的 Ig,
- 以一步法沉淀脂类和蛋白污染物,
- 在碱性 pH 条件下于阴离子交换器上对上清进行色谱层析,
- 用 pH 值为 4 至 7, 优选为 6.2 的磷酸盐缓冲液洗脱 IgG,
- 任选地, 随后用添加了 100 至 175 mM, 优选为 150 mM 的氯化钠的相同磷酸盐缓冲液在 pH 值为 6 至 6.3 的条件下洗脱 IgA,
- 任选地, 随后用 pH 值为 6 至 7 且添加了 250 至 350mM 氯化钠的相同磷酸盐缓冲液洗脱 IgM,
- 任选地, 混合 IgG、IgA 和 IgM 浓缩物。

16. 如权利要求 15 中所述的方法, 其中将上清的 pH 值调整到 8.9 至 9.1, 并且在色谱层析之前将色谱层析柱用 pH 值为 8.9 至 9.1 的缓冲液装

载。

17. 制备如权利要求 6、7 或 8 所述的浓缩物的方法，其中所述方法包括下述步骤：

(1) 制备如权利要求 14 或 15 所述的 Ig 的浓缩物，或者如权利要求 15 或 16 所述的 IgG 的浓缩物，或者如权利要求 15 或 16 所述的 IgM 的浓缩物，

(2) 将初期的浓缩物的一部分经受蛋白水解，以获得 F(ab)'₂ 或 Fab 片段，

(3) 混合(1)部分和(2)部分。

18. 制备如权利要求 9 所述的浓缩物的方法，其中所述方法包括下述步骤：

(1) 制备如权利要求 15 或 16 所述的 IgG 的浓缩物，

(2) 制备如权利要求 15 或 16 所述的 IgM 的浓缩物，

(3) 混合(1)部分和(2)部分，

(4) 将初期的混和物的一部分经受蛋白水解，以获得 IgG 和 IgM 的 F(ab)'₂ 或 Fab 片段，

(5) 混合(3)和(4)。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的方法，其中所述蛋白水解在胃蛋白酶占蛋白重量的 1%、pH 值为 4、35°C 的条件下发生以获得 F(ab)'₂ 片段的。

20. 如权利要求 17 或 18 所述的方法，其中所述的获得 Fab 片段的蛋白水解发生在木瓜蛋白酶存在时。

21. 如权利要求 14 至 20 中任一项所述的方法，其中所述沉淀是辛酸的沉淀，并且其中通过 PO₄ 钙去除上清中的辛酸残留物。

22. 如权利要求 14 至 21 中任一项所述的方法，其中所述沉淀物在加

入至少一种过滤添加剂后被过滤分离。

23. 如权利要求 14 至 22 中任一项所述的方法, 其中所述上清用溶剂/去垢剂处理。

24. 如权利要求 15 至 23 中任一项所述的方法, 其中所述洗脱的免疫球蛋白通过超滤方法浓缩, 先进行常规的灭菌过滤法, 然后再通过孔隙从 100 纳米缩小至 15 纳米的纳米过滤器过滤。

25. 如权利要求 15 至 24 中任一项所述的方法, 其中将药学上可接受的稳定剂添加到经浓缩和过滤的免疫球蛋白的溶液中, 然后将所述溶液包装成无菌溶液并且可任选地将其冷冻和冻干。

作为药用产品的对切昆贡亚热特异的免疫球蛋白的浓缩物

本发明涉及用于治疗切昆贡亚热(Chikungunya)的新的药用产品,即对切昆贡亚热特异的免疫球蛋白的浓缩物,以及其制备方法。

前言

切昆贡亚热(缩写为 CHIK)是由虫媒病毒(披膜病毒科(Togaviridae)家族甲病毒属(Alphavirus))引起的通过伊蚊(*Aedes*)属蚊子传播的传染性热带疾病。所述名称来自班图语,意思是:弯曲的人、卷曲的人、或弯曲人的疾病,因为它引起非常严重的关节疼痛并且合并僵硬,这使被感染的患者呈现出极典型的弯曲表征。

在其循环中利用节肢动物媒介的病毒被归于通用术语上的虫媒病毒。虫媒病毒被 WHO 定义为基本上或主要通过借助吸血节肢动物的易感脊椎动物宿主间的生物性传播存在于自然界的病毒;在外潜伏期之后,它们在脊椎动物体内繁殖并引发病毒血症,在节肢动物的组织内增殖并通过叮咬昆虫被传播到另一脊椎动物。

所述病毒从病毒血症宿主向成年雌蚊的传播经由叮咬发生时被吸出的血液发生。所述病毒在蚊子体内繁殖,穿过该动物的胃屏障,在唾液腺中被发现。通过刚好在蚊子叮入血管之前释放的抗凝唾液实现对健康人的感染。窗口期仅有几天,在此期间人是发病前的病毒血症宿主。

在超过 950 种的蚊子中,有几种能够传播切昆贡亚热,但到目前为止只有埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)和白纹伊蚊(*aedes albopictus*)被确定为流行性的传病媒介,因为它们适应人类居住的区域。这些相同的物种还与其它的虫媒病毒的传播有关:登革热、登革出血热(HDF)、黄热病等。

临床特征主要表现为与登革热(登革热经常被误认为是切昆贡亚热,反之亦然)发热近似的高热,且合并有导致失去活动能力的关节疼痛,以及有时出现的皮疹。然而,还有直到现在仍被忽视的一些严重形式:爆发性肝炎、心脏病发作、脑膜脑炎等。诸如罗斯河病毒(Ross River)、阿尼昂尼昂病毒(O'nyong-nyong)、马雅罗病毒(Mayaro)的几种其他的甲病毒

属虫媒病毒(约 30-KD 衣壳, 且 3'端聚腺苷酸化的 RNA)与相似的症状有关。

疾病的潜伏期平均持续 4 至 7 天。病毒血症延续大约 5 天, 该阶段病毒存在于血液中, 因此可能引起传播。随后抗体产生。病毒仍存留于血液中。因此通常是获得终生免疫或至少持续一年(参见下面的 II 期实验)。

现有技术

目前没有杀病毒治疗, 也没有获得上市核准的疫苗。

治疗纯粹是针对症状进行的, 以减轻发热和减轻疼痛。

在美国, 针对切昆贡亚热疫苗的 I 期和 II 期实验已被美军传染病医学研究所实施。

II 期(Edelman R et al., "Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine" ("活切昆贡亚热病毒疫苗的 II 期安全性和免疫原性研究") TSI-GSD-218. June 2000; Am J Trop Med Hyg, 62:681-5)的随机、双盲、安慰剂对照研究包括板上活的纯化的切昆贡亚热(CHIK)疫苗的安全性和免疫原性研究, 该研究在 73 名健康的成年志愿者中进行。59 名志愿者通过皮下注射 CHIK 疫苗被免疫一次, 14 名志愿者被注射安慰剂。58 名接种疫苗的志愿者中有 57 名(98%)在第 28 天产生了抗-CHIK 中和抗体, 并且在此后一年有 85%的接种疫苗的个体仍然是血清反应阳性的。

两种抗病毒化合物的组合物, 利巴韦林(ribavirin)和干扰素 α , 也已经被测试用于切昆贡亚热(Briolant S et al., "In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: synergistic effect of interferon-alpha and ribavirin combination(抗病毒化合物对切昆贡亚热和塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus)复制的体外抑制: 干扰素- α 和利巴韦林组合的协同作用)", Antiviral Res, 2004 年 2 月; 61 (2): 111-7)。IFN- α 2b 和利巴韦林的这种组合对切昆贡亚热呈现出协同的抗病毒作用, 其非常有希望被考虑应用于治疗。

然而, 这种治疗将会是极其昂贵的并需要重复, 而且还会引起许多

已知的干扰素副作用。

发明概述

面对缺乏建立的治疗方法，在短期内不会研制出的疫苗，以及让人难以负担的抗病毒治疗，本申请人寻求提供针对切昆贡亚热的新疗法。

本申请人以令人惊喜的方式表明，对切昆贡亚热特异的免疫球蛋白的浓缩物的给药可以用于解决这一技术问题。

定义

术语“浓缩物”指通过去除特定成分获得的产物。免疫球蛋白浓缩物通过去除血浆中的特定成分获得，以得到富含免疫球蛋白的血浆部分。

术语“免疫球蛋白”(Ig)指天然的球蛋白，主要存在于血浆中，具有抗体功能，其可以被用于治愈性或预防性治疗。

免疫球蛋白是由通过二硫键连接的 2 条重链和 2 条轻链组成的异源二聚体。每条链都由 N 端的可变结构域或区(轻链由重排的 V-J 基因编码，重链由重排的 V-D-J 基因编码)和 C 端的恒定区组成，所述可变结构域或区对抗体针对的抗原是特异的，所述恒定区由轻链的单一 CL 结构域或重链的三个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。重链和轻链的可变结构域以及 CH1 和 CL 结构域的组合形成了 Fab 部分，所述 Fab 部分由极具弹性的铰链区连接到 Fc 区，所述铰链区允许每个 Fab 结合到其靶抗原的同时，使介导抗体的效应特性的 Fc 区仍然能够接近诸如 Fc γ R 受体和 Clq 的效应分子。

IgG 是数量最多的免疫球蛋白(占循环抗体的 75%到 80%)。它们保护机体抵抗在血液和淋巴液中循环的细菌、病毒和毒素。另外，它们迅速地结合到补体(免疫系统的一个组分)。它们还参与记忆应答，所述记忆应答是免疫的基础，疫苗接种的机制就是建立在其上的。最后，免疫球蛋白 G 穿过胎盘屏障，从而在胎儿体内建立被动免疫。

IgA 被发现主要在诸如唾液、肠液、汗液和母乳的分泌物中。免疫球蛋白 A 的主要作用是阻止致病体结合到细胞上，特别是结合到组成粘膜和表皮的保护细胞上。

IgM 是人体与抗原初次接触时分泌的免疫球蛋白。它们是由浆细胞释放的第一类免疫球蛋白。IgM 在血液中的存在提示现症感染。

免疫球蛋白经木瓜蛋白酶酶性蛋白水解产生 2 个相同的被称为 Fab(抗原结合片段)的片段和一个 Fc 片段(可结晶部分)。Fc 片段提供了免疫球蛋白的效应功能。

经胃蛋白酶蛋白水解, 产生了 F(ab')₂ 片段, 其中所述两个 Fab 片段仍然通过两个二硫键保持结合, 而所述 Fc 片段被裂解成几个肽。所述 F(ab')₂ 片段从两个 Fab' 片段(一个 Fab' 片段由一个 Fab 和绞链区组成)形成, 通过相互悬链的二硫键连接以形成 F(ab')₂。

术语“色谱层析”指分离混合物组分的方法, 所述方法基于它们被合适介质的选择性保留。

发明详述

首先, 本发明涉及作为药用产品的、对切昆贡亚热病毒特异的免疫球蛋白的浓缩物。

自从 Cohn 开发了乙醇沉淀方法(Cohn et al. 1946, J. Am. Chem. Soc. 68, 459; Oncley et al. 1949, J. Am. Chem. Soc. 71, 541), 使用富含免疫球蛋白的人类血浆部分治疗各种感染或先天性免疫缺陷已为人所知。

特别地, 本发明所述的浓缩物由作为药用产品的特异性针对切昆贡亚热病毒的免疫球蛋白 A、G 和 M 的浓缩物组成, 或只由特异性针对切昆贡亚热病毒的免疫球蛋白 G 的浓缩物组成, 或只由特异性针对切昆贡亚热病毒的免疫球蛋白 M 的浓缩物组成。

特别优选地, 本发明所述的浓缩物包括至少 50% 的 IgG 免疫球蛋白, 以及 90% 至 98% 的与特异针对人体免疫球蛋白的抗体进行反应的蛋白。

除了完整的对切昆贡亚热病毒特异的免疫球蛋白之外, 本发明所述的浓缩物还可以包含对切昆贡亚热病毒特异的 F(ab')₂ 和/或 Fab 片段, 特别包含 5% 至 50% 的 F(ab')₂ 和/或 Fab, 特别包含至少 50 至 60 g/L 的 Ig 和片段用于药物制备。

这种包含抗体结合部位的 F(ab')₂ 或 Fab 片段可能已经失去了衍生它们的完整抗体的某些特性, 例如结合到 Fcγ 受体的能力。

除了完整的对切昆贡亚热病毒特异的免疫球蛋白之外，本发明所述的浓缩物可以包含只来自于 IgG 和 IgM 的对切昆贡亚热病毒特异的 F(ab)'₂ 或 Fab 片段。

根据本发明，1 至 10 mmol 的镁和/或锌可以添加到浓缩物中。

本发明的另一个主题在于使用本发明所述的浓缩物制备用于治疗切昆贡亚热的药用产品。

这种治疗是预防性和/或治愈性的。它用于向在传染病地区未被感染的人提供被动免疫，或者用于治疗已经被病毒感染的患者。

所述药用产品可以通过局部、皮下、口服、粘膜、肌内或静脉内途径给予。

这种给药在几周内有效，大约是 21 天，超过了这个时间，如果传染病或症状仍存在，必须重复给药。

本发明还涉及制备本发明的浓缩物的方法。

这种方法的第一步包括建立一个至少由 1000 份捐献的血浆组成的血浆库，每份捐献的血浆都包含足够滴度的抗-切昆贡亚热 Ig。例如，当通过酶联免疫吸附测定方法测定滴度时，包含足够滴度的血清相当于被稀释到 1/1000 后抗-切昆贡亚热的抗体检测仍呈现阳性的血清。

这些捐献的血浆来自于已经接触所述疾病的人或已经产生所述疾病的患者。

可以按照在 C. van de Water et al., *Journal of Immunological Methods*, 166 (1993), 157-164 中描述的操作进行滴定。

为了使所述血浆库富含免疫球蛋白，被称为“脂类和蛋白污染物”的血浆的其他组分以一步法被沉淀。这种通过一步法沉淀的纯化可以通过根据 Steinbuch (Steinbuch M., *Archiv. Biochem. Biophys.*, 134, 279-284) 的沉淀条件下稀释血浆并加入辛酸进行。它还可以通过在诸如例如磷酸三钙和皂粘土等吸附剂存在的条件下，加入诸如利凡诺、氯化铝、西吡氯铵、辛酸、多聚磷酸盐的沉淀剂来获得。

由沉淀产生的上清液可以构成本发明所述的免疫球蛋白浓缩物。因此，它包含 IgG、IgA 和 IgM 的混合物。这种上清液被回收，例如通过离心或过滤，任选地通过加入至少一种过滤添加剂。

然后可以将由离心或过滤产生的上清可以进行病毒灭活处理，例如利用溶剂/去污剂(Triton X100)进行常规的病毒灭活处理。

如果实施的沉淀是如上所述的辛酸沉淀，上清中的辛酸残留物用PO₄ 钙去除。

为了得到 IgG、IgA 或 IgM 的浓缩物，可以应用专利申请 EP1385886 中描述的方法，特别是对应于 pH 值调节、吸附到预载柱、将包含免疫球蛋白和伴随蛋白的上清吸附到柱、洗柱以及如诸如例如 IgG、IgA 或 IgM 的各种类型免疫球蛋白的连续洗脱的操作。

病毒灭活步骤之后，所述上清接着经过碱性 pH 下进行的通过阴离子交换器色谱层析的附加纯化步骤。特别地，上清的 pH 值被预先调整到 8.9 至 9.1 的 pH 值范围，且用 pH 范围为 8.9 至 9.1 的缓冲液装载所述柱。色谱层析步骤使免疫球蛋白吸附到柱上并使未被截留蛋白进入流出液。色谱层析可以在例如结合了 DEAE、TMAE 或 QAE 基团的网状多糖或乙烯聚合物凝胶上进行。

用与装载缓冲液相同的缓冲液洗柱去除未截留蛋白后，免疫球蛋白 G 被用 pH 值为 4 至 7，优选 pH 6.2 的磷酸盐缓冲液洗脱。

用 pH 值为 6 至 6.3，补充有 100 至 175 mM，优选为 150 mM 的氯化钠的相同磷酸盐缓冲液进行的可任选的后续洗脱可以被用于收集 IgA。

用 pH 值被调整到 6 至 7 且补充有 250 至 350 mM，优选为 300 mM 氯化钠的相同磷酸盐缓冲液进行的可任选的后续洗脱可以被用于收集 IgM。

通过混合如上所述的浓缩物，可以得到 IgA、IgG 和 IgM 间的任何一种混合物。

如此洗脱和收集的免疫球蛋白可以通过超滤方法浓缩，例如先通过常规的灭菌过滤，然后通过孔隙从 100 降至 15 纳米的纳米过滤器过滤。

向经过浓缩和过滤的免疫球蛋白的所述溶液中加入一种药学上可接受的稳定剂，例如在专利申请 WO2004/091656 中描述的那些。然后将这一溶液包装为无菌溶液并且任选地将其冷冻和/或冻干。

纳米过滤技术的应用使去除那些抵抗病毒灭活溶剂/去垢剂处理的病毒成为可能。

为了制备对切昆贡亚热病毒特异的 Ig 及 F(ab)'₂ 或 Fab 片段的浓缩物, 免疫球蛋白的浓缩物(1), 即 IgA、G 和 M 的混合物或 IgG 和 IgM 的混合物或只有 IgG 或只有 IgM, 如上所述被制备, 然后在第二步中, 将得到的 Ig 浓缩物的一部分经受蛋白水解, 以获得 F(ab)'₂ 或 Fab 片段(2)。最后在第三步中, 混合浓缩物(1)和(2)。

为了得到 F(ab)'₂ 片段, 在 pH 4.0、35°C 条件下用 1% 的胃蛋白酶进行蛋白水解, 所述百分比对应于胃蛋白酶与浓缩物中蛋白重量的总重的重量比(IGLOO 操作)。

为了得到 Fab 片段, 用 1% 的木瓜蛋白酶进行蛋白水解, 该百分比对应于木瓜蛋白酶与浓缩物中蛋白重量的总重的重量比。

免疫球蛋白 G、A 和/或 M 的蛋白水解还可以通过使用纤溶酶和/或胰蛋白酶进行, 这些蛋白酶的实际应用为本领域的技术人员所熟知。

下面公开的实施例描述了本发明的特定实施方案, 但并不应该被认为限定其范围。

实施例 1: 抗-切昆贡亚热的免疫球蛋白浓缩物的制备

1-1. 血浆库的建立

从近期被切昆贡亚热病毒感染且被从疾病征状中治愈的志愿捐献者中采集 1 升富含抗-切昆贡亚热抗体的血浆。抗体滴度通过酶联免疫吸附测定方法测定, 所述方法在于将病毒抗原固定于微量滴定板上, 然后通过针对免疫球蛋白的辣根过氧化物酶标记试剂显示特异抗体。为建立所述的血浆库, 在使用“特异的”酶联免疫吸附测定方法的情况下, 至少 1/1000 稀释的阳性测定样本才能被保留。

1-2. 免疫球蛋白的制备

经 1-1 步骤得到的血浆库被冷却到 -3°C, 并且在冷却过程中加入一定体积的乙醇, 所述乙醇体积足以得到 8% 的终乙醇浓度。弃除由此形成的沉淀。

然后将上清的 pH 值调整到 5.9, 如通过加入乙酸缓冲液, 冷却到 -5°C, 最后加入一定体积的乙醇, 所述体积足以得到 19% 的终乙醇浓度。由此

形成的沉淀通过例如离心法被收集，且重悬于例如乙酸缓冲液中以获得 4.7 至 4.9 的终 pH 值。

然后在 20°C 下加入辛酸，强烈搅拌，以获得 20 g/l 的终辛酸浓度。

由此形成的沉淀通过离心法或冲积过滤被分离并弃除。将磷酸三钙或活性炭加入到上清中，然后通过深床过滤澄清混合物。

将包含从澄清步骤得到的上清的免疫球蛋白的 pH 值通过例如添加氢氧化钠/甘氨酸缓冲液调整到 pH 9，并将上清应用到阴离子交换柱(例如 Fractogel TMAE)，所述阴离子交换柱在 pH 为 9 的条件下用 pH 为 9 的甘氨酸/氯化钠缓冲液装载。

用加载缓冲液进行冲洗直至所述柱流出液在 280nm 处的 OD 接近在确立基线时被测量的 OD₂₈₀。

然后用 pH 值为 6.2 的第一磷酸钠缓冲液进行 IgG 洗脱。用补充有 300 mM 氯化钠的磷酸盐缓冲液进行第二次洗脱。

相应的洗脱物包含 IgA、IgM 和部分 IgG4。在 EP 1385886 中公开了纯化的具体操作过程。

1-3. 抗切昆贡亚热的活性浓缩物的制备

回收包含 IgG 的第一洗脱物的 25%，并将其加入到包含 IgG4、IgA 和 IgM 的洗脱物。这种免疫球蛋白的混合物通过在薄膜上进行超滤，被浓缩到 50 g/l，所述薄膜的截留阈值等于或小于 30kD。

通过针对 pH 值为 3.8 至 4.2 的柠檬酸盐缓冲液的透析过滤调整所述浓缩混合物的 pH 值，以获得包含在这一范围内的酸性 PH 值。然后在所述溶液中加入胃蛋白酶(10000 FIP/mg)，以使胃蛋白酶的量达到浓缩混合物中包含的蛋白总量的 1%。然后将所述溶液在无菌条件下于 0.2 μm 处过滤，并在 37°C 下孵育 20 小时。

孵育后，中和蛋白水解液，例如通过添加 pH 值为 6.2+/-0.2 的氢氧化钠。中和的蛋白水解液被针对 pH 值为 6.2+/-0.2 的甘氨酸缓冲液进行透析过滤，直到 OD₂₈₀ 达到约 0.005，所述 OD₂₈₀ 在 30kD 截留阈值膜的过滤线上被测量。

经胃蛋白酶水解产生的大小等于或小于 30 kD 的肽在经过截留阈值

膜时被弃除。由此得到的蛋白水解物包含 Fab 片段、F(ab)₂ 片段，但缺少 Fc 片段。

然后将得到的蛋白水解物与包含 IgG 的第一洗脱物的剩余 75% 混合。接着将所述混合物通过超滤方法浓缩，依赖于所选择的给药途径，达到范围在 50 至 160 g/l 的终浓度。浓缩物的滴度依照在如 Edelman, R 等 (American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62(6), 2000, 第 681-685 页) 中描述的方法被测量。由此得到的浓缩物中抗-切昆贡亚热特异的抗体的滴度高于初始血浆的至少 3 至 10 倍。

1-4. 制备物的用途

经 1-3 步得到的所述浓缩物通过与包含药学上可接受的赋形剂的制剂混合被稳定，所述赋形剂是诸如例如终浓度为 0.22 M 的甘氨酸，或诸如在专利申请 WO 2004/091 656 中描述的那些。加到浓缩物中的所述制剂的 pH 值与获得液体混合物是一致的，所述 pH 值范围为 4.2 至 5.6。

依赖于接受者的静脉状态，可以通过例如静脉内、皮下或肌内的途径给予得到的液体混合物。

给予的剂量对应于 0.2 至 0.8 ml/kg，在流行病的情况下，作为预防措施可以每 3 周一次给予特殊暴露的患者，如老人、孕妇或新生儿。