

SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
EIDGENÖSSISCHES INSTITUT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(11) **CH 720 461 A2**

(51) Int. Cl.: **C07K 16/06** (2006.01)
C07K 16/34 (2006.01)

Patentanmeldung für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

(12) **PATENTANMELDUNG**

(21) Anmeldenummer: 000884/2023

(22) Anmeldedatum: 22.08.2023

(43) Anmeldung veröffentlicht: 15.08.2024

(30) Priorität: 27.01.2023 EP 231538158

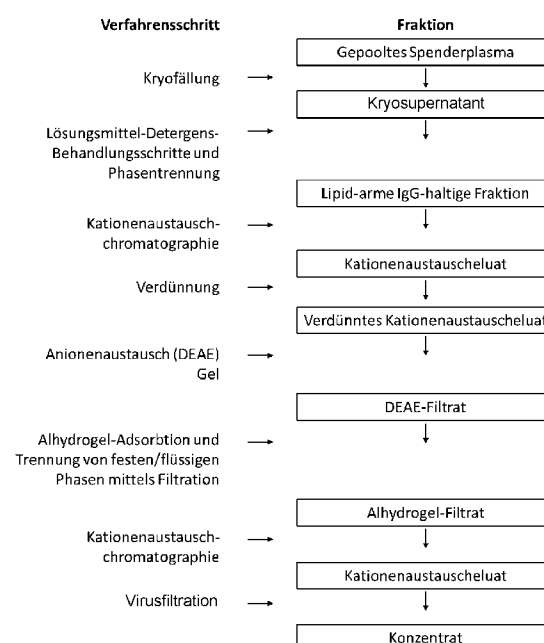
(71) Anmelder:
CSL Behring AG, Wankdorfstrasse 10
3000 Bern 22 (CH)

(72) Erfinder:
Adrian ALDER C/O CSL Behring AG, 3014 Bern (CH)
Matthias SPIESS C/O CSL Behring AG, 3014 Bern (CH)

(74) Vertreter:
Hepp Wenger Ryffel AG, Friedtalweg 5
9500 Wil (CH)

(54) **Verfahren zur Verringerung der Proteaseaktivität einer Anti-D-Immunglobulin G-haltigen Lösung**

(57) Die Erfindung stellt ein Verfahren bereit zur Verringerung der Proteaseaktivität in einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, umfassend die Schritte i) Bereitstellen einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, ii) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90; und iii) Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen. Die Anwendung dieser Bedingungen verringert die Proteaseaktivität, vorzugsweise ohne die Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin zu verringern.



Beschreibung**TECHNISCHES GEBIET**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Reinigung von Therapeutika zur pharmazeutischen Verwendung aus Blut.

STAND DER TECHNIK**Anti-D**

[0002] Morbus haemolyticus neonatorum ist die allgemeine Bezeichnung für die hämolytische Anämie von Föten und Neugeborenen, die durch Antikörper der Mutter verursacht wird. Von grösster klinischer Bedeutung für die Rhesusunverträglichkeit ist das Rhesus-Antigen D (RhD; Rho), das bei etwa 85% der Kaukasier in Europa zu finden ist. Personen, die das D-Antigen besitzen, werden als Rh-positiv bezeichnet. Personen, denen das D-Antigen fehlt, werden als Rh-negativ bezeichnet. Antikörper der Spezifität Anti-D sind die häufigsten irregulären Rhesus-Antikörper und können bei Rhesusinkompatiblen Schwangerschaften entstehen (z.B. wenn eine Mutter Rh-negativ und das Kind Rh-positiv ist). Zu einer Sensibilisierung kommt es, wenn die Mutter zum ersten Mal mit Rh-positivem Blut in Berührung kommt (z.B. durch eine geringe Anzahl fötaler Blutzellen, die in das mütterliche Blut übergehen, durch den Kontakt der Mutter mit dem Blut des Kindes während der Entbindung, durch einen invasiven Eingriff während der Schwangerschaft, wie z.B. eine Fruchtwasseruntersuchung (Amniozentese) oder eine Chorionzottenbiopsie (CVS), durch eine Verletzung des mütterlichen Unterleibs oder durch eine frühere Fehlgeburt oder Eileiterschwangerschaft). Während dieses Sensibilisierungsprozesses werden Antikörper gegen die Rhesus-positiven Blutzellen gebildet. In den meisten Fällen werden die Antikörper nicht schnell genug gebildet, um ein Baby während der ersten Schwangerschaft der Mutter zu schädigen, aber alle nachfolgenden Rh-positiven Babys wären durch die Antikörper gefährdet. Bei solchen Folgeschwangerschaften können schnell gebildete Anti-Rhesus-Antikörper die Plazenta passieren und fetale Erythroblastose verursachen. Eine Sensibilisierung kann auch nach einer Transfusion von Rhesus-inkompatiblem Blut auftreten.

[0003] Die Prophylaxe der Rhesussensibilisierung mit Immunglobulin Anti-D ist für Rh-negative Frauen im gebärfähigen Alter von entscheidender Bedeutung. Ohne Behandlung würden bis zu 17% der Erstgebärenden mit der Rhesuskonstellation (Mutter Rh-negativ, Kind Rh-positiv) im Laufe der Schwangerschaft oder während der Geburt gegen das Rhesusantigen sensibilisiert werden. Anti-D-Präparate werden seit über 30 Jahren erfolgreich eingesetzt, um die Rhesus-Sensibilisierung von Rh-negativen Frauen für den Rhesusfaktor D und damit Anti-D-bedingte Erkrankungen bei Neugeborenen, nämlich Rhesus-Erythroblastose in allen Formen, zu verhindern. Das Anti-D-Immunglobulin neutralisiert alle RhD-positiven Antigene, die während der Schwangerschaft in das Blut der Mutter gelangt sind, um die Bildung von Antikörpern zu verhindern. Anti-D-Immunglobulin wird RhD-negativen Müttern in der Regel routinemässig während der Schwangerschaft und/oder bei Blutungen, invasiven Eingriffen (z.B. Fruchtwasseruntersuchung) oder bei Unterleibsverletzungen verabreicht.

[0004] Darüber hinaus wird Anti-D auch nach Fehltransfusionen von Rh-positivem Blut an Rh-negative Empfänger eingesetzt; die Dosierung ist dabei an die Menge des Zuflusses von Rh-positiven Erythrozyten anzupassen.

[0005] Anti-D-Immunglobulin wird auch bei der Behandlung der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) eingesetzt, insbesondere bei RhD-positiven Kindern mit chronischer oder akuter ITP, bei Erwachsenen mit chronischer ITP sowie bei Kindern und Erwachsenen mit ITP infolge einer HIV-Infektion. Anti-D wird zusammen mit Kortikosteroiden und intravenösem Immunglobulin (IVIg) als Erstlinientherapie für ITP empfohlen.

Bestehende Verfahren zur Herstellung von Anti-D

[0006] Es sind verschiedene Verfahren zur Herstellung von Anti-D-Immunglobulin G bekannt. Bei bestimmten bestehenden Verfahren (wie z.B. in WO9518155 und Stucki et al., Journal of Chromatography B 1997, 700, 241-248 beschrieben) wird Anti-D-Immunglobulin G mit Hilfe eines chromatographischen Fraktionierungsverfahrens gewonnen, das mindestens einen Kationenaustausch-Säulenchromatographieschritt, einen Anionenaustauschschritt und eine Aluminiumhydroxidgelbehandlung umfasst.

[0007] Genauer gesagt kann das Immunglobulin aus menschlichem Plasma gewonnen werden. Ausgangsmaterial ist das Plasma von Rhesus-negativen Spendern, die für den Rhesusfaktor D sensibilisiert sind. Die durch Plasmapherese gewonnene Einzelspende wird im Allgemeinen eingefroren und vor der Fraktionierung bei 0-4 °C aufgetaut und gepoolt. Die für die Kationenaustauschchromatographie verwendete Plasmafraktion wird durch Zentrifugation gereinigt, um die Kryoglobuline zu entfernen.

[0008] Vor der Kationenaustauschchromatographie wird das kryoglobulinfreie Plasma behandelt, um behüllte Viren zu inaktivieren. Diese Behandlung erfolgt mit 1% des biokompatiblen, organischen Lösungsmittels Tri(n-butyl)phosphat und einem Detergens (1% Triton X-100). Das Gemisch aus Plasma, Lösungsmittel und Detergens wird dann bei 30 °C inkubiert. Anschliessend findet eine Phasentrennung statt. Die klare untere Phase wird einer Kationenaustauschchromatographie unterzogen.

[0009] In diesem Kationenaustauschschritt wird das Anti-D-IgG aus dem vorbehandelten Produkt an einen schwachen Kationenaustauscher mit Carboxymethyl (CM) als funktioneller Gruppe gebunden. In diesem Schritt werden die meisten

Nicht-IgG-Proteine entfernt; das Lösungsmittel und die Detergenzien, die zur Virusinaktivierung verwendet werden, werden hier ebenfalls entfernt. Das durch diesen Verfahrensschritt aufkonzentrierte Anti-D-IgG wird anschliessend aus dem Ionenaustauschergel eluiert.

[0010] Diese Anti-D-IgG-Fraktion wird dann durch Behandlung mit einem zweiten, schwachen Anionenaustauscher mit Diethylaminoethyl (DEAE) als funktioneller Gruppe weiter gereinigt, wobei Anti-D-IgG unter den gewählten Bedingungen nicht an die Ionenaustauscher gebunden wird.

[0011] Um die Konzentration weiterer unerwünschter Bestandteile, wie z.B. Proteasen, zu reduzieren, wird die Immunglobulinlösung zusätzlich mit Aluminiumhydroxidgel (z.B. Alhydrogel) behandelt.

[0012] Zur Erhöhung der Konzentration wird die gereinigte Anti-D-IgG-Fraktion vorzugsweise ein zweites Mal an ein CM-Ionenaustauschergel gebunden und unter geeigneten Bedingungen so konzentriert wie möglich eluiert. Nach einer Nanofiltration zur Virusentfernung (z.B. mit Planova 15N Nanofiltern) wird das Eluat zum Endprodukt verarbeitet.

Lösungsmittel/Detergens-Schritt

[0013] Die bestehenden Verfahren zur Herstellung von Anti-D aus Blut beinhalten verschiedene Schritte zur Entfernung von Viren, da Blutpräparate mit Viren kontaminiert sein können, einschliesslich pathogener Viren, die gesundheitsschädlich sind. Es ist wichtig, jegliche kontaminierende virale Aktivität zu beseitigen, wenn das Präparat einer Person verabreicht werden soll. Derzeit gibt es viele verschiedene Methoden zur Inaktivierung oder Entfernung pathogener Viren, darunter z.B. Filtration, nasse oder trockene Hitzeinaktivierung, Inaktivierung mit Lösungsmitteln/Detergenzien (S/D), pH-Inaktivierung, chemische Inaktivierung und/oder Inaktivierung durch Bestrahlung mit Ultraviolett-/Gammastrahlung. Von diesen Methoden ist die S/D-Inaktivierung vielleicht die am häufigsten angewandte viruzide Methode, da fast alle bedeutenden menschlichen Krankheitserreger behüllte Viren sind, die für eine Zerstörung der Membran durch Lösungsmittel und Detergenzien empfänglich sind. Bei der S/D-Inaktivierungsmethode werden ein organisches Lösungsmittel und ein Detergens mit einer Flüssigkeit gemischt, die das zu reinigende Polypeptid enthält, und inkubiert. Das Lösungsmittel schafft eine Umgebung, die die Aggregation zwischen dem Detergens und der das Virus einkapselnden Lipidmembran fördert, und das Detergens unterbricht die Wechselwirkungen zwischen den Molekülen in dieser Lipidmembran. Sind diese Wechselwirkungen einmal unterbrochen, kann sich ein behülltes Virus nicht mehr an eine Zelle binden und diese infizieren und sich nicht mehr vermehren, da für solche Aktivitäten eine intakte Lipidmembran unerlässlich ist. Typische Bedingungen, die in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) verwendet werden, sind 0,3% Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und 1% Polysorbat 80 (PS 80, auch bekannt als Polyoxyethylen(80)-sorbitanmonooleat oder TWEEN® 80), inkubiert bei 24 °C für mindestens 6 Stunden, oder 0,3% TNBP und 1% Polyoxyethylenoctylphenylether (TRITON® X-100 (T100)), inkubiert bei 24 °C für mindestens 4 Stunden (siehe WHO Technical Report, Annex 4 Guidelines on viral inactivation and removal procedures intended to assure the viral safety of human blood plasma products Series No. 924, p. 151-224 (2004)).

[0014] Obwohl sich die SID-Behandlung zu einer Standardtechnik entwickelt hat, ist bekannt, dass herkömmlich verwendete Reinigungsmittel wie T100 eine ernsthafte Gefahr für die Umwelt darstellen und daher nicht mehr verwendet werden dürfen. Wenn diese konventionell verwendeten Detergenzien durch andere, umweltfreundlichere Detergenzien ersetzt werden, müssen alle Auswirkungen des Detergenzienersatzes verstanden und abgeschwächt werden.

[0015] Eine bestehende Zubereitungsmethode für die Herstellung von Anti-D wurde daher geändert, um die Verwendung von T100 zu vermeiden. Als T100 durch Polysorbat 20 (PS 20) ersetzt wurde, stellte man, z.B. mit chromogenen Assays, zunächst fest, dass die Aktivität von Serinproteasen (z.B. Kallikrein-ähnliche Aktivität) in bestimmten Zwischenstufen anstieg. Humanplasma enthält viele Bestandteile, und die Aufsichtsbehörden legen strenge Obergrenzen für die Menge verschiedener dieser Bestandteile im endgültigen Anti-D-Immunglobulin-G-Produkt fest, um die Sicherheit der Patienten zu gewährleisten. Es kann eine Herausforderung sein, solche verunreinigenden Proteine wirksam zu entfernen, ohne die Ausbeute des gewünschten Produkts zu verringern. Eine Herausforderung bei der Entwicklung von Reinigungsstrategien besteht daher darin, ein angemessenes Gleichgewicht zwischen der Entfernung verunreinigender Proteine, z.B. aus dem menschlichen Ausgangsplasma, und der Erzielung einer ausreichend hohen Ausbeute des gewünschten Produkts zu erreichen.

[0016] Zu den Komponenten, für die es strenge Obergrenzen gibt, gehören der Präkallikrein-Aktivator (PKA) und die Kallikrein-ähnliche Aktivität. Die Erfinder fanden überraschenderweise heraus, dass die Serinproteaseaktivität (z.B. die Kallikrein-ähnliche Aktivität) durch die Durchführung des nachgeschalteten Aluminiumhydroxidgel-Schrittes unter bestimmten Bedingungen wirksam gesenkt werden kann, ohne die Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin G zu verringern. Dies ist generell von Vorteil, aber besonders vorteilhaft im Zusammenhang mit einem Verfahren, bei dem PS 20 für den Virusinaktivierungsschritt verwendet wurde, da die Verwendung dieses Detergens die Proteaseaktivität nach diesem Schritt leicht erhöht hat. Das Ergebnis der Arbeit der Erfinder ist die Fähigkeit, die Proteaseaktivität in einer Anti-D-Immunglobulin G-haltigen Lösung stark zu reduzieren, ohne die Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin G signifikant zu verringern. Tatsächlich wurde beobachtet, dass die Proteaseaktivität, die sich aus der Durchführung des Aluminiumhydroxidgel-Schrittes auf diese Weise ergab, geringer war als bei der T100-basierten Herstellungsmethode. Die Erfinder haben daher Bedingungen für einen Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt identifiziert, der mit einer Lösung durchgeführt wird, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, das die Proteaseaktivität reduziert, ohne die Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin signifikant zu beeinträchtigen.

OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0017] Die Erfindung beruht auf der überraschenden Beobachtung der Erfinder, dass der Schritt des Inkontaktbringens einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von etwa 4,70 bis 4,90 die Proteaseaktivität in der resultierenden (z.B. Aluminiumhydroxidgel behandelten) Lösung reduziert, ohne jedoch die Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin in der resultierenden Lösung signifikant zu verringern. Die Erfinder haben diese Bedingungen als besonders wirksam identifiziert, um dieses Gleichgewicht zwischen der Beibehaltung des gewünschten Produkts (das Anti-D-Immunglobulin) und der Verringerung der Proteaseaktivität, die bei einem Produkt, das Patienten verabreicht werden soll, unerwünscht ist, zu erreichen.

[0018] Dementsprechend stellt die Erfindung ein Verfahren zur Verringerung der Proteaseaktivität in einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, bereit, das die folgenden Schritte umfasst: i) Bereitstellen einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, ii) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90; und iii) Abtrennen der Lösung von den festen Komponenten. Auf diese Weise kann eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung erhalten werden.

[0019] Das Aluminiumhydroxidgel wird typischerweise in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein, vorzugsweise etwa 0,13 g/g Protein, zugesetzt. Schritt ii) wird typischerweise in einer Lösung mit einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt, vorzugsweise in einer Lösung mit einer Leitfähigkeit von etwa 3,2 mS/cm. Dieser Schritt wird typischerweise durchgeführt, indem die in Schritt ii) erzeugte Mischung mit dem Aluminiumhydroxidgel für einen Zeitraum von 15 Minuten bis 2 Stunden in Kontakt gebracht wird.

[0020] Das Verfahren führt typischerweise zu einer Lösung, die eine verringerte Proteaseaktivität und mindestens die gleiche Menge an Anti-D oder eine erhöhte Menge an Anti-D im Vergleich zu demselben Verfahren aufweist, bei dem der pH-Wert in Schritt ii) pH 5,5 beträgt, z.B. direkt nach dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt und/oder im Endprodukt.

[0021] Das Verfahren kann zusätzliche Schritte umfassen, wie z.B. einen Anionenaustauschschritt, der vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel durchgeführt wird und bei dem es sich typischerweise um einen DEAE-Schritt handelt. Ein Kationenaustauschschritt kann vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel durchgeführt werden.

[0022] In bestimmten Ausführungsformen wird vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt durchgeführt, wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt optional unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat 20 (PS 20) durchgeführt wird. Bevorzugte Mengen an Lösungsmittel und Detergens sind 1% TNBP (w/w) und 1,75% PS 20 (w/w).

[0023] Weitere zusätzliche Schritte, darunter ein Kationenaustauschchromatographieschritt nach Schritt iii) und ein Virusfiltrationsschritt nach Schritt iii), können ebenfalls durchgeführt werden, und einer oder beide der weiteren Schritte (i) Formulierung der Lösung (z.B. der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung), insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, (z.B. um eine formulierte Lösung zu erhalten), und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung können ebenfalls durchgeführt werden (z.B. Formulieren der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung, um eine formulierte Lösung zu erhalten, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der formulierten Lösung oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung).

[0024] In bestimmten Ausführungsformen handelt es sich bei der Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, um Plasma von menschlichen Rhesus-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder um eine Fraktion davon, wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt unter Verwendung von TNBP (z.B. 1% (w/w)) und PS 20 (z.B. 1,75% (w/w)) durchgeführt wird, und wobei Schritt (ii) durch Inkontaktbringen der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird.

[0025] In einer beispielhaften Ausführungsform umfasst das Verfahren die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rhesus-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat 20 (PS 20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts an dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon (z.B. um ein Eluat zu erhalten); d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts mit dem Eluat aus Schritt c) (z.B. um eine Lösung aus Schritt d) zu erhalten); e) Inkontaktbringen der Lösung (z.B. der Lösung aus Schritt d)) mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen (z.B. um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten); f) Durchführen eines weiteren Kationenaustauschchromatographieschritts mit der Lösung aus Schritt e) (z.B. der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung aus Schritt e); g) Filtrieren der Lösung aus Schritt f), um die Menge vorhandener Viren zu reduzieren; und h) einen oder mehrere der Schritte (i) Formulieren der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung (z.B. Formulieren der Lösung aus Schritt g), um eine formulierte Lösung zu erhalten, und Befüllen von Spritzen mit der formulierten Lösung, oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung aus Schritt g).

[0026] Das Verfahren, das die Schritte a) bis e), a) bis f), a) bis g) und a) bis h) des obigen Absatzes einschliesst, kann eine Lösung bereitstellen, die einen Gehalt an Serinproteaseaktivität von weniger als 50 nkat/l, insbesondere weniger als 40, 30, 20, 15 nkat/l und/oder eine Kallikrein-ähnliche Aktivität von weniger als 40 ng/ml, insbesondere weniger als 30, 20, 15 ng/ml umfasst. Das Verfahren, das die Schritte a) bis e) des obigen Absatzes umfasst, kann eine Lösung bereitstellen, die 0,2-0,5 g/L IgG und/oder 10-50 µg/ml Anti-D-Immunglobulin G umfasst. Das Verfahren, das die Schritte a) bis f) des obigen Absatzes umfasst, kann eine Lösung bereitstellen, die 0,5-20g/L IgG und/oder 400-1500µg/ml Anti-D-Immunglobulin G umfasst. Das Verfahren, das die Schritte a) bis g) des obigen Absatzes umfasst, kann eine Lösung bereitstellen, die 1-5g/L (z.B. 1,5-5g/L, 2-4g/L) Immunglobulin G und/oder 50-200 µg/ml (z.B. 75-175 µg/ml, 100-150 µg/ml) Anti-D-Immunglobulin G umfasst.

[0027] Die Erfindung umfasst ferner ein Verfahren zur Herstellung eines Anti-D-Immunglobulin-G-Präparats aus Plasma von Rhesusfaktor-D-negativem Blut von Rhesusfaktor-D sensibilisierten Spendern oder einer Plasmafraktion davon. Die Schritte des Verfahrens sind wie vorstehend beschrieben.

[0028] Dementsprechend sieht die Erfindung in einem Verfahren zur Herstellung eines Anti-D-Immunglobulin-G-Präparats aus einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält (z.B. Plasma aus Rhesus-negativem Blut von Rhesusfaktor-D-sensibilisierten Spendern oder eine Plasmafraktion davon), die Verbesserung vor, die darin besteht, dass die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 in Kontakt gebracht wird und die Lösung von den festen Komponenten getrennt wird (z.B. um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten). Der angegebene pH-Bereich kann zu einer reduzierten Protease in der resultierenden Lösung (z.B. der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung) führen, ohne die Ausbeute des Anti-D-Immunglobulin-Produkts zu verringern.

[0029] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Aluminiumhydroxidgel zur Verringerung der Proteaseaktivität in einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G (z.B. Plasma aus Rhesus-negativem Blut von Rhesusfaktor-D-sensibilisierten Spendern oder eine Plasmafraktion davon) enthält, vor, wobei die Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 in Kontakt gebracht wird und die Lösung (z.B. die Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung) von den festen Bestandteilen getrennt wird.

Lösung mit Anti-D-Immunglobulin G

[0030] Das erfindungsgemässe Verfahren kann ein Verfahren zur Verringerung der Proteaseaktivität in einer Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung und/oder ein Verfahren zur Herstellung einer Anti-D-Immunglobulin G-Zubereitung sein. In beiden Fällen ist die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung vorzugsweise Plasma aus Rhesus-negativem Blut von Rhesusfaktor-D-sensibilisierten Spendern oder eine Plasmafraktion davon.

[0031] Die Lösung mit Anti-D-Immunglobulin G kann von Spendern gewonnen werden. Sie kann durch Plasmapherese gewonnen werden, bei der dem Spender Vollblut entnommen wird, Blutzellen und Plasma getrennt werden und die Blutzellen zurückgegeben werden, während das Plasma gesammelt wird, oder durch Entnahme von Vollblut und Trennung von Blutzellen und Plasma ohne Rückgabe anderer Blutbestandteile an den Körper.

[0032] Der Prozess der Trennung von Blutbestandteilen wird im Allgemeinen als Fraktionierung bezeichnet, und Blut- oder Plasmafraktionen entstehen durch verschiedene Techniken zur Trennung von Blutbestandteilen (Plasma ist selbst eine Fraktion des Vollbluts). Eine Plasmafraktion ist jede Fraktion, die durch Abtrennung eines oder mehrerer Plasmapbestandteile auf beliebige Weise gewonnen wird. Die Plasmafraktion kann beispielsweise ein Kryosupernatant sein, der z.B. durch Einfrieren des Plasmas, Auftauen unter kontrollierten Bedingungen und Trennung der flüssigen und festen Bestandteile durch Zentrifugation hergestellt wird. Ein Kryosupernatant kann mit Lösungsmittel/Detergens weiterbehandelt, einer Chromatographie wie Kationenaustauschchromatographie, Anionenaustauschchromatographie und/oder Adsorption mit verschiedenen Adsorbentien unterzogen werden, um zusätzliche Fraktionen zu erzeugen.

[0033] Beispiele für Plasmafraktionen sind daher plättchenreiches Plasma, ein Plasmakonzentrat, ein Präzipitat aus einer Fraktionierung des Plasmas, ein Überstand aus einer Fraktionierung des Plasmas, ein Kryopräzipitat, ein Kryosupernatant. Weitere Beispiele sind eine Fraktion, die aus (i) der Behandlung eines Plasmakryosupernatants mit Lösungsmitteln/Detergenzien, (ii) Lösungsmittel-Detergens-Behandlung und/oder Kationenaustauschchromatographie eines Plasmakryosupernatants (z.B. Lösungsmittel-Detergens-Behandlung und Kationenaustauschchromatographie eines Plasmakryosupernatants), und (iii) Lösungsmittel-Detergens-Behandlung und/oder Kationenaustauschchromatographie und/oder DEAE-Adsorption eines Plasmakryosupernatants (z.B. Lösungsmittel-Detergens-Behandlung, Kationenaustauschchromatographie und DEAE-Adsorption eines Plasmakryosupernatants).

[0034] Die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung, die dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt unterzogen wird, enthält vorzugsweise mindestens 0,2 g/L IgG (z.B. 0,2-1 g/L, 0,3-0,6 g/L IgG). In der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung, die dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt unterzogen wird, sind vorzugsweise 60-80% des IgG vom Subtyp IgG₁ und/oder 10-20% des IgG vom Subtyp IgG₃. Alternativ oder zusätzlich sind in der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung, die dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt unterzogen wird, vorzugsweise 10-25% des IgG vom Subtyp IgG₂ und/oder 0,5-2% des IgG vom Subtyp IgG₄. Die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung, die dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt unterzogen wird, umfasst vorzugsweise 15-40 µg/ml Anti-D-IgG (z.B. 20-30 µg/ml). Die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung, die dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt unterzo-

gen wird, umfasst vorzugsweise mindestens 20 ng/ml, z.B. 20-200 ng/ml, 50-150 ng/ml Kallikrein-ähnliche Aktivität. Die Lösung mit Anti-D-Immunglobulin G, die dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt unterzogen wird, enthält vorzugsweise mindestens 50 nkat/L, z.B. 50-1000 nkat/L, 100-5000 nkat/L Serinproteaseaktivität. Diese Aktivitäten werden z.B. wie an anderer Stelle hierin beschrieben mit geeigneten chromogenen Substraten bestimmt.

Aluminiumhydroxidgel-Adsorption

[0035] Die Erfindung sieht einen Schritt der Aluminiumhydroxidgel-Adsorption vor, den die Erfinder entwickelt haben, um die Proteaseaktivität (z.B. die Serinproteaseaktivität) in der Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, zu verringern. Aluminiumhydroxidgel (z.B. als $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gel oder Alhydrogel bezeichnet) wird aufgrund seiner Fähigkeit, die Anziehung und Aufnahme von Antigen durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) zu verbessern, häufig als Adjuvans verwendet. Es wird auch als Adsorptionsmittel verwendet.

[0036] In diesem Schritt wird die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von etwa 4,70-4,90 in Kontakt gebracht. Durch die Durchführung des Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritts bei diesem pH-Wert ist es möglich, die Proteaseaktivität zu verringern, ohne die Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin G zu verringern. Bei anderen Bedingungen kann eine Verringerung der Proteaseaktivität erreicht werden, die jedoch mit einer Verringerung der Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin G einhergeht, und unter noch anderen Bedingungen geht das Anti-D-Immunglobulin G zwar nicht verloren, aber die Proteaseaktivität wird nicht verringert (siehe Beispiel 2). Überraschenderweise wurde festgestellt, dass die Durchführung des Adsorptionsschritts innerhalb dieses pH-Bereichs der optimale Weg war, um die Anforderungen einer geringen Proteaseaktivität und einer hohen Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin G in Einklang zu bringen.

[0037] Der pH-Wert der Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, muss möglicherweise vor der Zugabe des Aluminiumhydroxidgels eingestellt werden; in diesem Fall kann dies durch jedes geeignete Mittel erreicht werden. In einem Beispiel wird eine Säure verwendet, die HCl (z.B. 0,2 M HCl) sein kann.

[0038] In bevorzugten Ausführungsformen wird das Aluminiumhydroxidgel der Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein, vorzugsweise 0,12-0,15 g/g Protein, besonders bevorzugt etwa 0,13 g/g Protein, zugesetzt.

[0039] In bevorzugten Ausführungsformen erfolgt der Schritt der Aluminiumhydroxidgelbehandlung in einer Lösung mit einer Leitfähigkeit von 3,0-3,4 mS/cm, z.B. 3,1-3,3 mS/cm, vorzugsweise etwa 3,20 mS/cm.

[0040] Die Leitfähigkeit ist das Mass für die Fähigkeit einer Elektrolytlösung, Strom zu leiten. Die SI-Einheit der Leitfähigkeit ist Siemens pro Meter (S/m). Die Leitfähigkeit einer Lösung wird im Allgemeinen gemessen und nicht auf der Grundlage der Konzentration der Bestandteile berechnet. Die Leitfähigkeit wird in Einheiten von S/cm gemessen, aber da die Leitfähigkeit einer Lösung je nach der Temperatur, bei der sie gemessen wird, variieren kann, werden, wenn nicht anders angegeben, die Leitfähigkeitswerte bei 20-25°C gemessen (z.B. 20°C).

[0041] Das Inkontaktbringen des Gemischs mit Aluminiumhydroxidgel kann über einen beliebig langen Zeitraum erfolgen, in der Regel so lange, wie es für eine wirksame Verringerung der Proteaseaktivität erforderlich ist.

[0042] Das Verfahren führt zu einer Verringerung der Proteaseaktivität. Damit ist gemeint, dass die Lösung, die durch den Kontakt mit dem Aluminiumhydroxidgel entsteht (z.B. in der Flüssigkeit nach Trennung der flüssigen und festen Bestandteile), eine geringere Proteaseaktivität aufweist als die Lösung vor dem Kontakt mit dem Aluminiumhydroxidgel. Zu den Proteasen, die zur Proteaseaktivität der Anti-D-Immunglobulin G-haltigen Lösung beitragen, gehören Serinproteasen, z.B. Kallikrein-ähnliche Aktivität.

[0043] Die Aktivität von Serinproteasen kann mit Hilfe von Standardtests gemessen werden, die in der Fachwelt bekannt sind, z.B. unter Verwendung handelsüblicher chromogener Substrate. Ein Beispiel für einen geeigneten Test ist ein Test unter Verwendung des chromogenen Substrats S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA *2HCl, erhältlich z.B. bei Diapharma). Die Spaltung von S-2288 durch Serinproteasen mit Argininspezifität führt zur Bildung von pNA. Die proteolytische Aktivität wird somit durch die Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA) bestimmt. Die Bildung von pNA kann spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt werden, z.B. über einen geeigneten Zeitraum. Geeignete Assays können auf den in P. Friberger, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 1982, 162, 1-298 beschriebenen basieren. Die pNA-Bildungsrate kann mit geeigneten Referenzen verglichen werden, die eine bekannte Menge an proteolytischer Aktivität aufweisen.

[0044] Die Kallikrein-ähnliche Aktivität kann auch mit Hilfe von Standardtests gemessen werden, die in der Fachwelt bekannt sind, z.B. unter Verwendung kommerziell erhältlicher chromogener Substrate. Ein Beispiel für einen geeigneten Assay ist ein Assay unter Verwendung des chromogenen Substrats S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA *2HCl, erhältlich z. B. bei Diapharma). Die Spaltung von S-2302 durch Kallikrein-ähnliche Aktivität führt zur Bildung von pNA. Die proteolytische Aktivität wird also durch die Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA) bestimmt. Die Bildung von pNA kann spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt werden, z.B. über einen geeigneten Zeitraum. Die Geschwindigkeit der pNA-Bildung kann mit geeigneten Referenzen verglichen werden, die eine bekannte Menge an proteolytischer Aktivität aufweisen.

[0045] Im Allgemeinen resultiert eine Verringerung der Proteaseaktivität, auf die hier Bezug genommen wird, aus der Entfernung der relevanten Protease(n) aus der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung, z.B. als Ergebnis der Adsorption der Protease an das Aluminiumhydroxidgel, und nicht aus einer Inaktivierung der relevanten Protease(n).

[0046] Die Verringerung der Proteaseaktivität zeigt sich in der aus dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt resultierenden Lösung (z.B. in der Flüssigkeit nach der Trennung der flüssigen und festen Bestandteile), z.B. in der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung, und kann eine Verringerung von mindestens 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% sein. Die Verringerung kann eine Verringerung im Vergleich zu der Aktivität in der Lösung vor ihrem Inkontaktbringen mit dem Aluminiumhydroxidgel sein.

[0047] Es kann auch zu einer Verringerung der Proteaseaktivität kommen, z.B. zu einer Verringerung von mindestens 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% im Vergleich zu der Aktivität in einer Lösung, die sich aus dem Kontakt einer identischen Ausgangslösung mit dem Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 5,5 ergibt, wobei jedoch die gleiche Menge des Aluminiumhydroxidgels auf g/g Proteinbasis und bei gleicher Leitfähigkeit (z.B. unter ansonsten gleichen Bedingungen) verwendet wird.

[0048] Diese Verringerungen sind insbesondere dann zu beobachten, wenn der Aluminiumhydroxidgel-Schritt mit einer Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung durchgeführt wird, die einem Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt, wie nachstehend näher definiert, unterzogen wurde, und insbesondere, wenn der Aluminiumhydroxidgel-Schritt mit einer Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung durchgeführt wird, die einem Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (z.B. bei 1% (w/w)) und Polysorbat 20 (z.B. bei 1,75% (w/w)).

[0049] Die Bedingungen werden so gewählt, dass die Verringerung der Ausbeute an Anti-D-Immunglobulin G im Endprodukt und damit auch der Verlust von Anti-D-Immunglobulin G während des Aluminiumhydroxidgel-Schritts möglichst gering ist. Vorzugsweise beträgt die Menge an Anti-D-Immunglobulin G in der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung nach dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt (z.B. in der Flüssigkeit nach Trennung der flüssigen und festen Bestandteile), z.B. in der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung, mindestens 70, 75, 80, 85, 90, 95% der Menge in der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung vor dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt. Vorzugsweise beträgt die Menge an Anti-D-Immunglobulin G in der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung nach dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt mindestens 100, 110, 120% im Vergleich zu der Menge in einer Lösung, die aus einer identischen Ausgangslösung erhalten wurde, die jedoch mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 5,5 in Kontakt gebracht wurde, wobei jedoch die gleiche Menge Aluminiumhydroxidgel auf g/g Proteinbasis und bei der gleichen Leitfähigkeit wie die Menge in der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung verwendet wurde (z.B. unter ansonsten gleichen Bedingungen).

[0050] In typischen Ausführungsformen wird der Kontakt für mindestens 10 Minuten, z.B. zwischen 10 Minuten und 3 Stunden, 15 Minuten und 2 Stunden, 20 Minuten und 90 Minuten, 30 Minuten und 60 Minuten und normalerweise für etwa 45 bis 55 Minuten durchgeführt. Der Kontakt wird zweckmässigerweise bei etwa 15 bis 25 °C, z.B. etwa 18 bis 23 °C, 19 bis 21 °C oder etwa 20 °C durchgeführt.

[0051] In bestimmten Ausführungsformen wird das Gemisch während des Inkontaktbringens-Schritts gerührt. Dies kann z.B. durch Rühren bei 100-500 U/min, z.B. 150-450, 200-400, 250-350, 300-325 U/min geschehen.

[0052] In bestimmten Ausführungsformen werden während des Kontakts mit dem Aluminiumhydroxidgel ein oder mehrere Filterhilfsmittel zugesetzt, z.B. Kieselgur oder Perlit. Geeignete Beispiele sind kalzinierte Kieselgur (z.B. Celit). Optional wird jedes der ein oder mehreren Filterhilfsmittel für mindestens 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 Minuten zugegeben. Wird mehr als ein Filterhilfsmittel zugegeben, können sie zusammen oder nacheinander zugegeben werden. Das/die Filterhilfsmittel kann/können nach einer anfänglichen Kontaktzeit mit dem Aluminiumhydroxidgel allein zugegeben werden, z.B. wird das Aluminiumhydroxidgel zu der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung gegeben und ein oder mehrere Filterhilfsmittel werden nach einer gewissen Zeit, z.B. nach mindestens 10, 15, 20, 25, 30, 35, 50 Minuten, z.B. für einen Zeitraum von mindestens 5, 10, 15 Minuten zugegeben. Optional können Filterhilfsmittel mit einer Permeabilität zwischen 0,050-0,085 Da verwendet werden, z.B. Celite® 574, Celite® 545, Filter Cel C505 und C505CZ. Optional kann eine Mischung aus einem oder mehreren der Filterhilfsmittel verwendet werden. Das Gemisch kann Celite® 574 enthalten. Das Gemisch kann Celite 545® enthalten.

[0053] In einigen Ausführungsformen wird das Filterhilfsmittel Celite 574® in der folgenden Menge verwendet: Celite 574® [g] = Gewicht DEAE-Filtrat [g] x 0,00025.

[0054] In einigen Ausführungsformen wird das Filterhilfsmittel Celite® 545 in der folgenden Menge verwendet: Celite® 545 [g] = Gewicht DEAE-Filtrat [g] x 0,00025.

[0055] Die festen und flüssigen Bestandteile des Gemischs werden dann durch ein aus dem Stand der Technik bekanntes Verfahren getrennt, z.B. durch Zentrifugation oder Filtration. Bei der flüssigen Komponente handelt es sich um eine weitere Anti-D-Immunglobulin G-haltige Lösung.

[0056] In bestimmten Ausführungsformen wird die ungebundene Anti-D-IgG-Fraktion durch ein Sieb, z.B. ein Polypropylen Sieb, gefiltert, um feste und flüssige Bestandteile zu trennen.

[0057] In bestimmten Ausführungsformen wird auf einem Sieb ein Filterkuchen gebildet, wobei eine angemessene Menge des benötigten Celits, z.B. die Hälfte der benötigten Celit-Menge, in einem kleinen Volumen des entsprechenden Puffers verwendet wird. Die verbleibende Celit-Menge wird dann unmittelbar vor dem Filtrieren in die Immunglobulin-Alhydrogel-Suspension eingemischt.

[0058] Filterhilfsmittel sind besonders nützlich, wenn vor der Aluminiumhydroxidgel-Adsorption ein Anionenaustauschchromatographieschritt vorgesehen ist.

Lösungsmittel-Detergens-Viruinaktivierungsschritt

[0059] Das erfindungsgemässe Verfahren kann die Inaktivierung eines oder mehrerer Viren beinhalten. Die Lösungsmittel-Detergens-Behandlung führt zur Inaktivierung eines oder mehrerer Viren, die in der Lösung enthalten sein können. Bei den Viren handelt es sich in der Regel um kontaminierende Viren, die aus der Umwelt in die Lösung gelangen oder in dem Material vorhanden waren, aus dem die Lösung hergestellt wurde. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von Viren in der Lösung ist möglicherweise nicht bekannt, so dass die Behandlung im Allgemeinen dazu dient, das Risiko einer viralen Kontamination zu verringern, indem ein oder mehrere Viren, die sich in der Lösung befinden können, inaktiviert werden. Wenn Viren in der Lösung vorhanden sind, führt die Inkubation zur Inaktivierung eines oder mehrerer dieser Viren. Die Lösungsmittel-Detergens-Behandlung wird vorzugsweise vor dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt durchgeführt.

[0060] In einem Aspekt der Erfindung kann das in dem Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt verwendete Lösungsmittel Tri(n-butyl)phosphat sein. Dieses wird vorzugsweise in einer Menge von 0,5-1,5%, z.B. 0,75-1,25%, vorzugsweise 1% (w/w) verwendet.

[0061] In einem Aspekt der Erfindung kann das im Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt verwendete Detergens Polysorbat 20 sein. Dieses wird vorzugsweise in einer Menge von mehr als 1% und bis zu 2% (w/w) verwendet, z.B. etwa 1,1% (w/w), etwa 1,2% (w/w), etwa 1,3% (w/w), etwa 1,4% (w/w), etwa 1,5% (w/w), etwa 1,6% (w/w), etwa 1,7% (w/w), etwa 1,8% (w/w) oder etwa 1,9% (w/w), oder 1,2-1,9% (w/w), 1,5-1,8% (w/w), 1,7-1,8% (w/w). Besonders bevorzugte Mengen sind 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75 oder 1,76% (w/w), wobei 1,75% (w/w) besonders bevorzugt ist.

[0062] Die Bedingungen für die Lösungsmittel-Detergens-Behandlung zur Viruinaktivierung sind in der Fachwelt wohlbekannt. In einer Ausführungsform beinhaltet der Schritt der Lösungsmittel-Detergens-Behandlung die Inkubation des Lösungsmittels und des Detergens mit dem Anti-D-IgG-haltigen Material für mindestens 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120 Minuten, vorzugsweise mindestens 60 Minuten. Dieser Schritt erfolgt vorzugsweise bei 25-35 °C, z.B. 26-34 °C, 27-33 °C, 28-32 °C, 29-31 °C oder etwa 30 °C. Das Anti-D-IgG-haltige Material kann vor der Zugabe des Lösungsmittels und des Detergens auf die erforderliche Temperatur gebracht werden. Die Mischung kann während der Inkubation gerührt werden, insbesondere bei 100-500 U/min, z.B. 150-450, 200-400, 250-350, 300-325 U/min.

[0063] Der Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt kann eine zweite Inkubation von mindestens 90, 100, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, vorzugsweise mindestens 240 Minuten umfassen. Dieser Schritt erfolgt vorzugsweise bei 25-35 °C, z.B. 26-34 °C, 27-33 °C, 28-32 °C, 29-31 °C oder etwa 30 °C. Das Gemisch kann während der Inkubation gerührt werden, wahlweise mit 100-500 U/min, z.B. 150-450, 200-400, 250-350, 300-325 U/min. Bei dieser zweiten Inkubation kann das Produkt der ersten Inkubation vor dem zweiten Inkubationsschritt filtriert werden. Diese Filtration kann mit einem Mikrometerfilter durchgeführt werden. Geeignete Filter sind Filter mit einer Grösse von 0,5 µm oder weniger, z.B. ein Filter mit 0,45, 0,3, 0,2 oder 0,1 µm. Vorzugsweise ist der Filter ein 0,45 µm Filter. Das Produkt der ersten Inkubation kann zunächst durch einen Vorfilter geleitet werden. Geeignete Vorfilter sind Mikrometerfilter, z.B. Filter mit 1 µm oder 0,5 µm oder weniger, z.B. ein 0,45, 0,3, 0,2 oder 0,1 µm Filter.

[0064] Die viruinaktivierte Lösung wird zur Phasentrennung mindestens 600 Minuten (z.B. 600-1500, 720-1440, 780-1380, 840-1320, 840-1260 oder 840-1200 Minuten) bei 35-45 °C, vorzugsweise 37-43 °C, noch bevorzugter 39-41 °C, ohne Rühren belassen. Die untere, nicht lipidhaltige (lipidarme) Phase enthält das Anti-D-IgG und wird weiterverarbeitet (z.B. ist sie eine weitere Anti-D-Immunglobulin G-haltige Lösung).

Kationenaustauschschritt

[0065] Das erfindungsgemässe Verfahren kann einen Schritt der Kationenaustauschchromatographie umfassen. Dieser kann nach dem Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt erfolgen (z.B. kann er an einer Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung durchgeführt werden, die einer Lösungsmittel-Detergens-Behandlung unterzogen wurde). Bei der Kationenaustauschchromatographie werden positiv geladene Moleküle von einem negativ geladenen festen Träger angezogen. Jeder negativ geladene Ligand, der an die zur Bildung der Kationenmatrix geeignete, feste Phase gebunden ist, kann verwendet werden, z.B. ein Carboxylat, Sulfonat und andere, wie unten beschrieben. Zu den handelsüblichen Kationenaustauschermatrizen gehören beispielsweise solche mit einer Gruppe auf Sulfonatbasis (z.B. MonoS®, MiniS, Source™ 15S und 30S, SP Sepharose® Fast Flow™, SP Sepharose® High Performance von GE Healthcare, Toyopearl® SP-650S und SP-650M von Tosoh, Macro-Prep® High S von BioRad, Ceramic HyperD® S, Trisacryl® M und LS SP und Sphero-dex® LS SP von Pall Technologies; eine Gruppe auf Sulfoethylbasis (z.B. Fractogel® SE von EMD Millipore, POROS® (S-10 und S-20 von ThermoFisher); eine Gruppe auf Sulfopropylbasis (z. B. TSK Gel® SP 5PW und SP-5PW-HR von Tosoh, POROS® HS-20 und HS 50 von ThermoFisher); eine Gruppe auf Sulfoisobutylbasis (z. B. Fractogel® EMD SO3 von EMD Millipore); eine Sulfoxyethylgruppe (z.B. SE52, SE53 und Express-Ion™ S von Whatman), eine Carboxymethylgruppe (z.B. CM Sepharose® Fast Flow von GE Healthcare, Hydrocell CM von Biochrom Labs Inc, Macro-Prep® CM von BioRad, Ceramic HyperD® CM, Trisacryl M CM, Trisacryl LS CM von Pall Technologies, Matrex Cellufine C500 und C200 von Millipore, CM52, CM32, CM23 und Express-Ion™ C von Whatman, Toyopearl® CM-650S, CM-650M und CM-650C von Tosoh); Gruppen auf Basis von Sulfonsäure und Carbonsäure (z.B. BAKERBOND® Carboxy-Sulfon von J.T. Baker); eine

Gruppe auf Carbonsäurebasis (z.B. WP CBX von J. T. Baker, DOWEX® MAC-3 von Dow Liquid Separations, Amberlite™ Weak Cation Exchangers, DOWEX® Weak Cation Exchanger und Diaion Weak Cation Exchangers von Sigma-Aldrich und Fractogel® EMD COO- von EMD); eine Gruppe auf Sulfonsäurebasis (z.B. Hydrocell SP von Biochrom Labs Inc, DOWEX® Fine Mesh Strong Acid Cation Matrix von Dow Liquid Separations, UNOsphere® S, WP Sulfonic von J. T. Baker, Sartobind® S Membran von Sartorius, Amberlite™ Strong Cation Exchangers, DOWEX® Strong Cation und Diaion Strong Cation Exchanger von Sigma-Aldrich); und eine Gruppe auf Orthophosphatbasis (z.B. PI 1 von Whatman).

[0066] Falls gewünscht, können Kationenaustauschermembranen oder Kationenaustauschermatrizen, z.B. Sartobind® S (Sartorius; Edgewood, NY), verwendet werden.

[0067] Beim Kationenaustausch wird vorzugsweise ein schwacher Kationenaustauscher verwendet, z.B. auf der Basis von Liganden mit einer Carboxymethylgruppe. Die Kationenaustauschmatrix kann Methacrylatperlen (z.B. Methacrylatperlen, die Liganden mit einer Carboxymethylgruppe enthalten) umfassen. In bestimmten Ausführungsformen wird beim Kationenaustausch eine Chromatographiesäule verwendet, die Liganden mit einer Carboxymethylgruppe enthält. Die Säule kann wahlweise mit einem geeigneten Äquilibrierungspuffer (z.B. einem Phosphatpuffer) äquilibriert werden. Das Material (z.B. eine Anti-D-Immunglobulin G-haltige Lösung, z.B. ein Kryosupernatant, die einer Lösungsmittel-Detergens-Behandlung unterzogen wurde) wird auf die Säule aufgetragen (gegebenenfalls nach Verdünnung z.B. im Äquilibrierungspuffer), und gegebenenfalls wird die Säule mit einem geeigneten Waschpuffer gewaschen. Danach folgt ein Elutionsschritt. Bei dem eluierten Material handelt es sich um eine weitere Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung. Typischerweise wird die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung auf 2,90-3,40 mS/cm, insbesondere 2,95 mS/cm verdünnt. Beispielhafte Bedingungen für diese Schritte sind: Verdünnung der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung auf 3,00-3,40 mS/cm, mit einer Konzentration von 8-12 g/L und einem pH-Wert von 5,45-5,55. Ein beispielhafter Äquilibrierungspuffer hat eine Leitfähigkeit von 3,00-3,40 mS/cm und einen pH-Wert von 5,45-5,55. Weitere beispielhafte Bedingungen umfassen die Verdünnung der Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung auf 2,90-3,10 mS/cm, insbesondere 2,95 mS/cm. Bei der Verdünnung des Materials kann das verdünnte Material vor dem Auftragen auf die Säule gefiltert werden. Diese Filtration kann mit einem Mikrometerfilter durchgeführt werden. Geeignete Filter sind Filter mit einer Grösse von 0,5 µm oder weniger, z.B. ein Filter mit 0,45, 0,3, 0,2 oder 0,1 µm. Vorzugsweise ist der Filter ein 0,45 µm Filter.

[0068] In bestimmten Ausführungsformen wird für den Kationenaustausch eine Chromatographiesäule mit einer Gruppe auf Carboxymethylbasis verwendet. Die Säule kann mit einem Natriumphosphatpuffer (z.B. 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,5, 3,2 mS/cm) äquilibriert werden. Das Material (z.B. eine Anti-D-Immunglobulin G-haltige Lösung) wird im Äquilibrierungspuffer auf die Säule aufgetragen und mit einem Waschpuffer (z.B. einem 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0) gewaschen. Danach folgt ein Elutionsschritt. Für den Elutionsschritt können Natriumphosphatpuffer und Natriumchlorid verwendet werden (z.B. 25 mM Natriumphosphatpuffer + 0,2 M Natriumchlorid, pH 7,5).

Anionenaustauschschritt

[0069] Weitere Reinigungsschritte können in das Verfahren einbezogen werden, entweder vor dem Schritt der Aluminiumhydroxidgeladsorption oder danach. Jeder weitere Reinigungsschritt kann ein Chromatographie- und/oder Adsorptionsschritt sein, z.B. Immunaффinitäts-, Affinitäts-, Hydrophobie-, Ionenaustausch-, multimodale, Grössenausschluss- oder Metallchelatchromatographie/Adsorption.

[0070] Beispielsweise kann die Lösung vor dem Schritt der Aluminiumhydroxidgeladsorption einem Ionenaustausch unterzogen werden (z.B. nach einem Kationenaustauschschritt oder nach einem Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt oder nach einem Lösungsmittel-Detergens-Behandlungsschritt und einem Kationenaustauschschritt). Der Anionenaustausch mit DEAE (wie unten beschrieben) ist für diesen Schritt besonders geeignet.

[0071] Bei der Anionenaustauschchromatographie werden negativ geladene Moleküle von einem positiv geladenen festen Träger, z.B. einem Harz oder Gel, angezogen. Ein positiv geladener fester Träger kann auf jede dem Fachmann bekannte Weise hergestellt werden und beinhaltet in der Regel die kovalente Bindung eines positiv geladenen funktionellen Liganden an einen festen Träger. Geeignete positiv geladene funktionelle Liganden hängen immer von dem Material ab, das von der Lösung getrennt werden soll. Beispiele für geeignete Anionenaustauschharze oder -gele sind solche, die eine funktionelle quaternäre Amingruppe (Q) und/oder eine tertiäre Amingruppe (DEAE) oder eine Diethylaminopropylgruppe (ANX) enthalten. Zu den im Handel erhältlichen Anionenaustauschchromatographiematrizen gehören, unter anderem, DEAE-Cellulose, Poros™ PI 20, PI 50, HQ 10, HQ 20, HQ 50, D 50, XQ von ThermoFisher, MonoQ™, MiniQ™, Source™ 15Q und 30Q, Q, DEAE und ANX Sepharose Fast Flow™, Q Sepharose high Performance™, QAE SEPHADEX™ und FAST Q SEPHAROSE™ von GE Healthcare, WP PEI™, WP DEAM™, WP QUAT™ von J.T. Baker, Hydrocell™ DEAE und Hydrocell™ QA von Biochrom Labs Inc, UNOsphere™ Q, Macro-Prep™ DEAE und Macro-Prep™ High Q von Biorad, Ceramic HyperD™ Q, ceramic HyperD™ DEAE, Q HyperZ™, Trisacryl™ M und LS™ DEAE, Spherodex™ LS DEAE, QMA Spherosil™ LS, QMA Spherosil™ M von Pall Technologies, DOWEX™ Fine Mesh Strong Base Type I und Type II Anion Matrix und DOWEX™ MONOSPHER E 77, Schwache-Base-Anion Harz von Dow Liquid Separations, Matrex Celulufme™ A200, A500, Q500 und Q800, von Millipore, Fractogel™ EMD TMAE₃ Fractogel™ EMD DEAE und Fractogel™ EMD DMAE von EMD, Amberlite™ schwacher und starker Anionenaustauscher Typ I und II, DOWEX™ schwacher und starker Anionenaustauscher Typ I und II, Diaion™ schwacher und starker Anionenaustauscher Typ I und II, Duolite™ von Sigma-Aldrich, TSK™ Gel Q und DEAE 5P und 5PW-HR, Toyopearl™ SuperQ-650S, 650M und 650C₃ QAE-26- 550C

und 650S, DEAE- 650M und 650C von Tosoh, und QA52™, DE23™, DE32™, DE51™, DE52™, DE53™, Express-Ion™ D und Express-Ion™ Q von Whatman. DEAE wird bevorzugt.

[0072] Falls erwünscht, kann eine Anionenaustauschchromatographiemembran verwendet werden. Zu den handelsüblichen Anionenaustauschermembranen gehören unter anderem Sartobind™ Q von Sartorius, Mustang™ Q von Pall Technologies und die Intercept™ Q-Membran von Millipore.

[0073] In einem Aspekt der Erfindung ist das Anionenaustauschmedium, das im Anionenaustauschschritt verwendet wird, ein Gel mit einem schwachen Anionenaustauscher, z.B. DEAE als funktionelle Gruppe. Eine geeignete Basismatrix können Kügelchen aus vernetztem Dextran sein, und ein Beispiel für ein geeignetes Anionenaustauschmedium ist DEAE Sephadex.

[0074] Das DEAE-haltige Gel wird mit dem Material (z.B. einer Anti-D-Immunglobulin G-haltigen Lösung) in Kontakt gebracht, und die festen und flüssigen Bestandteile werden anschliessend mit geeigneten Mitteln (z.B. durch Filtration oder Zentrifugation) getrennt. Bei der flüssigen Komponente handelt es sich um eine weitere Anti-D-Immunglobulin G-haltige Lösung.

Kationenaustauschschritt nach dem Aluminiumhydroxidgelschritt

[0075] Wie bereits erwähnt, erfolgt die Reinigung von Anti-D-Immunglobulin G in der Regel durch die Durchführung eines oder mehrerer Chromatographieschritte an einer Anti-D-Immunglobulin G enthaltenden Lösung. Die Chromatographie kann aus jeder geeigneten Chromatographie ausgewählt werden, z.B. Immunaффinitätschromatographie, Affinitätschromatographie, hydrophobe Wechselwirkungschromatographie, Ionenaustauschchromatographie, multimodale Chromatographie, Grössenausschlusschromatographie oder Metallchelatchromatographie.

[0076] Das erfindungsgemässe Verfahren kann einen Chromatographieschritt nach dem Aluminiumhydroxidgel-Adsorptionsschritt umfassen. Bei diesem Chromatographieschritt kann ein Ionenaustausch, vorzugsweise ein Kationenaustausch, verwendet werden. Geeignete Kationenaustauschmaterialien und -bedingungen sind vorstehend beschrieben.

[0077] Für den Kationenaustauschschritt kann eine Chromatographiesäule verwendet werden, die mit einem Natriumphosphatpuffer (z.B. 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,5) äquilibriert wird. Das Material (z.B. eine Anti-D-Immunglobulin G-haltige Lösung) wird in dem Äquilibrierungspuffer auf die Säule aufgetragen und mit einem Waschpuffer (z.B. einem 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,45-5,55, Leitfähigkeit 3,0-3,4 mS/cm) gewaschen. Danach folgt ein Elutionsschritt. Für den Elutionsschritt können Natriumphosphatpuffer und Natriumchlorid verwendet werden (z.B. 25 mM Natriumphosphatpuffer + 0,2M Natriumchlorid, pH 5,5).

[0078] Optional wird die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung gefiltert, bevor sie auf die Kationenaustauschchromatographiesäule aufgetragen wird, z.B. mit einem Mikronfilter. Geeignete Grössen sind Filter von 1 µm oder 0,5 µm oder weniger, z.B. ein 0,45, 0,3, 0,2 oder 0,1 µm Filter.

[0079] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rhesus-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat 20 (s); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts mit dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon, (z.B. um ein Eluat zu erhalten); d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts mit dem Eluat aus Schritt c) (z.B. um eine Lösung aus Schritt d) zu erhalten); e) Inkontaktbringen der Lösung (z.B. der Lösung aus Schritt d)) mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen (z.B. um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten); f) Durchführen eines weiteren Schritts der Kationenaustauschchromatographie mit der Lösung aus Schritt e) (z.B. der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung aus Schritt e)).

Virusfiltration

[0080] Das Verfahren kann ferner einen Schritt der Virusfiltration umfassen, z.B. einen oder mehrere Schritte ausgewählt aus einem Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt, einem Kationenaustauschchromatographieschritt, einem Anionenaustauschschritt, einem Aluminiumhydroxidgelschritt oder einem Kationenaustauschchromatographieschritt. In bestimmten Aspekten der Erfindung wird die Lösung, die das Anti-D-Immunglobulin G aus dem vorangegangenen Schritt enthält, einer Filtration unterzogen, um virale Partikel, einschliesslich intakter Viren, und Mikroben, falls vorhanden, zu entfernen. Zur Entfernung von Mikroben und Viren aus einer Lösung, einem Eluat oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung können beispielsweise virale Filtrationsmembranen mit einer Porengrösse von 15-20 nm verwendet werden. Zu den beispielhaften Nanofiltern gehören Planova S20N (Asahi), Viroart HC (Sartorius), Planova 15N (Asahi) und 20N (Asahi). Andere Virenfilter können in diesem Filtrationsschritt verwendet werden und sind dem Fachmann gut bekannt.

[0081] In bestimmten Ausführungsformen wird der Filter nach dem Filtrationsprozess z.B. mit dem im vorangegangenen Schritt verwendeten Elutionspuffer gewaschen, um im Filtergehäuse verbliebenes Anti-D-Immunglobulin G zu entfernen. Der Virenfilter kann z.B. ein Hohlfaserfilter sein, z.B. ein PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Hohlfaserfilter.

[0082] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rhesus-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat 20 (PS 20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts mit dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon, (z.B. um ein Eluat zu erhalten); d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts mit dem Eluat aus Schritt c) (z.B. um eine Lösung aus Schritt d) zu erhalten); e) Inkontaktbringen der Lösung (z.B. der Lösung aus Schritt d)) mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0.10-0.20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen (z.B. um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten); f) Durchführen eines weiteren Kationenaustauschchromatographieschritts mit der Lösung aus Schritt e) (z.B. der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung aus Schritt e)); g) Filtrieren der Lösung aus Schritt f), um die Menge allfälliger vorhandener Viren zu reduzieren.

[0083] Wahlweise umfasst das Verfahren ferner h) einen oder mehrere der folgenden Schritte: (i) Formulieren der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung (z.B. (i) Formulieren der Lösung aus Schritt g) um eine formulierte Lösung zu erhalten und Füllen von Spritzen mit der formulierten Lösung, oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung aus Schritt g)).

Proteaseaktivität der fertigen Zubereitung

[0084] Das erfindungsgemässe Verfahren kann eine Anti-D-Immunglobulin G-Lösung nach den oben beschriebenen Schritten liefern. Wie vorstehend beschrieben ist das Niveau der Proteaseaktivität in jedem auf den Aluminiumhydroxidgel-Schritt folgenden Schritt im Vergleich zum Niveau der Proteaseaktivität vor dem Aluminiumhydroxidgel-Schritt reduziert.

[0085] Das erfindungsgemässe Verfahren kann eine Anti-D-Immunglobulin G-Lösung bereitstellen, die eine Proteaseaktivität von weniger als 50 nkat/l, insbesondere weniger als 40, 30, 20, 15 nkat/l und/oder eine Kallikrein-ähnliche Aktivität von weniger als 40 ng/ml, insbesondere weniger als 30, 30, 20, 15 ng/ml aufweist. Typischerweise beträgt die Proteaseaktivität weniger als 20 nkat/l und/oder die Kallikrein-ähnliche Aktivität weniger als 20 ng/ml. Diese Werte können z.B. mit Hilfe der chromogenen Substrattests, z.B. wie oben beschrieben, bestimmt werden.

Menge an Anti-D-Immunglobulin G in der fertigen Zubereitung

[0086] Das erfindungsgemässe Verfahren kann nach der Reinigung des behandelten Plasmas oder einer Fraktion davon eine Lösung bereitstellen, die 1-5g/L (z.B. 1,5-5g/L, 2-4g/L) Immunglobulin G und/oder 50-200 µg/ml (z.B. 75-175 µg/ml, 100-150 µg/ml) Anti-D-Immunglobulin G enthält. Üblicherweise beträgt die Menge an Immunglobulin G 1-2g/L und/oder die Menge an Anti-D-Immunglobulin G 100-150 µg/ml.

Pharmazeutische Zusammensetzungen und Verfahren

[0087] Pharmazeutische Zusammensetzungen der Erfindung können für die Lagerung als Lösung hergestellt werden, indem die Anti-D-Immunglobulin-G-Lösung mit optionalen pharmazeutisch akzeptablen Trägern, Hilfsstoffen oder Stabilisatoren gemischt wird, die üblicherweise im Stand der Technik verwendet werden (die hier alle als „Träger“ bezeichnet werden), d.h. Puffermittel, Stabilisatoren, Konservierungsmittel, Isotonisierungsmittel, nichtionische Detergenzien, Antioxidantien und andere verschiedene Zusatzstoffe (siehe Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Edition Osol 1980). Diese Zusatzstoffe müssen in den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen für die Empfänger ungiftig sein. Beispielsweise können der Formulierung Albumin und/oder eine Aminosäure wie Glycin zugesetzt werden. Die Zusammensetzungen können in verschiedenen Formen hergestellt werden. So können die Zusammensetzungen beispielsweise als Injektionsmittel hergestellt werden.

[0088] Die pharmazeutische Zusammensetzung ist in der Regel steril. Sie ist vorzugsweise pyrogenfrei.

[0089] In vielen Ausführungsformen ist die Zusammensetzung gepuffert, z.B. bei einem pH-Wert zwischen 5 und 6, im Allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,15 bis 5,25.

[0090] Die Erfindung stellt auch eine Abgabevorrichtung bereit, die eine pharmazeutische Zusammensetzung der Erfindung enthält. Die Vorrichtung kann zum Beispiel eine Spritze sein.

[0091] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rhesus-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat 20 (PS 20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts mit dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon (z.B. um ein Eluat zu erhalten); d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts mit dem Eluat aus Schritt c), (z.B. um eine Lösung aus Schritt d) zu erhalten); e) Inkontaktbringen der Lösung (z.B. der Lösung aus Schritt d)) mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0.10-0.20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen (z.B. um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten); f) Durchführen eines weiteren Schritts der Kationenaustauschchromatographie

mit der Lösung aus Schritt e) (z.B. der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung aus Schritt e)); g) Filtrieren der Lösung aus Schritt f), um die Menge an vorhandenem Virus zu reduzieren; h) einen oder mehrere der folgenden Schritte: (i) Formulieren der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung (z.B. (i) Formulieren der Lösung aus Schritt g) um eine formulierte Lösung zu erhalten und Befüllen von Spritzen mit der formulierten Lösung, oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung aus Schritt g)).

[0092] Einmal formuliert, können die erfindungsgemässen Zusammensetzungen direkt einem Patienten verabreicht werden. Bei den zu behandelnden Patienten kann es sich um Tiere handeln; insbesondere können auch menschliche Patienten behandelt werden.

Allgemein

[0093] Der Begriff „umfassend“ umfasst sowohl „einschliessend“ als auch „bestehend“, z.B. kann eine Zusammensetzung „umfassend“ X ausschliesslich aus X bestehen oder etwas Zusätzliches enthalten, z.B. X + Y.

[0094] Der Begriff „ungefähr“ bedeutet in Bezug auf einen Zahlenwert x beispielsweise $x \pm 10\%$.

[0095] Das Wort „im Wesentlichen“ schliesst „vollständig“ nicht aus, d.h. eine Zusammensetzung, die „im Wesentlichen“ frei von Y ist, kann auch vollständig frei von Y sein. Erforderlichenfalls kann das Wort „im Wesentlichen“ in der Definition der Erfindung weggelassen werden.

[0096] Wenn die Erfindung ein Verfahren mit mehreren aufeinanderfolgenden Schritten vorsieht, werden die Schritte in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt, d.h. in numerischer oder alphabetischer Reihenfolge. Der Fachmann wird jedoch verstehen, dass die Reihenfolge der Schritte geändert werden kann, und damit immer noch nützliche Ergebnisse erzielt werden können. Die Erfindung kann auch ein Verfahren vorsehen, das weniger als die Gesamtzahl der Schritte umfasst.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0097]

Abbildung 1 zeigt einen Überblick über das Verfahren zur Herstellung von Anti-D-Immunglobulin

Abbildung 2 zeigt den Aufbau eines Experiments zur Optimierung des Abbaus der proteolytischen Aktivität während der Aluminiumhydroxidgelbehandlung.

Abbildung 3 zeigt die proteolytische und Kallikrein-ähnliche Aktivität von zwei Prozesszwischenprodukten, die als 1.11 (das Aluminiumhydroxidgel-Filtrat) und 1.14 (die formulierte Bulkware) bezeichnet werden.

Abbildung 4 zeigt die Anti-D-Rückgewinnung im Laufe des Aluminiumhydroxidgel-Schrittes und des gesamten Prozesses.

WEGE ZUR AUSFÜHRUNG DER ERFINDUNG

Beispiel 1

Prüfung auf Verunreinigungen im Downscale-Protokoll

[0098] Es wurde ein Downscale-Protokoll für das Verfahren zur Herstellung von Anti-D unter Verwendung von Triton X-100 (T100) entwickelt, um dieses Verfahren mit potenziellen neuen Verfahren zu vergleichen und weitere neue Parameter zu testen. Das Downscale-Protokoll wurde zunächst validiert, indem die Gehalte verschiedener Komponenten, einschliesslich Anti-D, IgG und IgA, in verschiedenen Phasen des Prozesses mit den Gehalten der einzelnen Komponenten gemäss den historischen Daten aus Produktionschargen verglichen wurden. Nach der Validierung wurde das Downscale-Protokoll dann verwendet, um Polysorbate 29 (PS 20) als geeignetes alternatives Detergens zu T100 im Lösungsmittel-Detergens-Schritt zu testen und um geeignete Bedingungen für einen Lösungsmittel-Detergens-Schritt mit PS 20 zu ermitteln.

[0099] Eines der Ergebnisse dieser Analyse, bei der Komponenten im Ausgangsmaterial des Downscale-Protokolls (kryoarmes Plasma), im Feed für den ersten Kationenaustausch (vor der Verdünnung), im DEAE-Filtrat, im Aluminiumhydroxidgel-Filtrat und in der formulierten Bulkware nachgewiesen wurden, war die Identifizierung der proteolytischen Aktivität als Qualitätsmerkmal. Bestimmte andere Plasmakomponenten wiesen unmittelbar nach dem Lösungsmittel-Detergens-Schritt erhöhte Werte auf, die jedoch bis zur Herstellung der Bulkware wieder auf akzeptable Werte zurückgingen. Es war daher wünschenswert, die proteolytische Aktivität und die Kallikrein-ähnliche Aktivität weiter zu reduzieren, die beide nach einer Behandlung mit PS 20 als Lösungsmittel-Detergens erhöht waren.

[0100] Die proteolytische Aktivität wurde mit dem chromogenen Substrat S-2288 (H-D-Ile-Pro-Arg-pNA *2HCl, erhältlich z. B. bei Diapharma) gemessen, wobei die Aktivität durch die Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA) bestimmt wurde. Die Bildung von pNA kann spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt werden, z.B. über einen geeigneten Zeitraum. Geeignete Assays können auf den in P. Friberger, Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 1982, 162, 1-298 beschriebenen Assays basieren.

[0101] Die Kallikrein-ähnliche Aktivität wurde mit dem chromogenen Substrat S-2302 (H-D-Pro-Phe-Arg-pNA *2HCl, erhältlich z. B. bei Diapharma) gemessen, wobei die Spaltung wiederum durch die Freisetzung von pNA bestimmt wurde. Die Bildung von pNA kann spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt werden, z.B. über einen geeigneten Zeitraum.

[0102] Die Bildungsrate von pNA kann mit geeigneten Referenzen verglichen werden, die bekannte Mengen an proteolytischer und/oder Kallikrein-ähnlicher Aktivität aufweisen.

Beispiel 2

Senkung des pH-Wertes während der Aluminiumhydroxidgelbehandlung vermindert die proteolytische Aktivität

Zusammenfassung

[0103] Da das Downscale-Verfahren mit PS 20 zu leicht erhöhten Werten der proteolytischen Aktivität führte (Proteaseaktivität, gemessen durch Freisetzung von pNA aus dem chromogenen Substrat S-2288, und Kallikrein-ähnliche Aktivität, gemessen durch Freisetzung von pNA aus dem chromogenen Substrat S-2302), wurde im Vergleich zu dem Verfahren, bei dem T100 im Lösungsmittel-Detergens-Schritt des Prozesses verwendet wurde, die Fähigkeit des Aluminiumhydroxidgel-Behandlungsschritts untersucht, diese erhöhten Werte zu mildern. In dieser Studie wurden die Menge des Aluminiumhydroxidgels, der pH-Wert und die Leitfähigkeit variiert und für die Verringerung der proteolytischen Aktivität ohne Anti-D-Verlust optimiert (Abb. 2).

Methode und Ergebnisse

[0104] In einem Vergleichsverfahren wurden die folgenden Werte verwendet: $\text{Al}(\text{OH})_3$ Lösungsmenge = 0,0048, pH = 5,5 und Leitfähigkeit = 3,2. Diese Lösungsmenge wird in Abhängigkeit vom Gewicht und dem Proteingehalt des DEAE-Filtrats berechnet und ergibt einen Wert von 0,1324 g/g Protein (Menge der 2%-igen Alhydrogel-Lösung [g] = Gewicht DEAE-Filtrat [g] x OD280 [AU] x 0,0048). In diesem Experiment wurden Parameter in den folgenden Bereichen getestet: 2% $\text{Al}(\text{OH})_3$ Lösung = Koeffizient von 0,0048 bis 0,0096 (entsprechend 0,1324 und 0,2648 g/g Protein), pH = von 5 bis 6 und Leitfähigkeit = von 2,8 bis 3,6 mS/cm.

[0105] Wie in Abbildung 2 dargestellt, wurden neun Bedingungen für die Aluminiumhydroxidgel-Adsorption parallel eingestellt. Als Ausgangsmaterial diente das Filtrat aus dem DEAE-Adsorptionsschritt des P-20-Downscale-Prozesses. Dieses wurde 30 Minuten lang mit einer $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Lösung in Kontakt gebracht, woraufhin Celite® 574 hinzugefügt wurde. Nach weiteren 5 Minuten wurde Celite® 545 für 15 Minuten zugegeben (insgesamt 50 Minuten). Nach der Trennung der festen und flüssigen Bestandteile wurden die proteolytische Aktivität und die Anti-D-Rückgewinnung gemessen. Die proteolytische Aktivität (linker Kasten in Abb. 2, nkat/L) wurde wie oben beschrieben gemessen. Die Anti-D-Rückgewinnung (rechter Kasten in Abb. 2, %) wurde mit einer durchflusszytometrischen Methode gemessen. Die Methode ist eine von drei nach Ph. Eur. zugelassenen Methoden zur quantitativen Bestimmung von Anti-D-Immunglobulinen, bei der die spezifische Bindung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers an zellgebundenes Anti-D-Immunglobulin G bestimmt und mit einem Referenzstandard verglichen wird (siehe European Pharmacopoeia 6.4, Kapitel 2.7.13: „Assay of human anti-D immunoglobulin“, 01/2008:20713). Die erhaltenen Werte wurden aufgetragen. Wie erwartet, führte eine erhöhte Menge an $\text{Al}(\text{OH})_3$ zu einer besseren Abreicherung der proteolytischen Aktivität, allerdings auch zu einem unerwünschten Verlust von Anti-D. Wie ebenfalls erwartet, führte eine verringerte Leitfähigkeit zu einem besseren Abbau der proteolytischen Aktivität, aber auch zu einem unerwünschten Verlust von Anti-D. Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, dass eine Senkung des pH-Wertes zu einer besseren Abnahme der proteolytischen Aktivität ohne Verlust von Anti-D führte.

[0106] Anschliessend wurde im Downscale-Verfahren Bulkware bei gesenktem pH-Wert während der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Adsorption hergestellt. Die proteolytische Aktivität und die Kallikrein-ähnliche Aktivität wurden in zwei Zwischenprodukten gemessen, die als 1.11 (das Aluminiumhydroxidgel-Filtrat) und 1.14 (die formulierte Bulkware) bezeichnet werden.

[0107] Die Verwendung eines niedrigeren pH-Werts im Aluminiumhydroxidgel-Schritt führte zu einer effizienteren Verringerung der proteolytischen Aktivität und der Kallikrein-ähnlichen Aktivität in diesen Prozess-Zwischenprodukten.

[0108] Abbildung 3 zeigt, dass die proteolytische und Kallikrein-ähnliche Aktivität der Prozesszwischenprodukte 1.11 und 1.14 abnahm, als Downscale-Bulkware bei unterschiedlichen pH-Werten bei der Aluminiumhydroxidgelbehandlung hergestellt wurden. Es wurde bestätigt, dass ein niedrigerer pH-Wert zu einer Verringerung der proteolytischen und Kallikrein-ähnlichen Aktivität dieser Prozesszwischenprodukte führte. Bei einem pH-Wert von 4,8 wurde die proteolytische Aktivität 2-3 mal effizienter verringert als bei einem pH-Wert von 5,5. Diese zusätzliche Verringerung ist interessant, weil sie zeigt, dass die Proteaseaktivität unter den von den Erfindern ermittelten Bedingungen in grösserem Umfang entfernt werden kann. Bei einem pH-Wert von 4,8 war die Anti-D-Rückgewinnung sowohl während des gesamten Prozesses als auch während des Aluminiumhydroxidgel-Schritts optimal (Abb. 4).

Schlussfolgerung

[0109] Die Rückgewinnung von Anti-D war sowohl während des gesamten Prozesses als auch während des Aluminiumhydroxidgel-Schrittes bei pH 4,8 optimal. Das Ziel, die proteolytische Aktivität im PS 20 Downscale-Verfahren auf ein ähn-

liches Niveau wie im T100-Verfahren ohne Anti-D-Verlust zu reduzieren, wurde also durch die Durchführung der Aluminiumhydroxidgelbehandlung bei pH 4,8 erreicht.

Beispiel 3

Scale-up-Läufe zur Bewertung von Faktoren wie produktbezogenen Verunreinigungen

[0110] Das Verfahren wurde dann hochskaliert, um genügend Anti-D für umfassende Analysen und Stabilitätsstudien zu erzeugen. Bei den Scale-up-Läufen wurden ca. 400 ml der endgültigen Bulkware von zwei PS 20-Chargen für die Analyse erzeugt (bezeichnet als A und B), die mit einem T100-Lauf (C) verglichen wurden. Zwischenprodukte und Bulkware wurden in verschiedenen Stadien auf das Vorhandensein verschiedener produktbezogener Verunreinigungen untersucht, u. a.: Ausgangsmaterial des Scale-up-Laufs (kryoarmes Plasma), das gefilterte Gemisch nach dem ersten Solvent-Detergent-Behandlungsschritt (als FT3 bezeichnet), das CM1-Eluat (als CM1 bezeichnet), das DEAE-Filtrat (als DEAE bezeichnet), das Aluminiumhydroxidgel-Filtrat (als Al(OH)₃ bezeichnet) und die formulierte Bulkware. Die erhaltenen Werte wurden mit bekannten Werten aus dem aktuellen Herstellungsprozess verglichen.

Kallikrein-ähnliche Aktivität

[0111] Die Kallikrein-ähnliche Aktivität wurde mit einem chromogenen Assay gemessen. Die Kallikrein-ähnliche Aktivität ist nach der Phasentrennung in FT3 erhöht (Tabelle 1), mit höheren Werten für das PS 20-basierte Verfahren. Bei diesem Verfahren überschreiten die Kallikrein-ähnlichen Aktivitäten in den Stadien CM1 und DEAE die empfohlenen 3-σ-Grenzwerte, werden jedoch während der optimierten Al(OH)₃-Behandlung auf Werte unterhalb der in MFG beobachteten durchschnittlichen Aktivität reduziert. Die Kallikrein-ähnliche Aktivität im Aluminiumhydroxid-Gelfiltrat (Al(OH)₃) und in der Bulkware ist im neuen Verfahren höher als im Referenzverfahren, aber vergleichbar mit den während der Entwicklung durchgeführten Downscale-Experimenten, was auf eine robuste Abreicherung von Kallikrein hinweist, unabhängig vom Herstellungsmassstab. Darüber hinaus sind die vom Referenzverfahren abgeleiteten Werte ungewöhnlich niedrig im Vergleich zu der Kallikrein-ähnlichen Aktivität, die in den Kontrollexperimenten beobachtet wurde, die während der Entwicklung des Referenzprozesses durchgeführt wurden. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Proteaseaktivitäten im Labormassstab im Allgemeinen niedriger sind als im MFG-Massstab, was auf Temperaturunterschiede im Herstellungsprozess in der Phasentrennungsphase zurückzuführen sein könnte. Folglich werden die Proteaseaktivitäten in den nachgelagerten Prozessschritten fortgepflanzt, was zu erhöhten Aktivitäten im MFG im Vergleich zu den bei Zieltemperatur durchgeführten Experimenten im Labormassstab führt. Betrachtet man die Kallikrein-ähnlichen Aktivitäten normalisiert auf den Proteingehalt (ng/mg Protein, nicht in der Tabelle aufgeführt), so wird kein relevanter Unterschied zu den absoluten Werten festgestellt.

Tabelle 1: Kallikrein-ähnliche Aktivität aus Scale-up-Läufen

[0112]

		Derzeitiges Verfahren		Neues Verfahren	
Kallikrein-ähnliche Aktivität [ng/mL]	Empfohlener 3-σ-Grenzwert	MFG	C	A	B
Cryo SuP 1-2	≤ 133	n/a	n/a	29	38
Cryo Filtrat 1-4	≤ 133	72±26	24	n/a	n/a
FT3	n/a	n/a	707	4497	6339
CM1	≤ 1813	1186±97	877	1907	1931
DEAE	≤ 67	55±6	32	108	94
Al(OH) ₃	≤ 28	24±2	8	17	19
Bulkware	≤ 41	30±5	3	9	10

Proteaseaktivität bei optimalem pH-Wert für Serinproteasen

[0113] Die Proteaseaktivität wurde mit dem oben beschriebenen chromogenen Assay gemessen. Es wurden die gleichen Tendenzen wie bei der Kallikrein-ähnlichen Aktivität beobachtet, obwohl es zwischen den beiden Versuchen im Stadium CM1 des neuen Verfahrens Schwankungen gibt (Tabelle 2). Dieser Test wurde bei optimalem pH-Wert durchgeführt.

Tabelle 2: Proteaseaktivität bei optimalem pH-Wert für Serinproteasen aus Scale-up-Läufen**[0114]**

		Derzeitiges Verfahren		Neues Verfahren	
Kallikrein-ähnliche Aktivität [ng/mL]	Empfohlener 3-σ-Grenzwert	MFG	C	A	B
Cryo SuP 1-2	≤ 476	n/a	n/a	218	275
Cryo Filtrat 1-4	≤ 1724	249±103	245	n/a	n/a
FT3	n/a	n/a	2443	5610	5621
CM1	≤ 4883	3293±327	4370	6385	3411
DEAE	≤ 264	172±20	126	411	455
Al(OH) ₃	≤ 34	27±20	8	9	22
Bulkware	≤ 54	41±5	5	17	14

Beispiel 4**Umriss des neuen Produktionsverfahrens**

[0115] Ausgangsmaterial ist das Plasma von Rhesus-negativen Personen, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden. Das durch Plasmapherese gewonnene Plasma wird einer Kryofraktionierung unterzogen.

Lösungsmittel-Detergens-Behandlung unter Verwendung von PS 20

[0116] Das kryoarme Plasma wird mit 1,75% PS 20 und 1% Tri(n-butyl)phosphat mindestens eine Stunde lang bei 30 °C unter Rühren behandelt. Die Mischung wird durch einen 0,45-µm-Filter filtriert. Die zweite Stufe der Lösungsmittel-Detergens-Behandlung umfasst eine Inkubation zur Virusinaktivierung von ≥240 Minuten bei 30 °C unter Mischen. Die virusinaktivierte Lösung wird zur Lipidphasentrennung für ≥13 Stunden bei ≥37 °C stehen gelassen. Die lipidarmer Lösung, die das IgG enthält, wird für die weitere Verarbeitung abgetrennt.

Kationenaustauschchromatographie („CM1“)

[0117] Das Material, das aus der Lösungsmittel-Detergens-Behandlung erhalten wird, wird mit Puffer verdünnt und durch einen Mikrometer-Filter gefiltert, bevor es auf einen schwachen Kationenaustauscher (Carboxymethyl (CM)-Harz) geladen wird.

[0118] Die Säule wird mit 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen, und die Anti-D enthaltende IgG-Fraktion wird mit einer Lösung eluiert, die 25 mM Natriumphosphatpuffer und 0,2 M Natriumchlorid, pH 7,5, enthält.

Anionenaustauschchromatographie („DEAE“)

[0119] Das Eluat aus dem CM-Schritt wird mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 3,00 - 3,40 mS/cm, vorzugsweise 3,3 mS/cm, verdünnt, der pH-Wert wird mit NaOH auf 7,5 eingestellt und durch DEAE-Sephadex® A50-Trockenharz (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geleitet. Die ungebundene Anti-D-IgG-Fraktion wird durch ein Polypropylensieb filtriert und der pH-Wert mit 0,2 M HCl auf 4,8 eingestellt.

Alhydrogel-Adsorption

[0120] Das DEAE-Filtrat wird mit 0,13 g Al(OH)₃ Gel je g Protein behandelt und 30 Minuten lang bei 20-25 °C gerührt. Danach wird Celite® 574 (Celite® 574 [g] = Gewicht DEAE-Filtrat [g] x 0,00025) zugegeben und 5 Minuten lang gerührt, danach Celite® 545 (Celite® 545 [g] = Gewicht DEAE-Filtrat [g] x 0,00025) und 15 Minuten lang gerührt. Verschiedene Filterhilfsmittel wurden auf die Entfernung von Alhydrogel getestet, z.B. Perlite J 100, Celite® 574, Celite® 545, Celite® 503 und Diacel®150. Es wurde festgestellt, dass eine Mischung aus Celite® 574 und Celite® 545 die besten Ergebnisse hinsichtlich Durchflussrate, Rückhaltung von Alhydrogel und Rückgewinnung von Anti-D-IgG lieferte. Die ungebundene Anti-D-IgG-Fraktion wird durch ein Polypropylennetz gefiltert, um feste und flüssige Bestandteile zu trennen.

[0121] Bei einer alternativen Methode wird ein Filterkuchen auf einem Polypropylennetz gebildet, wobei die Hälfte der benötigten Celite®-Menge in einem kleinen Volumen des entsprechenden Puffers verwendet wird. Die verbleibende Menge Celite® wird dann unmittelbar vor dem Filtrieren in die Immunglobulin-Alhydrogel-Suspension gemischt.

Kationenaustauschchromatographie („CM2“)

[0122] Um die Anti-D-Konzentration zu erhöhen, wird das DEAE-Filtrat ein zweites Mal an ein CM-Harz gebunden. Die Anti-D-haltige IgG-Fraktion wird mit 25 mM Natriumphosphatpuffer + 0,2 M Natriumchlorid, pH 5,5, eluiert.

Virusfiltration

[0123] Dies kann am Eluat mit einem Nanofilter, wie dem PLANOVA Nanofilter 15N, durchgeführt werden.

Beispiel 5**Läufe im Produktionsmassstab zur Bewertung von Faktoren wie produktbezogenen proteolytischen Verunreinigungen im Anti-D-Endprodukt**

[0124] Drei Durchläufe im Produktionsmassstab (A-C) wurden unter den in Beispiel 4 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, mit der Ausnahme, dass im „DEAE“-Schritt das Eluat aus dem „CM“-Schritt mit Wasser auf eine Leitfähigkeit von 2,95 mS/cm verdünnt wird.

[0125] Nach dem Alhydrogelschritt entsprachen alle proteolytischen Werte (Kallikrein-ähnliche Aktivität siehe Tabelle 3 und proteolytische Aktivität siehe Tabelle 4) den Anforderungen an das finale Anti-D-Produkt. Dies bestätigt, dass, obwohl das P20-Verfahren die proteolytische Belastung erhöht, der Alhydrogelschritt ausreicht, um die proteolytische Aktivität auf die Anforderungen des Endprodukts zu reduzieren.

Tabelle 3: Kallikrein-ähnliche Aktivität aus Durchläufen im Produktionsmassstab**[0126]**

Kallikrein-ähnliche Aktivität [ng/mL]	Neues Verfahren		
	A	B	C
DEAE	70	60	60
Al(OH) ₃	19	17	18
Bulkware	10	9	9

Tabelle 4: Proteaseaktivität bei optimalem pH-Wert für Serinproteasen aus Durchläufen im Produktionsmassstab**[0127]**

Proteolytische Aktivität [nkat/L]	Neues Verfahren		
	A	B	C
DEAE	657	456	622
Al(OH) ₃	14	17	15
Bulkware	12	11	11

Beispiel 6**Stabilitätsstudie zur Bewertung der Qualität des Anti-D-Endprodukts aus dem PS20-Prozess**

[0128] Verschiedene Zubereitungen von Anti-D 300 µg-Endprodukt aus 3 Chargen, die im Produktionsmassstab unter Verwendung des Polysorbat 20-Herstellungsverfahrens hergestellt wurden, wurden über einen Zeitraum von mehreren Monaten unter Langzeitlagerungsbedingungen untersucht, um die Auswirkungen der Verwendung von PS20 im Herstellungsprozess zu ermitteln. Die Stabilitätsstudie wurde nach der visuellen Inspektion der Spritzen begonnen, um die Verwendung von fehlerhaftem Produkt oder Primärverpackungsmaterial im Rahmen des Stabilitätsprogramms zu verhindern. Kurz gesagt, wurden die Proben nach dem in Beispiel 5 beschriebenen Verfahren während der Herstellung des Anti-D 300 µg Produkts gewonnen. Jede Charge wurde zu Beginn der Studie 72 Stunden lang bei 25 °C gelagert, um die Abfüllung, die Sichtprüfung, die Verpackung und die Etikettierung zu ermöglichen, und dann in 5 °C ± 3 °C überführt und bis zu 36 Monate lang gelagert.

[0129] Die in den aktuellen Produktspezifikationen aufgeführten Prüfparameter, einschliesslich Aussehen, Gesamtprotein, Glycin, Albumin, Natrium, Aluminium, pH-Wert, ACA, PKA, Sterilität und Anti-D-Antikörperkonzentration sowie der zusätzliche Prüfparameter „Dichte“ wurden auf ihre Relevanz für den Nachweis der Stabilität hin bewertet.

[0130] Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach 0-3 Monaten Lagerung bei $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ keine Auswirkungen auf die Qualität des Anti-D-Arzneimittels festzustellen waren.

AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0131]

1. Verfahren zur Verringerung der Proteaseaktivität in einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, umfassend die folgenden Schritte:
 - i) Bereitstellen einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält,
 - ii) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90; und
 - iii) Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen.
2. Verfahren nach Ausführungsform 1, bei dem das Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein, vorzugsweise in einer Menge von etwa 0,13 g/g Protein, zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Ausführungsform 1 oder 2, wobei Schritt (ii) in einer Lösung mit einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird, vorzugsweise wobei Schritt (ii) in einer Lösung durchgeführt wird, die eine Leitfähigkeit von etwa 3,2 mS/cm aufweist.
4. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei das in (ii) erzeugte Gemisch mit dem Aluminiumhydroxidgel für einen Zeitraum von 15 Minuten bis 2 Stunden in Kontakt gebracht wird.
5. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die resultierende Lösung (a) eine verringerte Proteaseaktivität und mindestens die gleiche Menge an Anti-D im Vergleich zu demselben Verfahren aufweist, bei dem der pH-Wert in Schritt (ii) pH 5,5 beträgt, und/oder (b) eine verringerte Proteaseaktivität und eine erhöhte Menge an Anti-D im Vergleich zu demselben Verfahren, bei dem der pH-Wert in Schritt (ii) pH 5,5 beträgt.
6. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei ein Anionenaustauschschritt vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel durchgeführt wird, wobei der Anionenaustauschschritt insbesondere ein DEAE-Schritt ist.
7. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, bei dem vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Kationenaustauschschritt durchgeführt wird.
8. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt durchgeführt wird, wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt vorzugsweise unter Verwendung von Tri-(n-Butyl)-phosphat (TnBP) und Polysorbat-20 (PS-20) durchgeführt wird, weiter bevorzugt wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt unter Verwendung von 1% TnBP (w/w) und 1,75% PS-20 (w/w) durchgeführt wird.
9. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen:
 - (a) wobei ein Kationenaustauschchromatographieschritt mit der Lösung nach Schritt (iii) durchgeführt wird; und/oder
 - (b) wobei nach Schritt (iii) ein Virusfiltrationsschritt mit der Lösung durchgeführt wird; und/oder
 - (c) ferner umfassend einen oder mehrere der folgenden Schritte: (i) Formulieren der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung.
10. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon ist.
11. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern ist, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon, wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt unter Verwendung von 1% TnBP (w/w) und 1,75% PS-20 (w/w) durchgeführt wird, und wobei Schritt (ii) durch Inkontaktbringen der Lösung mit Alumi-

umhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird.

12. Verfahren nach einer der vorhergehenden Ausführungsformen umfassend die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rhesus-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TnBP) und Polysorbat-20 (PS-20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts mit dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon; d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts mit dem Eluat aus Schritt (b); d) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0.10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen; e) Durchführen eines weiteren Schritts der Kationenaustauschchromatographie mit der Lösung aus d); f) Filtrieren der Lösung aus e), um die Menge an vorhandenem Virus zu reduzieren; und g) einen oder mehrere der folgenden Schritte: (i) Formulieren der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung.
13. Verfahren zur Herstellung eines Anti-D-Immunglobulin G-Präparats aus Plasma aus Rhesus-negativem Blut von Rhesusfaktor D-sensibilisierten Spendern, einer Plasmafraktion davon, wobei das Verfahren umfasst:
 - i) Bereitstellen einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält,
 - ii) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90; und
 - iii) Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen.
14. Verfahren nach Ausführungsform 13, wobei:
 - (a) das Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein zugesetzt wird, wobei das Aluminiumhydroxidgel vorzugsweise in einer Menge von etwa 0,13 g/g Protein zugesetzt wird; und/oder
 - (b) Schritt (ii) ist wie in Ausführungsform 3 und/oder Ausführungsform 4 definiert; und/oder
 - (c) wobei die resultierende Lösung:
 - (A) eine verringerte Proteaseaktivität und mindestens die gleiche Menge an Anti-D aufweist; und/oder
 - (B) eine verringerte Proteaseaktivität und eine erhöhte Menge an Anti-D;im Vergleich zu demselben Verfahren, bei dem der pH-Wert in Schritt (ii) pH 5,5 beträgt, aufweist; und/oder
 - (d) wobei ein Anionenaustauschschritt vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel durchgeführt wird, wobei der Anionenaustauschschritt insbesondere ein DEAE-Schritt ist; und/oder
 - (e) wobei ein Kationenaustauschschritt vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel durchgeführt wird; und/oder
 - (f) wobei ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel durchgeführt wird, insbesondere wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt ist wie in Ausführungsform 8 definiert; und/oder
 - (g)
 - (A) ein Kationenaustauschchromatographieschritt mit der Lösung nach Schritt (iii) durchgeführt wird; und /oder
 - (B) ein Virusfiltrationsschritt mit der Lösung nach Schritt (iii) durchgeführt wird; und/oder
 - (C) ferner eines oder mehrere der folgenden umfasst sind:
 - (i) Formulierung der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin; und
 - (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung.

15. Verfahren nach einer der Ausführungsformen 13 bis 14, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern ist, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon.
16. Verfahren nach einer der Ausführungsformen 13 bis 15, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern ist, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon, wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt unter Verwendung von 1% TNBP (w/w) und 1,75% PS 20 (w/w) durchgeführt wird, und wobei Schritt (ii) durch Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird.
17. Verfahren nach einer der Ausführungsformen 13 bis 16, das die folgenden Schritte umfasst: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat 20 (PS 20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts mit dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon; d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts mit dem Eluat aus Schritt (b); e) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen; f) Durchführen eines weiteren Schritts der Kationenaustauschchromatographie mit der Lösung aus d); g) Filtrieren der Lösung aus e), um die vorhandene Virenmenge zu reduzieren; und h) einen oder mehrere der folgenden Schritte: (i) Formulieren der Lösung, insbesondere mit Glycin und/oder Albumin, und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Verringerung der Proteaseaktivität in einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, das Verfahren umfassend die folgenden Schritte:
 - i) Bereitstellen einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält,
 - ii) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90; und
 - iii) Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen, um eine mit Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten;
 wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt durchgeführt wird, wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt vorzugsweise unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat-20 (PS 20) durchgeführt wird, und wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt noch bevorzugter unter Verwendung von 1% TNBP (w/w) und 1,75% PS 20 (w/w) durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein, vorzugsweise in einer Menge von etwa 0,13 g/g Protein, zugesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei Schritt (ii) in einer Lösung mit einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird, vorzugsweise wobei Schritt (ii) in einer Lösung durchgeführt wird, die eine Leitfähigkeit von etwa 3,2 mS/cm aufweist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das in (ii) erzeugte Gemisch mit dem Aluminiumhydroxidgel für einen Zeitraum von 15 Minuten bis 2 Stunden in Kontakt gebracht wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erhaltene Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung (a) eine im Vergleich zu demselben Verfahren, bei dem der pH-Wert in Schritt ii) pH 5,5 ist, verringerte Proteaseaktivität und mindestens die gleiche Menge an Anti-D aufweist und/oder (b) eine im Vergleich zu demselben Verfahren, bei dem der pH-Wert in Schritt ii) pH 5,5 ist, verringerte Proteaseaktivität und eine erhöhte Menge an Anti-D aufweist.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel ein Anionenaustauschschritt durchgeführt wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Anionenaustauschschritt ein DEAE-Schritt ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Anti-D-Immunglobulin G enthaltende Lösung auf 2,90 - 3,40 mS/cm, insbesondere 2,95 mS/cm, verdünnt wird.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Kationenaustauschschritt durchgeführt wird.
10. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche:

- (a) wobei ein Kationenaustauschchromatographieschritt an der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung nach Schritt iii) durchgeführt wird; und/oder
 - (b) wobei ein Virusfiltrationsschritt an der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung nach Schritt (iii) durchgeführt wird; und/oder
 - (c) ferner umfassend: (i) Formulieren der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung, um eine formulierte Lösung zu erhalten, und Befüllen von Spritzen mit der formulierten Lösung; oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung mit Glycin und/oder Albumin formuliert wird.
 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon ist.
 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon ist, vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt unter Verwendung von 1% TNBP (w/w) und 1.75% PS 20 (w/w) durchgeführt wird, und wobei Schritt ii) durch Inkontaktbringen der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird.
 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, das/die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat-20 (PS 20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts an dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon, um ein Eluat zu erhalten; d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts an dem Eluat aus Schritt c), um eine Lösung aus Schritt d) zu erhalten; e) Inkontaktbringen der Lösung aus Schritt d) mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0.10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen, um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung aus Schritt e) zu erhalten; f) Durchführen eines weiteren Kationenaustauschchromatographieschritts an der Lösung aus Schritt e); g) Filtrieren der Lösung aus Schritt f), um die Menge vorhandener Viren zu reduzieren; und h) (i) Formulieren Lösung aus Schritt g) um eine formulierte Lösung zu erhalten, oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung aus Schritt g).
 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei in Schritt h)(i) die Lösung mit Glycin und/oder Albumin formuliert wird.
 16. Verfahren zur Herstellung eines Anti-D-Immunglobulin-G-Präparats aus Plasma von Rhesus-negativem Blut von Rhesusfaktor-D-sensibilisierten Spendern oder einer Plasmafraktion davon, wobei das Verfahren umfasst:
 - i) Bereitstellen einer Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält,
 - ii) Inkontaktbringen der Lösung mit Aluminiumhydroxidgel bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90; und
 - iii) Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen, um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten;
 wobei ein Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel durchgeführt wird, vorzugsweise wobei der Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritt unter Verwendung von 1% TNBP (w/w) und 1,75% PS 20 (w/w) durchgeführt wird.
 17. Das Verfahren nach Anspruch 16, wobei:
 - (a) das Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein zugesetzt wird, wobei das Aluminiumhydroxidgel vorzugsweise in einer Menge von etwa 0,13 g/g Protein zugesetzt wird; und/oder
 - (b) Schritt ii) wie in Anspruch 3 und/oder Anspruch 4 definiert durchgeführt wird; und/oder
 - (c) wobei die resultierende Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung im Vergleich zu demselben Verfahren, bei dem der pH-Wert in Schritt ii) pH 5,5 beträgt:
 - (A) eine verringerte Proteaseaktivität und mindestens die gleiche Menge an Anti-D; und/oder
 - (B) eine verringerte Proteaseaktivität und eine erhöhte Menge an Anti-D; aufweist; und/oder
 - (d) wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel ein Anionenaustauschschritt durchgeführt wird; und/oder
 - (e) wobei vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel ein Kationenaustauschschritt durchgeführt wird; und/oder
 - (f)
 - (A) ein Kationenaustauschchromatographieschritt an der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung nach Schritt iii) durchgeführt wird; und/oder
 - (B) ein Virusfiltrationsschritt an der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung nach Schritt iii) durchgeführt wird; und/oder

- (C) ferner umfassend einen oder mehrere der folgenden Schritte: (i) Formulieren der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung, um eine formulierte Lösung zu erhalten; und (ii) Befüllen von Spritzen mit der Aluminiumhydroxidgel behandelten Lösung oder mit der formulierten Lösung.
18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei in Schritt (d) der Anionenaustauschschritt ein DEAE-Schritt ist.
 19. Verfahren nach Anspruch 17 oder Anspruch 18, wobei in Schritt (f)(C)(i) die Lösung mit Glycin und/oder Albumin formuliert wird.
 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 19, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon ist.
 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die Lösung, die Anti-D-Immunglobulin G enthält, Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die für Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder eine Fraktion davon ist, vor dem Schritt des Inkontaktbringens der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel ein Lösungsmittel-Detergens-Virus-Inaktivierungsschritt unter Verwendung von 1% TNBP (w/w) und 1.75% PS 20 (w/w) durchgeführt wird, und wobei Schritt ii) durch Inkontaktbringen der Lösung mit dem Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm durchgeführt wird.
 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 16 bis 21, umfassend die folgenden Schritte: a) Bereitstellen von Plasma von menschlichen Rh-negativen Spendern, die gegenüber Rhesusfaktor D sensibilisiert wurden, oder einer Fraktion davon, das/die Anti-D-Immunglobulin G enthält, b) Durchführen eines Lösungsmittel-Detergens-Virusinaktivierungsschritts an dem Plasma oder der Fraktion davon unter Verwendung von Tri(n-butyl)phosphat (TNBP) und Polysorbat-20 (PS 20); c) Durchführen eines Kationenaustauschchromatographieschritts an dem mit Lösungsmittel-Detergens behandelten Plasma oder einer Fraktion davon, um ein Eluat zu erhalten; d) Durchführen eines Anionenaustauschschritts an dem Eluat aus Schritt c), um eine Lösung aus Schritt d) zu erhalten; e) Inkontaktbringen der Lösung aus Schritt d) mit Aluminiumhydroxidgel in einer Menge von 0,10-0,20 g/g Protein bei einem pH-Wert von 4,70 bis 4,90 und einer Leitfähigkeit von 3,0 bis 3,4 mS/cm; und Abtrennen der Lösung von den festen Bestandteilen, um eine Aluminiumhydroxidgel behandelte Lösung zu erhalten; f) Durchführen eines weiteren Kationenaustauschchromatographieschritts mit der Lösung aus Schritt e); g) Filtrieren der Lösung aus Schritt f), um die Menge vorhandener Viren zu reduzieren; und h) (i) Formulieren der Lösung aus Schritt g), um eine formulierte Lösung zu erhalten, oder (ii) Befüllen von Spritzen mit der Lösung aus Schritt g).
 23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei in Schritt (h) (i) die Lösung mit Glycin und/oder Albumin formuliert wird.

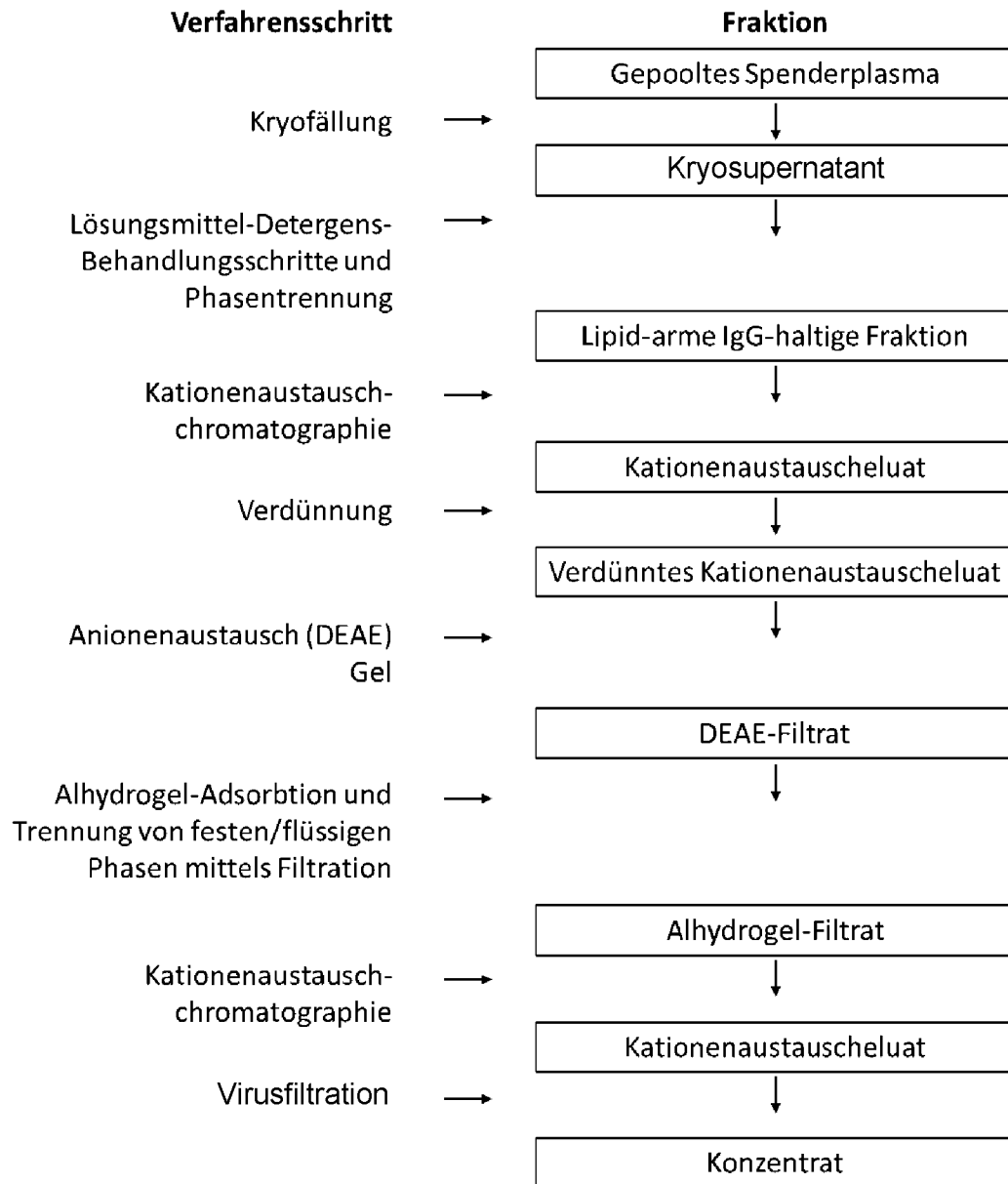


Abbildung 1

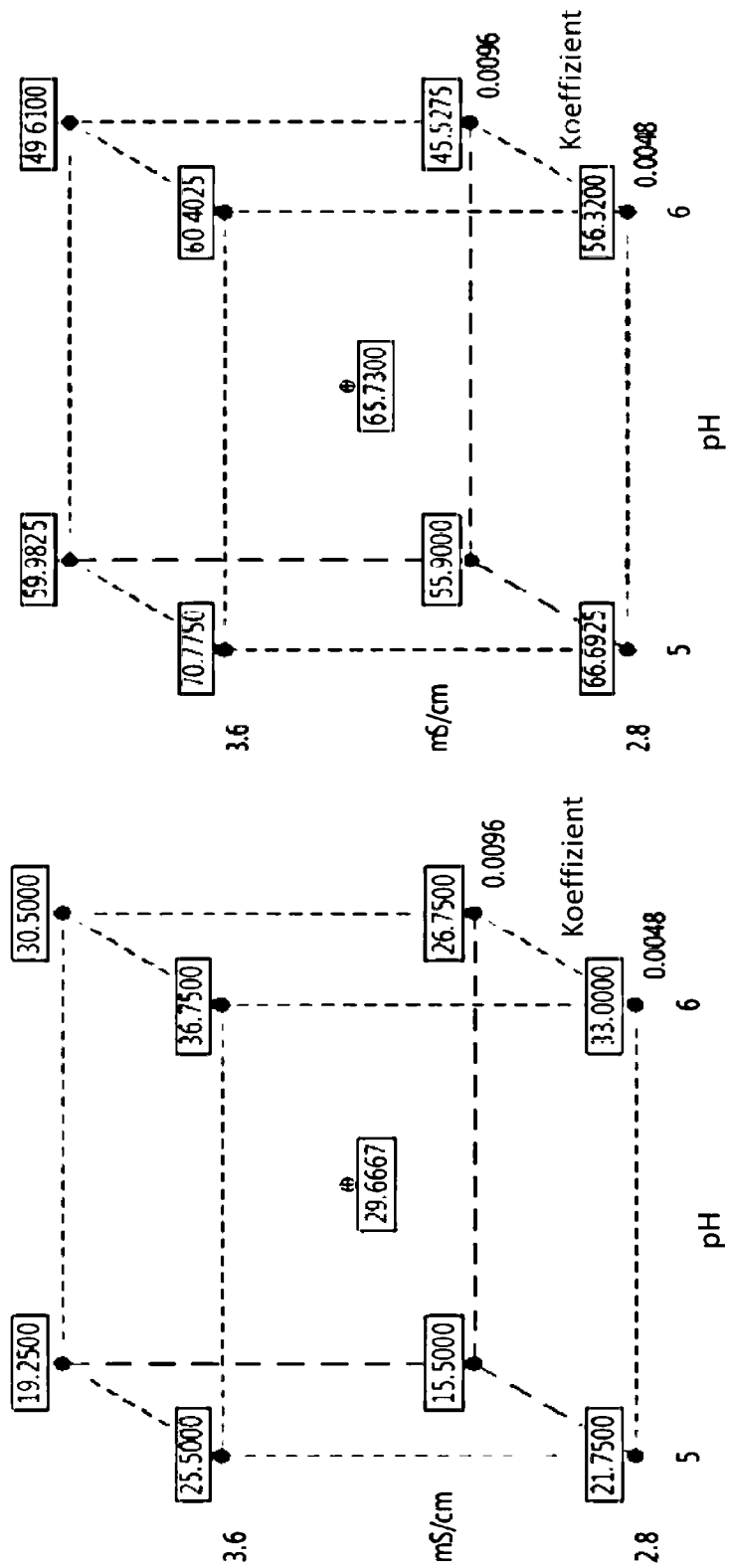


Abbildung 2

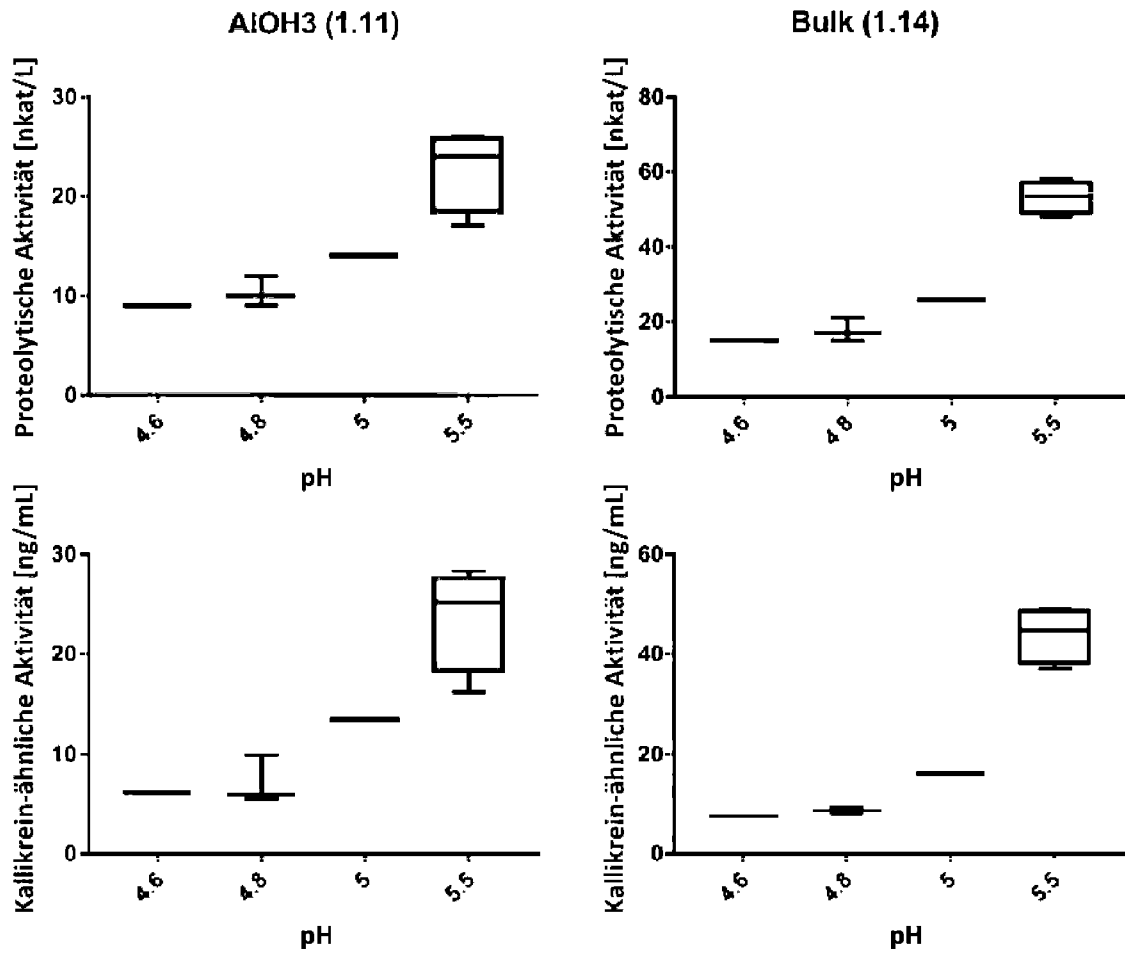


Abbildung 3

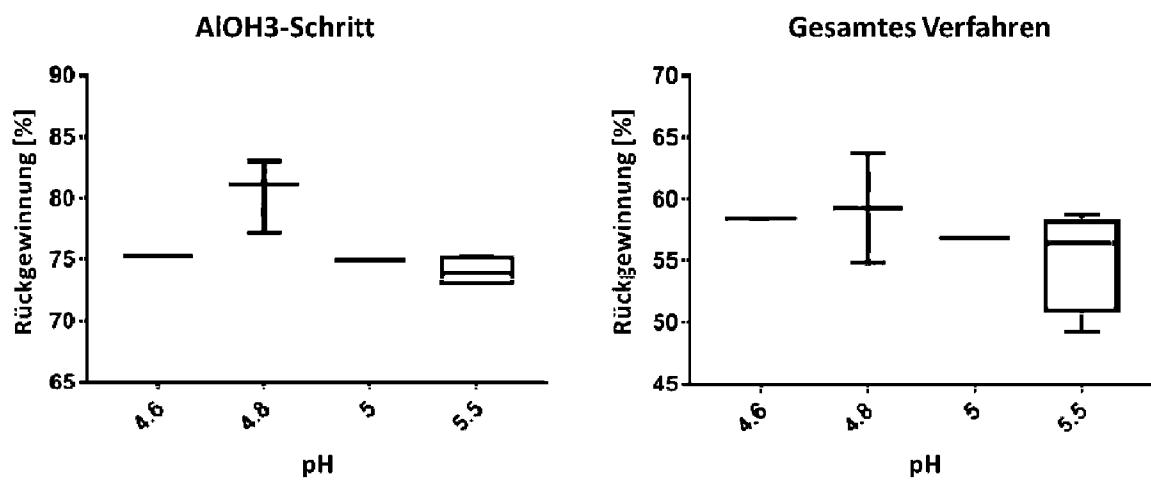


Abbildung 4