



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 31 229 T2 2004.12.02**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 764 447 B1**

(51) Int Cl.⁷: **A61L 2/18**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 31 229.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 114 439.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **10.09.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.03.1997**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.12.2004**

(30) Unionspriorität:

532211 22.09.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:

Bayer Corp., Pittsburgh, Pa., US

(72) Erfinder:

Alonso, William R., Cary, North Carolina 27511, US

(74) Vertreter:

**Köhler, F., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 40723
Hilden**

(54) Bezeichnung: **Herstellung von virusinaktivierten intravenös injektierbaren Globulin aus Immuns serum**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung**Hintergrund der Erfindung**

[0001] GEBIET: Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich ganz allgemein mit einem intravenös spritzbaren Immunglobulinprodukt und insbesondere mit einem intravenös spritzbaren Immunserymoglobulin (IGIV), das einer Virus-Inaktivierungsstufe unterzogen worden ist und einen niedrigen Gehalt an Antikomplement-Aktivität aufweist.

[0002] HINTERGRUND: Frühe pharmazeutische Zubereitungen von Immunserymoglobulinen konnten wegen des inakzeptabel hohen Auftretens von Gegenreaktionen nicht intravenös verabreicht werden. Diese Gegenreaktionen wurden mit einem Anstieg bei den Serum-Komplementgehalten in Zusammenhang gebracht, welcher offenbar durch Komplementbindung an die verabreichten γ -Globuline verursacht wurde (1). Die Befähigung von γ -Globulin zur Komplementbindung oder seine Antikomplement-Aktivität (ACA) werden als Ergebnis einer Denaturierung stark gesteigert, die während des Fraktionierungsverfahrens einhergeht. Verschiedene Lösungsansätze sind durchgeführt worden, um dem Problem zu begegnen, ISG sicher zur intravenösen Verabreichung zu machen (siehe (2) und Literaturstellen darin). Tenold berichtete über ein Verfahren zur Herstellung eines Immunserymoglobulins (ISG) mit niedriger ACA, welches durch intravenöse Injektion verabreicht werden konnte (2). Das Tenold '608-Verfahren macht die Formulierung des ISG bei niedriger Ionenstärke (vorzugsweise von weniger als ca. 0,001) und bei niedrigem pH-Wert (3,5 – 5,0) erforderlich.

[0003] Über weitere Verfahren zur Herstellung und Zubereitung von intravenös spritzbarem Immunserymoglobulin (IGIV) ist berichtet worden, einschließlich einer Stabilisierung mit Kohlenhydraten wie mit Maltose (3). Ein Verfahren, wobei ISG bei einem pH-Wert von 4,0 bei 37°C inkubiert wird (4), führt zu einem Produkt mit niedriger ACA, das durch intravenöse Injektion verabreicht werden kann; allerdings gewinnt das Produkt bei Lagerung seine hohe ACA zurück. IGIV ist auch durch kovalente Modifikation des ISG zubereitet worden, z. B. durch Proteolyse (5) oder durch Reduktion von Disulfid-Bindungen und anschließende Reaktion mit Blockierungsmittel (1, 6).

[0004] Antikörper-Zubereitungen weisen, da sie isolierte Blutprodukte darstellen, das innewohnende Risiko auf, viral-vermittelte Krankheiten zu übertragen. Die Inaktivierung von Viren ist eine wichtige Stufe zur Erzeugung sicherer und wirksamer Blutprodukte. In US 4,540,573 von Neurath et al ist ein virales Inaktivierungsverfahren unter Anwendung eines Trialkylphosphats und eines Detergens-Verfahrens beschrieben (nachfolgend bezeichnet als Lösungsmittel (Solvens)/Detergens-Verfahren oder als SD-Verfahren) (7). Dieses Solvens/Detergens-Verfahren hat Akzeptanz als wirkungsvolles Verfahren zur Inaktivierung Lipid-umhüllter Viren mit eingeschränkten gegenläufigen Auswirkungen auf die biologische Aktivität oder die Blutprodukt-Profile gewonnen (8, 15; siehe auch 12 für eine Diskussion verschiedener viraler Inaktivierungsverfahren).

[0005] Derzeitige Antikörper-Zubereitungen, die sich auf dem Markt befinden, sind im Allgemeinen als sicher in Bezug auf eine virale Kontamination eingeschätzt worden (9). Dies soll wegen der Verfahrensmerkmale der Fraktionierungsverfahren gelten, die zur Isolierung dieser Blutprodukte angewandt werden. Allerdings wäre es wünschenswert, die Sicherheit der Antikörper-Zubereitungen durch Einschluss einer getrennten viralen Inaktivierungsstufe in das Herstellungsverfahren noch sicherer zu gewährleisten. Über eine erfolgreiche Verringerung der viralen Aktivität in einer IGIV-Lösung wurde berichtet, wobei verschiedene unterschiedliche Verfahren der viralen Inaktivierung für eine Vielzahl von Viren angewandt wurden (16, 17). Über ein Verfahren zur Zubereitung und Herstellung von Immunglobulinen, die im Wesentlichen frei von Retrovirus sind, ist berichtet worden, wobei ISG unter gesteuerten Bedingungen von Zeit, Temperatur und pH inkubiert wird. Das Verfahren beinhaltet, dass ISG über ein Plasmafraktionierungsverfahren mit kaltem Ethanol isoliert und dann das ISG bei einer von zwei Lagerungsbedingungen gelagert wird: (a) bei pH < 4,5 bei einer Temperatur von 27°C mindestens 3 Tage lang oder (b) bei pH < 6,8 bei einer Temperatur von 45°C mindestens 6 h lang (10).

[0006] Es ist nun herausgefunden worden, dass die Anwendung des SD-Verfahrens zur Behandlung von ISG-Zubereitungen, insbesondere von denjenigen, die gemäß dem Tenold '608-Patent entsprechend formuliert wurden, zu einem Produkt mit akzeptabler viraler Inaktivierung, aber mit inakzeptabler hohen Gehalten von ACA führt. Erhöhte ACA-Gehalte wurden immer bei der Sterilmasse-Stufe (d. h. nach Zubereitung als 5- oder 10%-iges IGIV und Filtration mit 0,2 μ m Sterilfiltern) aller mit Tri-n-butylphosphat (TNBP)/Detergens behandelten IGIV-Zubereitungen nachgewiesen, und zwar unabhängig vom Maßstab des Verfahrens. Zubereitungen von ISG mit hohen ACA-Gehalten eignen sich nicht zur intravenösen Injektion und müssen statt dessen über andere Wege, z. B. eine intramuskuläre (IM)-Injektion, verabreicht werden. Jedoch sind IGIV-Zubereitungen mehr erwünscht, da sie im Blutstrom unmittelbar verfügbar sind und keinem Verlust unterliegen, der mit einer

IM-Injektion zusammenhängt. Es ist daher erwünscht, ein IGIV-Produkt bereitzustellen, welches sowohl eine niedrige ACA aufweist als auch einer viralen Inaktivierungsstufe unterzogen worden ist.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0007] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer intravenös spritzbaren Immunseryumglobulin (IGIV)-Zubereitung mit niedriger Antikomplement-Aktivität, die chemisch behandelt worden ist, um sie im Wesentlichen frei von Lipid-umhüllten Viren zu machen. Das Verfahren umfasst eine Lösungsmittel/Detergens-Viralinaktivierungsstufe mit anschließender Inkubationsstufe. Es ist herausgefunden worden, dass die Inkubationsstufe notwendig ist, um einen akzeptablen ACA-Gehalt zu erzielen, der niedrig genug ist, um es zu ermöglichen, dass das ISG durch intravenöses Spritzen verabreicht werden kann. Die Inkubationsstufe sollte unter gesteuerten Bedingungen der Zeit, des pH-Wertes, der Temperatur und der Ionenstärke durchgeführt werden. Vorzugsweise sollten der pH-Wert bei 3,5 bis 5,0, die Temperatur in einem Bereich von 2 bis 50°C und die Ionenstärke bei weniger als 0,001 gehalten werden. In einer bevorzugten Ausgestaltung sinkt die ACA der ISG-Zubereitung stufenweise über eine Zeitdauer von mindestens ca. 10 Tagen ab, wenn das ISG bei einem pH-Wert von ca. 4,25 und bei niedriger Ionenstärke (weniger als 0,001) gehalten wird, und die virale Inaktivierungsstufe (in einem Modell-System) führt zu einer wesentlichen Verringerung (d. h. um mindestens 4 logs) beim Titer der Lipid-umhüllten Viren.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUR

[0008] Die Figur zeigt einen Vergleich der typischen, im Durchschnitt beobachteten ACA-Gehalte von 5%-igen IGIV-Lösungen, die gemäß dem SD-Verfahren und mit oder ohne die Anschluss-Inkubation der vorliegenden Erfindung behandelt wurden.

SPEZIFISCHE AUSGESTALTUNGEN

MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0009] Das Ausgangsmaterial für das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist unmodifiziertes menschliches Immunseryumglobulin. In der Beschreibung und den Ansprüchen wird der Begriff "Immunseryumglobulin" verwendet, um die Substanz zu definieren, die in der Literatur verschiedentlich auch als γ -Globulin, IgG und als Immunglobulin G bezeichnet wird. Es besteht überwiegend und vorzugsweise aus mindestens ca. 85% der 7S-Species von γ -Globulin, die ein Molekulargewicht von ca. 160000 aufweist. Jeglicher Rest ist vorzugsweise die 9S-Species mit einem Molekulargewicht von ca. 300000. Sowohl Standard-Immun- als auch Hyper-Immunseryumglobuline, z. B. Tetanus-, Tollwut- und Hepatitis-Immunseryumglobuline, können eingesetzt werden, wobei das Lösungsmittel/Detergens-behandelte Produkt Immun- bzw. Hyperimmun-ISG ist. Somit stellt ein geeignetes Ausgangsmaterial für das Verfahren der vorliegenden Erfindung Cohn's Fraktion II oder -Fraktion-III-Filtrat dar (siehe die Literaturstellen 13, 14).

[0010] Die Fraktion II ist, gemäß Ultrazentrifugationsstudien, überwiegend (ca. 85%) die 7S-(Sedimentationskonstante von 7)-Species von γ -Globulin mit einem Durchschnittsmolekulargewicht von 160000. Das restliche Protein ist im Wesentlichen 9S-Material mit einem MG von ca. 300000. Nasse Fraktion II-Paste (ca. 30% Feststoffe) wird gewöhnlich lyophilisiert, um trockenes ISG-Pulver zu erhalten, das dann zur intramuskulären Injektion als eine sterile Lösung von 16,5% aufgelöst und zubereitet wird. Entweder die nasse Fraktion II-Paste oder das trockene ISG-Pulver stellen ein geeignetes Ausgangsmaterial für das Verfahren der vorliegenden Erfindung dar.

[0011] Mit einem Verfahren erhaltenes γ -Globulin, das im Wesentlichen die gleiche Zusammensetzung der Proteinkomponenten aufweist, wie sie im Cohn-Fraktion II- oder -Fraktion-III-Filtrat ermittelt wird, kann als Ausgangsmaterial in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Sowohl Standard-Immunseryumglobulin als auch Hyper-Immunseryumglobulin können als Ausgangsmaterialien eingesetzt werden. Wie es gut bekannt ist, wird das letzere aus Plasma oder Serum erzeugt, die von ausgewählten Spendern erhalten werden, die viel höhere Titer für einen spezifischen Antikörper aufweisen, als dieser im Normalfall in der Durchschnittspopulation gefunden wird. Diese Spender sind entweder kürzlich mit einem besonderen Impfstoff immunisiert worden oder haben sich ansonsten erst kürzlich von einer Infektion oder Krankheit erholt. Diese Hochtiter-Seren oder -Plasmen werden gesammelt und den üblichen Cohn-Fraktionierungsverfahren bis zum Punkt der Isolierung der Fraktion II unterzogen.

[0012] Weil ferner die Menge an Antikörper, die benötigt wird, um eine gewünschte immunologische Reaktion

zu erzielen, bei intravenöser Verabreichung wesentlich geringer ist, ist es ersichtlich, dass die intravenöse Dosis wesentlich geringer als die intramuskuläre Dosis ist, die den gleichen Serum-Antikörper-Titer erzeugt. Somit muss die Dosis von intramuskulärem ISG und Hyper-Immunseryumglobulin höher als diejenige sein, die benötigt wird, um den gleichen Serum-Antikörper-Titer zu erzielen, wenn Globulin der gleichen Antikörper-Aktivität intravenös verabreicht wird.

[0013] Die nasse Ausgangspaste oder lyophilisiertes Pulver werden in einem Volumen von Wasser oder einem anderen physiologisch zulässigen Träger aufgelöst, um eine Protein-Lösung einer Konzentration von ca. 0,5 bis 20 und vorzugsweise von ca. 5 bis 10% zu ergeben. Bei Anwendung von Fraktion III-Filtrat muss die wässrige Lösung mit herkömmlichen Verfahrenstechniken auf die gewünschte Protein-Konzentration aufkonzentriert werden. Jede Protein-Konzentration kann im vorliegenden Verfahren eingesetzt werden; allerdings ist der obige Bereich aus praktischer Sicht bevorzugt.

[0014] Nachdem das Protein gelöst oder aufkonzentriert worden ist, wird die Lösung auf einen pH-Wert von ca. 3,5 bis 5,0 und vorzugsweise von 3,8 bis 4,2 durch Zugabe einer physiologisch zulässigen Säure wie von Salzsäure eingestellt. Im Allgemeinen wird der pH-Wert auf einen Punkt eingestellt, bei dem das monomere Material in der Protein-Lösung bei einem Maximum gehalten wird. Allerdings darf der pH-Wert nicht so niedrig sein, dass dies zu einer Gelierung führt. Die Temperatur sollte für das ISG-Material nicht schädlich sein. Gute Ergebnisse werden im Temperaturbereich von 0 bis 20°C erhalten. Es ist nicht notwendig, das so eingestellte Material eine Zeitdauer lang vor der nächsten Stufe zu halten oder liegen zu lassen; allerdings kann das Material, falls gewünscht, ohne nachteilige Auswirkungen liegen gelassen werden.

[0015] Die Protein-Lösung kann bei einem geeigneten pH-Wert (vorzugsweise von 3,8 bis 4,2) mit mindestens 4 Austauschvolumina Wasser diafiltriert werden, um die Alkohol-Konzentration von annähernd 17% (Filtrat III) auf ca. 2% Alkohol herabzusetzen. Die Wirksamkeit des Solvens/Detergens als ein virales Inaktivierungsverfahren ist bei oder oberhalb der Umgebungstemperatur viel besser; allerdings denaturieren hohe Konzentrationen von Alkohol bei diesen Temperaturen die IgG-Moleküle. Somit muss diese Inaktivierung bei niedriger Alkohol-Konzentration durchgeführt werden.

[0016] Als Nächstes wird die Protein-Konzentration des so behandelten Materials auf die Gehaltsmenge eingestellt, die zur Inkubation mit TNBP/Detergens erwünscht ist, im Allgemeinen auf weniger als 10% Protein zur maximalen viralen Inaktivierung. Diese Einstellung wird mit herkömmlichen Verfahrenstechniken durchgeführt, die für ISG nicht nachteilig sind, z. B. mit Ultrafiltration, Umkehrosmose, Sublimation, Verdampfung usw.. Vor der Zugabe des TNBP-Detergens kann der pH-Wert innerhalb eines weiten Bereiches eingestellt werden, und zwar in Abhängigkeit vom Detergens, das verwendet wird. Bei Anwendung von Twen 80 kann der pH-Wert so niedrig wie 3,5 sein, wo das IgG instabil zu werden beginnt. Bei Anwendung von Cholat wird der pH-Wert innerhalb des Bereiches von 5,0 bis 6,4 und vorzugsweise auf 5,6 vor der Zugabe des TNBP/Detergens eingestellt. Eine genügend gute Cholat-Löslichkeit während der Inkubation wurde durch Einstellung der Immunglobulin-Lösungen auf einen pH-Wert von 5,5 oder höher vor der Zugabe von TNBP und von Natriumcholat erzielt. Eine Einstellung der IgG-Lösungen auf pH-Werte von weniger als 5,5 ist nicht geeignet, weil die Löslichkeit von Natriumcholat vom pH-Wert stark abhängt (Cholsäure, $pK = 6,4$), wobei die Löslichkeit bei einem pH-Wert von 5,5 oder weniger gering ist. Ferner wurde die maximale virale Inaktivierung während der Inkubation mit TNBP/Cholat bei pH-Werten von weniger als 6,0 in Versuchen mit in IgG-Lösungen gespickten Modell-Viren beobachtet. Die Inaktivierung von HIV-1 und BVDV (bovines virales Diarrhö-Virus, das als ein Modell für Hepatitis C eingesetzt wird) wurde bei einem pH-Wert von 5,8 beschleunigt, wobei die Inaktivierung bis zur Nachweisgrenze in 1 bis 2 h erfolgte, wogegen die Inaktivierung bis zur Nachweisgrenze ein Minimum von 6 h benötigte, als Bedingungen eines pH-Wertes von 7 angewandt wurden.

[0017] Als Nächstes werden das TNBP/Detergens zur Protein-Lösung gegeben (vorzugsweise mit weniger als 8% [G/G], $pH = 5,8$), gründlich vermischt und dann oberhalb der Umgebungstemperaturen bei z. B. 30°C unter kontinuierlichem Rühren oder Vermischen inkubiert. Die Ziel-TNBP/Cholat-Gehaltsmengen zur optimalen viralen Inaktivierung während der Inkubationsstufe sollten $> 3 \text{ mg/mL}$ TNBP und $> 2 \text{ mg/mL}$ Cholat betragen, wie definiert von Edwards et al (8). Ausserdem ist es zur effektiven viralen Inaktivierung wichtig, dass die Lösung im Wesentlichen frei von Teilchen ist, um eine gründliche Durchmischung des Solvens/Detergens und der IgG-Lösung zu erleichtern. Nach Inkubation mit TNBP/Cholat unter diesen Bedingungen wurden eine mehr als $5,2 \log_{10}$ -Verringerung von HIV-1 und eine mehr als $4,0 \log_{10}$ -Verringerung von BVDV nachgewiesen.

[0018] Nach Beendigung der Inkubation zur viralen Inaktivierung müssen das Lösungsmittel und die Detergensmoleküle entfernt werden, um ein Endprodukt mit niedrigen Gehaltsmengen an restlichem TNBP und Cholat zu erzielen, welches sich zur intravenösen Verabreichung eignen würde. Ganz allgemein sind Verfah-

ren zur Beseitigung des Detergens genauso wirkungsvoll zur Entfernung des TNBP und umgekehrt. Sehr niedrige Gehaltsmengen an TNBP und Cholat im End-Behälter können durch eine Kombination aus Filtration, Diafiltration und hydrophober Chromatografie bewerkstelligt werden. Nach Beendigung der Inkubation kann der Hauptteil von Cholat (und von TNBP) aus der Protein-Lösung durch Filtration entfernt werden, vorausgesetzt, dass die Lösung vorab auf einen niedrigeren pH-Wert von wie von 4,0 eingestellt worden ist, weil Natriumcholat nur spärlich in wässrigen Lösungen bei diesen pH-Werten löslich ist. Ausserdem werden alle Verfahrensstufen, die auf die Solvens/Detergens-Inkubation folgen, bei niedrigeren pH-Werten (d. h. von 4,0) durchgeführt, weil IgG-Moleküle stabiler bei pH-Werten von 3,5 bis 5,0 in Lösungen mit niedriger Ionenstärke sind (2). Somit wird, nach Inkubation mit TNBP/Cholat, die Protein-Lösung auf einen pH-Wert von annähernd 4,0 eingestellt und bei 0 bis 8°C inkubiert, um die Cholat-Ausfällung zu begünstigen. Als Nächstes wird filtriert, um das ausgefällte Cholat aus der IgG-Lösung zu beseitigen.

[0019] Die so behandelte Lösung wird mit mindestens vier Austauschvolumina Wasser zur Verringerung der Ionenstärke und zur zusätzlichen Entfernung von TNBP und von Cholat diafiltriert. Nach oder während der obigen Behandlung wird der pH-Wert gemessen und im Bereich von ca. 3,5 bis 5,0 gehalten. Die Protein-Konzentration des so behandelten Materials wird auf 10 bis 30 und gewöhnlich auf 13% (G/V) durch Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken, die für ISG nicht nachteilig sind, z. B. durch Ultrafiltration, Umkehrosmose, Sublimation, Verdampfung usw., eingestellt. Wiederum wird der pH-Wert der Zubereitung im Bereich von ca. 3,5 bis 5,0 und vorzugsweise von ca. 3,8 bis 4,2 gehalten.

[0020] In der vorliegenden Erfindung wird eine hydrophobe Chromatografie angewandt, um das TNBP und das Cholat zu entfernen, welche durch die Filtrations- und Diafiltrationsstufen nicht beseitigt wurden, und es wird somit ein Endprodukt mit niedrigen Gehaltsmengen an restlichem TNBP und Cholat bereitgestellt, welches sich zur intravenösen Verabreichung eignet. Die hydrophobe Chromatografie ist ein Verfahren zur TNBP-Entfernung aus Protein-Lösungen, welches weniger Nachteile und Beschränkungen als andere verfügbare Verfahren wie eine Öl-Extraktion, Ionenaustausch- oder eine Affinitätschromatografie aufweist und ergibt. Teilweise gilt dies deshalb, weil das Protein von Interesse (IgG) in Lösung über das TNBP-Entfernungsverfahren hinweg verbleibt. Polystyrol-basierte Harze (in typischer Weise PLRP-S von Polymer Laboratories, Amherst, MA) wurden zur Entfernung des Solvens/Detergens aus der Lösung angewandt, da herausgefunden wurde, dass die Polystyrol-basierten Harze anderen Harzen, wie Silikabasierten C-18 Harzen, überlegen sind.

[0021] Als Nächstes wird die ISG-Zubereitung auf 5 oder 10% Protein eingestellt und behandelt, um sie tonisch zu stellen, d. h., um sie kompatibel mit physiologischen Bedingungen oder physiologisch zulässig bei Injektion zu stellen. In einer bevorzugten Ausgestaltung wird die Tonizität auf ca. 230 bis ca. 490 mOsmol/kg Lösungsmittel eingestellt. Bevorzugter beträgt der Tonizitätsbereich ca. 250 bis ca. 350 mOsmol/kg Lösungsmittel, und am meisten bevorzugt beträgt der Tonizitätsbereich ca. 260 bis ca. 325 mOsmol/kg Lösungsmittel. Die 5%-ige Formulierung (5% IGIV) wird durch die Zugabe von 10% Maltose tonisch gestellt. Die 10%-ige Formulierung enthält 0,2 M Glycin, um eine isotonische Zubereitung ohne größere Mengen an Zucker zu erhalten. Das Produkt mit jeder der beiden Formulierungen (Gamimune[®]N 5% oder Gamimune[®]N 10%) erleidet Verschiebungen bei der molekularen Verteilung (Antikörper-Aggregation), wenn die Ionenstärke der Lösung mit niedrigem pH-Wert erhöht wird. Daher sollte Natriumchlorid, welches oft zur Erstellung der Tonizität verwendet wird, nicht verwendet werden.

[0022] Die so behandelte Lösung wird bei pH = 4,25 und den niedrigen Ionenstärke-Bedingungen inkubiert (NLT über 21 Tage bei 20 bis 27°C bevorzugt), um eine Verringerung der ACA-Gehalte zu ergeben. Die Ionenstärke wird gemäß Perrin (18) bestimmt, und in einer bevorzugten Ausgestaltung sollte die Ionenstärke weniger als ca. 0,001 betragen. Erhöhte ACA-Gehalte wurden immer bei dieser Stufe in allen mit TNBP/Cholat behandelten IGIV-Zubereitungen nachgewiesen (unabhängig vom Maßstab des Verfahrens); allerdings werden die ACA-Gehalte stufenweise durch Inkubation bei pH = 4,25 unter niedrigen Ionenstärke-Bedingungen verringert (Tabellen 3, 5 bis 7). Zwar gibt es keine strikte Regel, die zu beachten wäre, wenn der ACA-Gehalt nur niedrig genug ist, um ein akzeptables Niveau darzustellen, das sich zur intravenösen Verabreichung eignet, die IGIV-Zubereitungen sollten aber ACA-Gehalte aufweisen, die so niedrig wie möglich sind.

[0023] In der Figur ist die typische Durchschnittsverringerung der ACA dargestellt, die in 5%-igen IGIV-Lösungen nach der SD-Behandlung beobachtet wird. Für eine 5%-ige ISG-Zubereitung würde das akzeptable Niveau, das sich zur intravenösen Verabreichung eignet, vorzugsweise weniger als ca. 45 CH₅₀-Einheiten/mL und noch bevorzugter weniger als ca. 30 CH₅₀-Einheiten/mL betragen. Für eine 10%ige ISG-Zubereitung würde das akzeptable Niveau, das sich zur intravenösen Verabreichung eignet, vorzugsweise weniger als ca. 60 und noch bevorzugter ca. weniger als ca. 40 CH₅₀-Einheiten/mL betragen. Wie hierin verwendet, ist 1 Einheit ACA-Aktivität (1 CH₅₀-Einheit) als diejenige Proteinmenge definiert, die befähigt ist, 50% des Komplements in

einem optimal eingestellten Komplement- und rote Blutzellen/Hämolysin-System zu aktivieren. Das Assayverfahren misst die Menge an Komplement, die durch die Mischung standardisierter Mengen von Komplement und Protein gebunden wird. Siehe Literaturstellen 19 bis 20 für eine Diskussion des Assayverfahrens. Kurz gesagt, werden rote Blutzellen, die durch Vorinkubation mit roten Blutzell-Antikörpern sensibilisiert worden sind, zur Komplement/Protein-Mischung gegeben. In der Gegenwart von freiem Komplement (noch nicht gebunden durch das Protein) lysieren diese sensibilisierten Zellen, und es wird Hämoglobin freigesetzt, das als Maß des Lysegrades quantitativ bestimmt werden kann. Parallel dazu, werden sensibilisierte rote Blutzellen auch zu einer mit Puffer gesteuerten Komplement-Mischung gegeben, deren Lysegrad mit 100% definiert wird. Die Differenz zwischen der tatsächlichen Menge an Komplement, die benötigt wird, um eine 100%-ige Lyse zu ergeben, und der Menge an Komplement, die ungebunden in der Gegenwart von Protein verbleibt, ist gleich der Menge an Komplement, die tatsächlich durch das Protein gebunden wird, oder sie ist gleich der Antikomplement-Aktivität.

Ergebnisse

Antikomplement-Aktivität von ISG, die sich aus dem viralen Inaktivierungsverfahren ergibt

[0024] Zur Darstellung des Effekts des SD-Viralinaktivierungsverfahrens an ISG enthaltenden Lösungen, die gemäß dem Tenold-'608-Patent formuliert sind, wurden die in Tabelle 1 angegebenen Versuche durchgeführt. Das Ausgangsmaterial (Starting Material = SM) war Cohn-Verfahren-Filtrat III, das auf ca. 5% Protein ultrafiltriert und dann mit 4 Volumina Wasser diafiltriert wurde.

[0025] Im Vergleichsversuch, einer Inkubation (-)/SD(-), wurde das SM keiner Inkubation oder Lösungsmittel/Detergens-Behandlung unterzogen. Im Inkubation (+)/SD(-)-Versuch wurde der pH-Wert des SM auf 7,0 eingestellt, die Lösung wurde bei 30°C 10 h lang inkubiert, und dann wurde der pH-Wert auf 4,0 herabgesetzt. Im Inkubation-(+)/SD, TNBP & Tween 80 (+)-Versuch wurde der pH-Wert des SM auf 7,0 eingestellt, und es wurden 3 mg/mL TNBP und 2 mg/mL Tween 80 zur Lösung gegeben und die Lösung bei 30°C 10 h lang inkubiert, worauf der pH-Wert auf 4,0 herabgesetzt wurde. Im Inkubation (+)/SD, TNBP & Cholat (+)-Versuch wurde der pH-Wert des SM auf 7,0 eingestellt, und es wurden 3 mg/mL TNBP und 2 mg/mL Cholat zur Lösung gegeben und die Lösung bei 30°C 10 h lang inkubiert, worauf der pH-Wert auf 4,0 herabgesetzt wurde. Die Lösungen wurden dann in jedem Versuch mit 4 Volumina CWFI (kaltem Wasser zur Injektion) diafiltriert und durch Ultrafiltration eingengt. Nach Zugabe von trockener Maltose auf 10% G/V wurde die 5%-ige IGIV-Lösung (pH = 4,25) durch ein 0,2 µm Filter filtriert.

Tabelle 1

Antikomplement-Aktivität in 5%-igem IGIV, hergestellt durch Variationen des Solvens/Detergens-IGIV-Verfahrens

	ACA (CH ₅₀ /mL)
Vergleich	
keine Solvens/Detergens-Behandlung, keine 30°C-Inkubation	25
Inkubation bei 30°C 10 h lang (kein Solvens/Detergens)	22
Inkubation bei 30°C 10 h lang NLT 3 mg/mL TNBA NLT 2 mg/mL Tween 80	68
Inkubation bei 30°C 10 h lang NLT 3 mg/mL TNBP NLT 2 mg/mL Cholat	> 100

Diese Proben wurden nach der endgültigen Zubereitung gemäß dem Tenold-'608-Patent bezüglich der ACA analysiert, sie wurden aber nicht bei pH = 4,25 und 22°C vor der Analyse inkubiert

[0026] Die in Tabelle 1 aufgelisteten Ergebnisse zeigen, dass die ACA-Gehalte in den IgG-Proben nach Inku-

bation mit TNBP/Cholat oder mit TNBP/Tween 80 anstiegen. Die ACA-Gehalte waren in IgG-Proben nicht erhöht, die 10 h lang bei 30°C in der Abwesenheit von Solvens/Detergens inkubiert wurden. Diese Ergebnisse legen es nahe, dass die ACA-Gehalte der IGIV-Proben weder durch Verarbeitungsmaßnahmen noch durch die Inkubation über 10 h bei 30°C in der Abwesenheit von Solvens/Detergens erhöht wurden.

Tabelle 2
Antikomplement-Aktivität in 5%-igem IGIV, gespickt mit TNBP/Na-Cholat

	ACA (CH ₅₀ /mL)
5% IGIV, kein TNBP/Cholat	12
5% IGIV mit 100 µg/mL TNBP, 100 µg/mL Na-Cholat	13

[0027] Ferner haben Spick-Versuche (mit TNBP und Na-Cholat, Tabelle 2) belegt, dass die erhöhten Antikomplement-Aktivitätsgehalte keine Artefakte waren, die durch Durchführung des Antikomplement-Assayverfahrens in der Gegenwart von Spurengehaltsmengen von TNBP/Na-Cholat verursacht wurden. Somit ergibt die Anwendung des SD-Verfahrens des Standes der Technik zur viralen Inaktivierung einer ISG enthaltenden Lösung, die anschließend gemäß dem Tenold-608-Patent formuliert wurde, ein Produkt, welches eine hohe ACA aufweist und sich nicht zur intravenösen Verabreichung eignet. In einem ähnlichen Versuch wiesen SD-behandelte Proben, die nicht inkubiert wurden (Tabelle 3, Anfangstest) ACA-Gehalte von größer als 100 Einheiten auf.

Tabelle 3
Verringerung der Antikomplement-Aktivität von Proben, die vorab mit TNBP/Cholat behandelt wurden

Probe	ACA (CH ₅₀ /mL)	
	Anfangstest (keine Inkubation)	Nach Inkubation 6 Wochen bei 5°C 3 Wochen bei 22°C
RB21872-16	> 100	33
RB21872-17	> 100	34
RB21872-18	> 100	36
RB21872-20	> 100	27

[0028] Als allerdings SD-behandelte Doppelproben über verlängerte Zeiträume inkubiert wurden (6 Wochen bei 5°C und 3 Wochen bei 22°C) war der ACA-Gehalt deutlich verringert (Tabelle 3, nach Inkubation). Dies führte zu weiteren Untersuchungen dieser überraschenden Beobachtung.

Aggregat-Gehalt von ISG, ausgesetzt an TNBP/Cholat

[0029] Die Proben des vorherigen Versuchs (Tabelle 3, Anfangstest) wurden mit Größenausschluss-(Gelpermeations)-HPLC sofort nach der Zubereitung analysiert, um das Ausmaß der Aggregation des IGIV zum Anfangszeitpunkt zu bestimmen. Die HPLC-Analyse zeigt einen nahezu vollständigen Monomergehalt in den Proben (Tabelle 4):

Tabelle 4

HPLC-Analyse von nicht-inkubierten 5%-igen IGIV-Proben (Tabelle 3, anfänglich)

Probe	Aggregat (%)	Dimer (%)	Monomer (%)	Fragment (%)
RB21872-16	0,140	0,00	99,86	0,00
RB21872-17	0,146	0,00	99,85	0,00
RB21872-18	0,124	0,00	99,88	0,00
RB21872-20	0,172	0,00	99,83	0,00

[0030] Vorher erwiesen sich hohe IgG-Aggregat-Gehaltsmengen als in Korrelation mit einer hohen Antikomplement-Aktivität. Allerdings zeigen die Ergebnisse aus der Analyse der Proben, dass der ACA-Gehalt in den Proben größer als 100 Einheiten ist (Tabelle 3, 'Anfangstest'). Die HPLC-Analyse zeigt und ergibt, dass die hohe ACA im Anschluss an die TNBP/Cholat-Behandlung nicht wegen des Vorliegens aggregierter IgG-Moleküle auftrat.

Varierte Zeit- und Temperaturbedingungen

[0031] Das SM war das gleiche wie im vorherigen Versuch, und die Versuchsbedingungen waren ähnliche mit den folgenden Abänderungen. Die Lösungen wurden mit TNBP/Cholat bei pH = 7,0 behandelt und dann mit 5% IGIV, 10% Maltose, pH = 4,25, wie oben zubereitet. Die ACA wurde sofort nach der endgültigen Zubereitung nach einer ersten Inkubation über 9 Tage bei 5°C und nach einer zweiten Inkubation über 21 Tage bei entweder 22 oder 5°C analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 angegeben:

Tabelle 5

ACA der mit TNBP/Cholat-behandelten IGIV-Proben

Probenpunkt	ACA (CH ₅₀ /mL)
Zwischenproben	
Anfangs-Sterilmasse	> 100
Inkubiert 9 T. bei 5°C	> 100
Endinkubation	
21 T. bei 22°C	49
21 T. bei 5°C	71

[0032] In der Anfangs-Sterilmasse-Probe, die mit TNBP/Cholat bei pH = 7,0 behandelt wurde, betrug der ACA-Gehalt wiederum mehr als 100 Einheiten für den Anfangszeitpunkt, was die in Tabelle 3 angegebenen Beobachtungen bestätigt. Bei Inkubation bei 5°C über 9 Tage blieb die ACA größer als 100 Einheiten. Die End-Inkubationsstufe bei entweder 5 oder 22°C zeigt, dass die Verringerung der ACA von der Temperatur abhängt, wobei sich die bei höheren Temperaturen beobachtete ACA schneller verringert.

Effekt des pH bei der Solvens/Detergens-Behandlung auf die ACA

[0033] ACA-Gehalte wurden nach Inkubation mit TNBP/Cholat bei pH = 5,8 bewertet, weil eine bessere virizide Aktivität bei pH-Werten von weniger als 6,0 beobachtet wurde. Ganz allgemein wiesen die nicht-inkubierten Sterilmasse-Proben von bei pH = 5,8 inkubiertem Material niedrigerer ACA-Gehalte als die Proben mit einem pH-Wert von 7,0 auf, aber der Trend zur Verringerung der ACA bei Inkubation wurde in den Proben mit einem pH-Wert von 5,8 wiederholt. Tatsächlich sinken die ACA-Gehalte jenseits einer Inkubation über 21 Tage in Proben weiter ab, die anfänglich erhöhte ACA-Gehalte nach Inkubation mit TNBP/Cholat bei pH = 5,8 aufwiesen (Tabelle 6). Wie vorher für die bei pH = 7,0 inkubierten Proben festgestellt, trat die Verringerung der ACA nicht wegen absinkender Gehaltsmengen aggregierter IgG-Moleküle auf, weil das bei pH = 5,8 behandelte Material im Wesentlichen monomeres IgG vor der Inkubation bei 22°C war (HPLC-Analyse, Probe A4, Tabelle 8).

Tabelle 6
Probe A4 – ACA bei verlängerter Inkubation

Inkubation bei 22°C (Tage)	CH ₅₀ /mL
0	122
10	73
19	55
25	56
28	45
30	40
34	39
41	33
48	30
55	29

[0034] Ähnliche Ergebnisse wurden mit Proben erzielt, die mit 10% IGIV, 0,2 M Glycin im Sterilmasse-Stadium formuliert waren. Bei Inkubation bei niedriger Ionenstärke bei pH = 4,25 über 10 und 21 Tage wurde festgestellt, dass die ACA-Gehalte sowohl in 5%-igen als auch in 10%-igen IGIV-Proben abnehmen (Tabelle 7). Das Absinken der ACA kann somit über einen Bereich der ISG-Konzentration und über einen Bereich der pH-Werte für die Solvens/Detergens-Behandlung beobachtet werden (Tabellen 3, 5, 7). Die HPLC-Analyse (Tabelle 8) der in Tabelle 7 angegebenen Sterilmasse-Proben belegte, dass die erhöhten ACA-Gehalte nicht wegen einer Aggregation von ISG-Molekülen auftraten.

Tabelle 7
ACA von Proben, behandelt mit TNBP/Cholat bei pH = 5,8

Probe	Sterilmasse (Tag Null) (CH ₅₀ /mL)	10 Tage Inkubation bei 20 - 27°C (CH ₅₀ /mL)	21 Tage Inkubation bei 20 - 27°C (CH ₅₀ /mL)
A1 (5% IGIV)	43	ND	10
A2 (5% IGIV)	31	14	15
A3 (5% IGIV)	44	15	12
A4 (5% IGIV)	122	73	55
B1 (10% IGIV)	> 100	48	46
B2 (10% IGIV)	49	36	30
B3 (10% IGIV)	53	ND	37

[0035] Alles in Allem legen es die obigen Ergebnisse nahe, dass ISG-Produkte, die einem Solvens/Detergens-Viralinaktivierungsverfahren unterzogen worden sind, das (zunächst) zu einem unerwünschten ACA-Anstieg führt, zur IV-Verabreichung durch Einführung einer zusätzlichen Inkubationsstufe unter den hierin beschriebenen Bedingungen zur Verringerung der ACA auf ein akzeptables Niveau geeignet gemacht werden können.

Tabelle 8
HPLC-Analyse von Sterilmasse-Proben, behandelt mit TNBP/Cholat bei pH = 5,8

Probe	Aggregat (%)	Dimer (%)	Monomer (%)	Fragment (%)
A2	0,140	0,00	99,86	0,00
A3	0,146	0,00	99,85	0,00
A4	0,124	0,00	99,88	0,00

SCHLUSSFOLGERUNG

[0036] Der ACA-Anstieg, der aus der Solvens/Detergens-Behandlung der IGIV-(Antikörper)-Lösung resultiert, scheint ein unvermeidbarer Sekundäreffekt der TNBP/Detergens-Behandlung zur Inaktivierung von Viren in der Lösung zu sein. Es ist nun herausgefunden worden, dass durch Inkubieren der IGIV-Lösung bei niedrigem pH (4,25) und bei niedriger Ionenstärke (0,001) über einen relativ langen Zeitraum (von mindestens ca. 10 Tagen) die ACA stufenweise über den Zeitraum der Inkubation absinkt.

[0037] Im Stand der Technik ist ein Verfahren zur Erzeugung von IGIV offenbart (das Tenold-'608-Patent), wobei ein niedriger pH-Wert und eine niedrige Ionenstärke angewandt werden. Das Tenold-'608-Verfahren lässt die virale Inaktivierungsstufe weg und behandelt somit das Problem einer erhöhten ACA nicht, es verbleibt aber die Möglichkeit einer viralen Aktivität. Nicht wie bei Tenold ist die Inkubation ein wesentlicher Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung zur Verringerung der ACA.

[0038] Das Neurath et al-'573-Patent enthält die technische Lehre der viralen Solvens/Detergens-Inaktivierungsstufe. Im Neurath-'573-Patent werden die Steuerung des pH-Wertes und auch die Konsequenzen des Verfahrens bezüglich der ACA nicht genannt. Erhöhte ACA-Gehalte wurden beim Sterilmasse-Stadium von mit TNBP/Cholat behandeltem IGIV-Zubereitungen nachgewiesen. Allerdings sanken die ACA-Gehalte bei Inkubation über mindestens ca. 10 Tage bei pH = 4,25, niedriger Ionenstärke und bei nicht weniger als ca. 20°C ab (siehe Tabellen 5 bis 7). Im Stand der Technik sind verschiedene Lösungsansätze beschrieben, um die ACA-Gehalte gereinigter IgG-Zubereitungen zu erniedrigen, einschließlich der Entfernung von IgG-Aggregaten (11). Bei IgG-Aggregaten ist gezeigt worden, dass das Komplementsystem in vivo aktiviert wird (1). In der vorliegenden Erfindung trat allerdings die Verringerung der IgG-ACA nicht wegen absinkender Gehaltsmengen der IgG-Aggregate auf, weil diese mit TNBP/Cholat behandelten IgIV-Zubereitungen nur niedrige Gehaltsmengen von aggregiertem IgG (wie gemessen mit HPLC, Tabellen 4, 8) vor der Inkubation unter solchen Bedingungen enthielten.

[0039] Es wäre wünschenswert, im Wesentlichen Virus-freies IGIV zu erzeugen, aber gemäß dem Stand der Technik ergibt sich ein Produkt mit einem inakzeptablen Gehalt der ACA. Es sei angemerkt, dass im Tenold-'608-Patent festgestellt wird, dass das Produkt im Wesentlichen frei von ACA ist, die Anwendung des SD-Verfahrens zusammen mit dem Tendol-'608-Patent führt allerdings zu hohen Gehalten der ACA: die hier berichteten Versuchsergebnisse zeigen, dass die Behandlung von ISG-Lösungen mit dem SD-verfahren und die anschließende Formulierung gemäß dem Tenold-'608-Patent zu einem Produkt mit hoher ACA führen (siehe Tabellen 1, 3, 5 bis 7). Diese überraschende Erkenntnis, über die hier berichtet wird, beruht darauf, dass eine Anschluss-(End-)Inkubationsstufe die ACA der mit Solvens/Detergens behandelten Lösung erniedrigt. Die typischen, durchschnittlich beobachteten ACA-Gehalte von 5%-igen IGIV-Lösungen, die gemäß dem SD-Verfahren und mit oder ohne die Anschluss-Inkubation behandelt wurden, sind in der Figur gegenübergestellt. Die vorliegende Erfindung beinhaltet somit ein früher nicht festgestelltes Verfahren zur Herabsetzung der ACA durch Inkubieren unter gesteuerten Bedingungen des pH-Wertes, der Temperatur und Ionenstärke über einen Zeitraum, wodurch es ermöglicht wird, das Produkt durch intravenöse Injektion zu verabreichen.

[0040] Im Mitra-'714-Patent wird die Anwendung eines S/D-Verfahrens nicht nahegelegt, es wird aber statt dessen berichtet, dass eine relativ kurze Inkubation eines ISG-Produkts unter ähnlichen Bedingungen eine im Wesentlichen Virus-freie Zubereitung ergibt (10). Allerdings ist die Inkubationsanwendung unter solchen Bedingungen zur Erniedrigung der Antikomplement-Aktivität eine neue Anwendungsform dieser Inkubationsbedingungen, welche früher im IGIV-Verfahren zur Inaktivierung umhüllter Viren zur Anwendung gelangten.

[0041] Das neu entwickelte IGIV-Verfahren, über das hier berichtet wird und welches eine weitere international anerkannte virale Inaktivierungsverfahrensweise einschließt (Behandlung mit TNBP/Cholat), erzeugt IgG-Zubereitungen, die niedrige ACA-Gehalte aufweisen und sich zur IV-Verabreichung eignen. Der Hauptvor-

teil beruht darauf, dass ein IGIV-Produkt mit verbesserter Sicherheit mit einem zweistufigen Verfahren erhalten wird, welches eine TNBP/Cholat-Behandlung zur viralen Inaktivierung und die Inkubation unter Bedingungen einschließt, die niedrige ACA-Gehalte ergeben, die sich zur IV-Verabreichung eignen.

Literaturverzeichnis

- 1 Barandun, S. et al., Vax Sang. 7: 157–174 (1962).
- 2 Tenold, R. A., U.S. Patent # 4,396,608 (Aug. 2, 1983).
- 3 Fernandes, P. M. et al., U.S. Patent # 4,186,192 (Jan. 29, 1980).
- 4 Malgras, J. et al., Rev. Franc. Trans. 13: 173 (1970).
- 5 Sgouris, J. T., Vox Sang. 13: 71 (1967).
- 6 Pappenhagen, A. R. et al., U.S. Patent # 3,903,262 (Sept. 2, 1975).
- 7 Neurath, A. R. und Horowitz, B., U.S. Patent #4,540,573 (Sept. 10, 1985).
- 8 Edwards, C. A. et al., Vox Sang. 52: 53–59 (1987).
- 9 Louie, R. E. et al., Biologicals 22: 13–19 (1994).
- 10 Mitra, G. and Mozen, M., U.S. Patent #4,762,714 (Aug. 9, 1988).
- 11 Polson, A. and Ruiz-Bravo, C., Vox Sang. 23: 107–118 (1972).
- 12 Seng, R. L. and Lundblad, J. L., U.S. Patent # 4,939,176 (July 3, 1990).
- 13 Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68: 459 (1946).
- 14 Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71: 541 (1949).
- 15 Kameyama, S. et al., U.S. Patent # 5,151,499 (Sept. 29, 1992).
- 16 Uemura, Y. et al., Vox Sang. 67: 246–254 (1994).
- 17 Yang, Y. H. J. et al., Vox Sang. 67: 337–344 (1994).
- 18 Perrin, D. D. und Dempsey, B., Buffers for pH and Metal Ion Control (Chapman and Hall, London, 1974), S. 6–7.
- 19 Palmer, D. F. und Whaley, S. D., Complement Fixation Test, in Manual of Clinical Laboratory Immunology (Ed. N. R. Rose, et al., American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1986) S. 57–66.
- 20 Mayer, M. M., Quantitative C'Fixation Analysis, Complement and Complement Fixation, in Experimental Immunochemistry (Ed. E. A. Kabat and M. M. Meyer, Thomas, Springfield, Ill., 1961), S. 214–216, 227–228.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Zubereitung einer Antikörper-Lösung mit niedriger viraler Aktivität und niedriger Antikomplement-Aktivität, wobei das Verfahren Stufen umfasst, in denen man:
 - a) eine erste Antikörper-Lösung mit einem Trialkylphosphat und einem Detergens in Kontakt bringt, bis der Titer der Lipid-umhüllten Viren, die in der ersten Antikörper-Lösung vorhanden sind, um mindestens $4\log_{10}$ verringert ist, um eine zweite Antikörper-Lösung herzustellen,
 - b) Trialkylphosphat und Detergens aus der zweiten Antikörper-Lösung entfernt, um eine dritte Antikörper-Lösung herzustellen, und man
 - c) die dritte Antikörper-Lösung über einen Zeitraum von mindestens 10 Tagen bei einem pH-Wert von 3,5 bis 5,0, einer Temperatur im Bereich von 2 bis 50°C und bei einer Ionenstärke von weniger als 0,001 inkubiert, um die Antikörper-Lösung mit der niedrigen viralen Aktivität und der niedrigen Antikomplement-Aktivität herzustellen.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin die Antikomplement-Aktivität der Antikörper-Lösung weniger als 60 CH_{50} -Einheiten/mL beträgt.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin die Antikörper-Lösung 5% G/G Antikörper umfasst und eine Antikomplement-Aktivität von weniger als 45 CH_{50} -Einheiten/mL aufweist.
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, worin die Antikörper-Lösung 5% G/G Antikörper umfasst und die Antikomplement-Aktivität weniger als 30 CH_{50} -Einheiten/mL beträgt.
5. Verfahren gemäß Anspruch 1, worin die Antikörper-Lösung 10% G/G Antikörper umfasst und eine Antikomplement-Aktivität von weniger als 60 CH_{50} -Einheiten/mL aufweist.
6. Verfahren gemäß Anspruch 5, worin die Antikörper-Lösung 10% G/G-Antikörper umfasst und eine Antikomplement-Aktivität von weniger als 45 CH_{50} -Einheiten/mL aufweist.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin mindestens 99% der Antikörper in der Antikörper-

per-Lösung monomer sind.

8. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei zwischen den Stufen b) und c) die Tonizität der dritten Antikörper-Lösung auf einen physiologischen Wert unter solchen Bedingungen eingestellt wird, dass die Ionenstärke der dritten Antikörper-Lösung nicht merklich verändert wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die Tonizität der Lösung durch Zugabe eines Kohlenhydrats zur dritten Antikörper-Lösung eingestellt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, worin das Kohlenhydrat Maltose ist.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die Tonizität der dritten Antikörper-Lösung auf einen Bereich von 230 bis 490 mOsmol/kg Lösungsmittel eingestellt wird.

12. Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei die Tonizität der dritten Antikörper-Lösung auf einen Bereich von 274 bis 309 mOsmol/kg Lösungsmittel eingestellt wird.

13. Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die Tonizität der dritten Antikörper-Lösung durch Zugabe einer Aminosäure zur dritten Antikörper-Lösung eingestellt wird.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, worin die Aminosäure Glycin ist.

15. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14, worin das Trialkylphosphat Tri-n-butylphosphat ist und das Detergens aus Polysorbat 80 und Natriumcholat ausgewählt ist.

16. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die erste Antikörper-Lösung mit Trialkylphosphat und Detergens bei einem pH-Wert von 3,5 bis 6,0 in Kontakt gebracht wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

