(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104958761 B
(45)授权公告日 2021.01.01

(21)申请号 201510158213.1

(22)申请日 2010.05.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104958761 A

(43)申请公布日 2015.10.07

(30)优先权数据
2010202125 2010.05.26 AU

(62)分案原申请数据
201080067929.6 2010.05.27

(73)专利权人 百深公司
地址 美国伊利诺伊州
专利权人 百深有限责任公司

(72)发明人 L·布鲁克施魏格 S·斯瓦托什
J·尼恩贝格尔 W·特施纳
H·A·巴特韦克 H-P·施瓦茨
T·贡丁格 B·克尔布尔
R·格劳泽伯格
A·普列夫利亚科维奇

(74)专利代理机构 上海市华诚律师事务所 31210
代理人 汤国华

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 47/18(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
A61P 37/02(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2390074 A,1945.12.04
CN 201169579 Y,2008.12.24
US 2004/0124143 A1,2004.07.01
CN 101249265 A,2008.08.27
EP 0893450 B1,2004.05.19
WO 2008083680 A2,2008.07.17
W.teschner等."A new liquid, intravenous immunoglobulin product (IGIV 10%) highly purified by a state-of-the-art process".《Vox Sang.》.2006,第92卷(第1期),全文.

审查员 杜娟

权利要求书3页 说明书48页 附图8页

(54)发明名称

从血浆制备富含IgG的组合物的方法

(57)摘要

本发明提供制备IVIG产物的改进方法。这些方法具有各种优点,例如纯化期间IgG的损失减少和最终产品的品质得到改进。在其它方面,本发明提供适于静脉内、皮下和/或肌肉内施用的水性和药物组合物。在其它实施方案中,本发明提供治疗疾病或病状的方法,其包括施用本文提供的IgG组合物。

CN 104958761 B

1.一种方法,包括下列步骤:

(a)在第一沉淀步骤中,用介于6%至10%之间的乙醇,在介于6.7至7.3之间的pH值下,使减少冷冻沉淀物的血浆组分沉淀,以获得富含IgG的上清液;

(b)在-5℃至-9℃的温度下和在介于6.7至7.3之间的pH值下,用介于20%至30%之间的乙醇使IgG从所述上清液中沉淀,以形成第一沉淀物;

(c)使步骤(b)中形成的所述第一沉淀物再悬浮,以形成悬浮液;

(d)用洗涤剂处理步骤(c)中形成的悬浮液;

(e)用介于20%至30%之间的乙醇,在介于6.7至7.3之间的pH值下,使IgG从所述悬浮液中沉淀,以形成第二沉淀物;

(f)使步骤(e)中形成的所述第二沉淀物再悬浮,以形成悬浮液;

(g)用溶剂和/或洗涤剂处理步骤(f)中形成的悬浮液;和

(h)实施至少一次离子交换色谱分级分离由此制备含有浓缩IgG的组合物,

其中,在步骤(d)之前,将介于0.02kg/kg在步骤(b)中形成的第一沉淀物至0.06kg/kg在步骤(b)中形成的第一沉淀物之间的烟雾二氧化硅与步骤(c)中形成的悬浮液混合孵育并过滤所述溶液。

2.如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(b)中,在添加乙醇之前或同时,使溶液冷却至-7℃至-9℃的温度。

3.如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(b)中的乙醇浓度为23%至27%。

4.如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(b)中的乙醇浓度为24%至26%。

5.如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(b)中的乙醇浓度为25%。

6.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,步骤(b)中,在添加乙醇之后,立即将溶液的pH调节至6.8至7.0。

7.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,步骤(b)中,在添加乙醇之后,立即将溶液的pH调节至6.9。

8.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(b)的沉淀孵育期中使溶液的pH连续维持在6.8至7.0。

9.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(b)的沉淀孵育期中使溶液的pH连续维持在6.9。

10.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其特征在于,在步骤(c)中使用如下比率的冷提取缓冲液使沉淀物再悬浮:1份沉淀物比8至30份提取缓冲液。

11.如权利要求10所述的方法,其特征在于,在步骤(c)中使用如下比率的冷提取缓冲液使沉淀物再悬浮:1份沉淀物比15份提取缓冲液。

12.如权利要求10所述的方法,其特征在于,所述提取缓冲液的pH值为4.5至5.0。

13.如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述提取缓冲液含有5mM磷酸二氢钠、5mM乙酸盐和0.051%至0.06%冰乙酸(v/v)。

14.如权利要求12所述的方法,其特征在于,所述提取缓冲液在4.5的pH值下和在0.7至0.9mS/cm的电导率下含有5mM磷酸二氢钠和5mM乙酸盐。

15.如权利要求14所述的方法,其特征在于,所述混合孵育包含孵育40至80分钟的时期,在此期间持续混合悬浮液。

16.如权利要求14所述的方法，其特征在于，所述混合孵育在2℃至8℃的温度下实施。

17.如权利要求1至5中任一项所述的方法，其特征在于，在步骤(d)之前使用深层过滤来过滤溶液。

18.如权利要求17所述的方法，其特征在于，进一步包含在完成过滤步骤后，用3.5倍至4.5倍体积的过滤器死体积洗涤深层过滤器。

19.如权利要求1至5中任一项所述的方法，其特征在于，所述沉淀步骤(a)、(b)和(e)中的一个或多个通过喷雾添加乙醇来实施。

20.如权利要求1至5中任一项所述的方法，其特征在于，在一个或多个乙醇沉淀步骤(a)、(b)和(e)期间连续调节溶液的pH值。

21.如权利要求1至5中任一项所述的方法，其特征在于，一种或多种溶液的pH值通过喷雾添加pH值调整剂来调节。

22.一种从血浆中制备富含IgG的组合物的方法，所述方法包括下列步骤：

(a)在第一沉淀步骤中，用介于6％至10％之间的乙醇，在介于7.0至7.5之间的pH下，使减少冷冻沉淀物的血浆组分沉淀，以获得第一沉淀物和第一上清液；

(b)在第二沉淀步骤中，在介于6.7至7.1之间的pH值下和在介于-7℃至-9℃之间的温度下，用介于23％至27％之间的乙醇，使IgG从所述第一上清液中沉淀，以形成第二沉淀物；

(c)使所述第二沉淀物再悬浮，以形成悬浮液；

(d)在步骤(e)之前，将介于0.02kg/kg在步骤(b)中形成的第二沉淀物至0.06kg/kg在步骤(b)中形成的第二沉淀物之间的烟雾二氧化硅与步骤(c)中形成的悬浮液混合孵育并过滤经处理的悬浮液；

(e)在第三沉淀步骤中，在介于6.7至7.3之间的pH值下，用介于22％至28％之间的乙醇，使IgG从步骤(c)中形成的所述悬浮液中沉淀，形成第三沉淀物；；

(f)使所述第三沉淀物再悬浮，以形成悬浮液；和

(g)从步骤(f)中形成的悬浮液分离可溶性组分，由此形成富含IgG的组合物。

23.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述沉淀步骤(b)中的温度为-7℃。

24.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述沉淀步骤(b)中的乙醇浓度为25％。

25.如权利要求23所述的方法，其特征在于，所述沉淀步骤(b)中的乙醇浓度为25％。

26.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述第一沉淀步骤、第二沉淀步骤、或第三沉淀步骤中的至少一个包括喷雾添加乙醇，所述喷雾添加以乙醇的细液滴或细雾方式添加。

27.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述第一沉淀步骤、第二沉淀步骤、和第三沉淀步骤均包括喷雾添加所述乙醇，所述喷雾添加以乙醇的细液滴或细雾方式添加。

28.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述第一沉淀步骤、第二沉淀步骤、或第三沉淀步骤中至少一个的pH值是在添加乙醇后，通过添加pH值调整溶液来实现。

29.如权利要求28所述的方法，其特征在于，所述添加pH值调整溶液包含喷雾添加所述pH值调整溶液。

30.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述第一沉淀步骤、第二沉淀步骤、和第三沉淀步骤的pH值均是在添加乙醇后，通过添加pH值调整溶液来实现。

31.如权利要求30所述的方法，其特征在于，所述添加pH值调整溶液包含喷雾添加pH值

调整溶液。

32.如权利要求22所述的方法，其特征在于，在添加乙醇之前和之后、在添加乙醇期间和之后或在添加乙醇之前、期间和之后，调整所述沉淀步骤的pH值。

33.如权利要求22所述的方法，其特征在于，在整个沉淀步骤中通过连续调节所述pH值来维持所述至少一个沉淀步骤的pH值。

34.如权利要求22所述的方法，其特征在于，每kg沉淀物使用介于12L至18L之间的缓冲液，使步骤(b)中形成的所述沉淀物悬浮。

35.如权利要求22所述的方法，其特征在于，每kg沉淀物使用15L的缓冲液，使步骤(b)中形成的所述沉淀物悬浮。

36.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述混合孵育包括将烟雾二氧化硅与步骤(c)中形成的悬浮液混合至少30分钟。

37.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包含离子交换色谱纯化步骤。

38.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述方法进一步包含纳米过滤步骤。

39.如权利要求38所述的方法，其特征在于，所述纳米过滤步骤包含使用平均孔径为35nm的纳米过滤器。

40.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述步骤(g)中获得的富含IgG的组合物包含步骤(a)的所述减少冷冻沉淀物的血浆组分中所存在IgG的至少85％。

41.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述步骤(g)中获得的富含IgG的组合物包含步骤(a)的所述减少冷冻沉淀物的血浆组分中所存在IgG的至少90％。

42.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述最终组合物中IgG的纯度为至少95％。

43.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述最终组合物中IgG的纯度为至少98％。

44.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述最终IgG组合物中IgG的纯度为至少99％。

45.如权利要求22所述的方法，其特征在于，所述血浆是人血浆。

从血浆制备富含IgG的组合物的方法

[0001] 本申请是申请日为2010年5月27日、申请号为201080067929.6(国际申请号为PCT/US2010/036470)、名称为“从血浆制备富含IgG的组合物的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 发明背景

[0003] 在1952年,源自人血浆的免疫球蛋白产品首次用于治疗免疫缺陷。最初,所选方法为肌肉内或皮下施用免疫球蛋白同种型G(IgG)。然而,为注射有效治疗各种疾病所需要的大量IgG,人们研发出具有较低浓度IgG(50mg/mL)的静脉内施用产品。静脉内免疫球蛋白(IVIG)通常含有源自多于一千个血液供体的血浆的混合免疫球蛋白G(IgG)免疫球蛋白。IVIG通常含有超过95%的具有完整Fc依赖性作用功能的未修饰IgG和仅痕量的免疫球蛋白A(IgA)或免疫球蛋白M(IgM),其为无菌的纯化IgG产物且主要用于治疗以下三大类医学病状:(1)免疫缺陷,例如X-连锁丙种球蛋白缺乏血症、低丙种球蛋白血症(原发性免疫缺陷)、和特征为低抗体水平的获得性免疫低下病状(继发性免疫缺陷);(2)炎症性和自身免疫病;和(3)急性感染。

[0004] 具体来说,许多患有原发性免疫缺陷病症的患者缺乏抵抗感染所需的抗体。在某些情形下,所述缺陷通常可通过通常经由静脉内施用输注纯化的IgG(即IVIG疗法)来弥补。若干种原发性免疫缺陷病症通常以所述方式来治疗,包括X-连锁丙种球蛋白缺乏血症(XLA)、普通可变性免疫缺陷(CVID)、高IgM综合症(HIM)、重症联合免疫缺陷(SCID)和某些IgG亚类缺陷(Blaese和Winkelstein,J.Patient&Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases.Towson,MD:Immune Deficiency Foundation;2007)。

[0005] 尽管IVIG治疗可极为有效地管控原发性免疫缺陷病症,但此疗法仅临时性替代体内未产生的抗体,而不能治愈疾病。因此,依赖IVIG疗法的患者需要反复给药,通常大约每月一次,至死方休。此需要对连续生产IVIG组合物产生巨大需求。然而,与通过体外表达重组DNA载体所产生的其它生物制品不同,IVIG是从人血液和献血浆分级分离得到。因此,IVIG产品不能通过简单地扩大生产规模来增加。而且可商购IVIG的数量受到血液和献血浆的可资供应量的限制。

[0006] 若干个因素促进对IVIG的需求,包括对IVIG治疗的认可、对IVIG疗法可有效作用的其它适应症的确定、和患者诊断和IVIG处方的增加。值得注意的是,自1990年以来全球对IVIG的需求已增长四倍以上,而且目前仍以每年约7%至10%的速率继续增加(Robert P.,Pharmaceutical Policy and Law,11(2009)359-367)。举例来说,澳大利亚国家血液管理局报导,澳大利亚在2008-2009财年对IVIG的需求增加10.6%(National Blood Authority Australia Annual Report 2008-2009)。

[0007] 部分由于全球需求的增加和免疫球蛋白产品可资供应量的波动,若干个国家(包括澳大利亚和英国)已开始实施需求管理程序,从而在产品短缺期间保护所述产品对需求最高的患者的供应。

[0008] 在2007年已报导,对两千六百五十万升血浆进行分级分离,产生75.2吨IVIG,平均产率为2.8克/升(Robert P.,如前所述)。据同一报导评估,预期全球的IVIG产率到2012年

将上升至约3.43克/升。然而，由于全球对IVIG的需求持续增长(预期从现在起至2015年每年增长约7％至13％)，因此需要进一步提高IVIG总体产率来满足全球需求。

[0009] IVIG产品的市场供应商采用多种IVIG制备方法。现行IVIG生产方法的一个常见问题是在纯化过程期间IgG大量损失，据估算至少为起始材料中总IgG含量的30％至35％。一个挑战在于维持病毒灭活品质和清除可导致不良反应的杂质的同时提高IgG的产率。在IVIG的当前产量下，即便产率的较小增加实际上也是极有意义的。举例来说，在2007年的产量下，效率提高2％等于增加56毫克/升，即多产生1.5吨IVIG。

[0010] 在一系列关于血清和血浆蛋白质的制备和特性的已出版学术论文的第四期中，Cohn等(J.Am.Chem.Soc.,1946,68(3):459-475)首次描述醇分级分离血浆蛋白质的方法(方法6)，其使得可分离来自人血浆的富含IgG的组分。若干年后，Oncley等(J.Am.Chem.Soc.,1949,71(2):541-550)基于Cohn的方法进行了扩展，其公开了使得可分离更纯净的IgG制剂的方法(方法9)。

[0011] 尽管所述方法为整个血浆源血液因子工业奠定了基础，但其所提供IgG制剂的纯度未高至足以治疗若干种免疫相关性疾病，包括川崎综合症(Kawasaki syndrome)、免疫性血小板减少性紫癜和原发性免疫缺陷。因此，研发出采用诸如离子交换色谱等各种技术的其它方法来提供具有较高纯度和较高浓度的IgG制剂。Hoppe等(Munch Med Wochenschr 1967(34):1749-1752)和Falksveden(瑞典专利号348942)和Falksveden和Lundblad(Methods of Plasma Protein Fractionation 1980)首先采用离子交换色谱来实现此目的。

[0012] 多种现代方法采用与管柱色谱偶联的沉淀步骤，例如辛酸盐沉淀(Lebing等，Vox Sang 2003(84):193-201)和Cohn组分(I+)II+III乙醇沉淀(Tanaka等，Braz J Med Biol Res 2000(33)37-30)。最近，Teschner等(Vox Sang,2007(92):42-55)描述产生10％IVIG产物的方法，其中首先从混合血浆除去冷冻沉淀物，然后实施经过修改的Cohn-Oncley冷乙醇分级分离，之后对中间体实施S/D处理，进行离子交换色谱，纳米过滤，并且任选地实施超滤/渗滤。

[0013] 然而，尽管所述IgG制备方法改进了纯度、安全性和产率，但在纯化过程期间仍损失大量IgG。举例来说，Teschner等报导，其方法使IgG产率提高为65％(Teschner等，如前所述)。根据不同血浆产品会议期间的报导，大规模制备IgG的平均产率，如Baxter、CSL Behring、Upfront Technology、Cangene、Prometric BioTherapeutics和Finnish Red Cross，在最终容器中在约61％至约65％的范围内。此表示在制备期间存在于混合血浆组分中的IgG损失至少约三分之一。

[0014] 因此，需要制备IVIG产物的更有效的改进方法。本发明通过提供制备产率比现行可用方法高至少6％至10％的IVIG制备方法以及通过所述方法获得的IVIG组合物来满足所述和其它需要。

[0015] 发明概述

[0016] 在一个方面，本发明提供从血浆制备富含IgG的组合物(例如IVIG组合物)的方法。有利的是，本文提供的方法显著改进制备IVIG组合物的制备方法的现有技术状态。举例来说，本文提供的方法使得可提高IgG在最终总体组合物中的产率且不降低静脉内施用所需的纯度。

[0017] 在一个方面，提供从血浆制备富含IgG的组合物的方法，其包括以下步骤：(a)在第一沉淀步骤中用介于约6％与约10％之间的醇在介于约7.0与约7.5之间的pH值下使减少冷冻沉淀物的血浆(cryo-poor plasma)组分沉淀，从而获得第一沉淀物和第一上清液，(b)在第二沉淀步骤中用介于约20％与约25％之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从第一上清液沉淀，从而形成第二沉淀物，(c)使第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液，(d)在第三沉淀步骤中用介于约22％与约28％之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从步骤(c)中形成的悬浮液沉淀，从而形成第三沉淀物，(e)使第三沉淀物再悬浮以形成悬浮液，和(f)从步骤(e)中形成的悬浮液分离可溶性组分，由此形成富含IgG的组合物，其中第一沉淀步骤、第二沉淀步骤或第三沉淀步骤中的至少一个包括喷雾添加醇。在一个实施方案中，在第一沉淀步骤中通过喷雾添加醇。在另一实施方案中，在第二沉淀步骤中通过喷雾添加醇。在再一实施方案中，在第三沉淀步骤中通过喷雾添加醇。

[0018] 在某些实施方案中，可通过喷雾添加pH值调整剂来调节一种或多种溶液的pH值。在相关实施方案中，第一沉淀步骤、第二沉淀步骤或第三沉淀步骤中至少一个的pH值是通过在添加醇之后或在添加醇之前和之后、在添加醇期间和之后或在添加醇之前、期间和之后添加pH值调整溶液来实现。在另一相关实施方案中，可通过连续调节pH值在整个沉淀反应期间维持沉淀步骤的pH值。

[0019] 在一个具体实施方案中，在添加醇后通过喷雾添加pH值调整剂来调节第一沉淀步骤的pH值。在另一实施方案中，在添加醇后通过喷雾添加pH值调整剂来调节第二沉淀步骤的pH值。在再一实施方案中，在添加醇后通过喷雾添加pH值调整剂来调节第三沉淀步骤的pH值。

[0020] 此外，本文提供的制备方法可进一步包括离子交换色谱步骤(即阴离子交换和/或阳离子交换色谱)、纳米过滤步骤、超滤/渗滤步骤或任何其它适合纯化技术，从而进一步提高IVIG制剂的纯度或品质。

[0021] 在另一方面，提供从血浆制备富含IgG的组合物的方法，其包括以下步骤：将减少冷冻沉淀物的血浆组分的pH值调节至7.0或约7.0，(b)在介于-7℃或约-7℃与-9℃或约-9℃之间的温度下将步骤(a)的减少冷冻沉淀物的血浆组分的乙醇浓度调节至25％(v/v)或约25％(v/v)，由此形成混合物，(c)从步骤(b)的混合物分离液体和沉淀物，(d)用含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液使步骤(c)的沉淀物再悬浮，其中每1000L缓冲液用600mL或约600mL冰乙酸调节缓冲液的pH值，由此形成悬浮液，(e)将细碎的二氧化硅(SiO_2)与步骤(d)的悬浮液混合至少约30分钟，(f)用压滤机过滤悬浮液，由此形成滤液，(g)用至少3倍压滤机死体积的含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液洗涤压滤机，其中每1000L缓冲液用150mL或约150mL冰乙酸调节缓冲液的pH值，由此形成洗涤溶液，(h)合并步骤(f)的滤液与步骤(g)的洗涤溶液，由此形成溶液，并用洗涤剂处理所述溶液，(i)将步骤(h)的溶液的pH值调节至7.0或约7.0并添加乙醇至25％或约25％的终浓度，由此形成沉淀物，(j)从步骤(i)的混合物分离液体和沉淀物，(k)将所述沉淀物溶解于包含溶剂或洗涤剂的水溶液中并将所述溶液维持至少60分钟，(l)在步骤(k)后使所述溶液流过阳离子交换色谱管柱并将吸附在管柱上的蛋白质洗脱于洗出液中，(m)使步骤(l)的洗出液流过阴离子交换色谱管柱以产生流出液，(n)使步骤(m)的流出液流过纳米过滤器以产生纳米滤液，(o)使步骤(n)的纳米滤液流过超滤膜以产生超滤液；和(p)相对于渗滤缓冲液来渗滤步骤(o)的超滤液以产生蛋白质浓度介于约

8％(w/v)与约12％(w/v)之间的渗滤液，由此获得具有浓缩IgG的组合物。

[0022] 在另一方面，本发明提供通过本文所述的方法制备的水性IgG组合物。一般来说，IgG组合物具有高纯度(例如至少95％、98％、99％或更高IgG含量)，所含蛋白质浓度介于约20g/L与约200g/L之间，且含有极低水平的常见IVIG污染物，例如IgG、IgM、纤维蛋白原、转铁蛋白、ACA、酰胺分解活性、PKA等。

[0023] 在另一方面，提供适用于IVIG疗法中的药用IgG组合物和制剂。所述药用制剂具有高纯度(例如至少98％、99％或更高IgG含量)，所含蛋白质浓度介于约20g/L与约200g/L之间，且含有极低水平的常见IVIG污染物，例如IgG、IgM、纤维蛋白原、转铁蛋白、ACA、酰胺分解活性、PKA等。一般来说，对药物组合物进行适当配制以供静脉内施用(即用于IVIG疗法)、皮下施用或肌肉内施用。

[0024] 在另一方面，本发明提供治疗有需要的人的免疫缺陷、自身免疫病或急性感染的方法，所述方法包括施用本文所述的药物组合物。可通过本文提供的方法治疗或管控的疾病和病状的非限制性实例包括同种异体骨髓移植、慢性淋巴细胞白血病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、儿科HIV、原发性免疫缺陷、川崎病(Kawasaki disease)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、具有高抗体接受体或具有ABO不相容性供体的肾移植、慢性疲劳综合症、难辨梭菌结肠炎(clostridium difficile colitis)、皮肌炎和多肌炎、格雷夫氏眼病(Graves'ophthalmopathy)、吉兰-巴雷综合症(Guillain-Barrésyndrome)、肌营养不良症、包涵体肌炎、兰伯特-伊顿综合症(Lambert-Eaton syndrome)、红斑狼疮、多灶性运动神经病、多发性硬化症(MS)、重症肌无力、新生儿同种免疫性血小板减少症、B19型细小病毒(Parvovirus B19)感染、天疱疮、输血后紫癜、肾移植排斥、自然流产/早产、僵硬人综合症、眼阵挛-肌阵挛综合症、成年危重病人的严重败血症和败血症性休克、中毒性表皮坏死溶解症、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、X-连锁丙种球蛋白缺乏血症、低丙球蛋白血症、原发性免疫缺陷、RRMS、阿兹海默氏病(Alzheimer's disease)和帕金森氏病(Parkinson's disease)。

[0025] 附图简述

[0026] 图1:通过ELISA法(▲)和比浊法(●)测定的IgG浓度和存在于组分II+III滤液洗涤液中的总蛋白质浓度(■)，其是作为用于在过滤后洗涤过滤装置的缓冲液的死体积数的函数。

[0027] 图2:在存在和不存在气相二氧化硅(Aerosil)(二氧化硅)处理的情形下，在pH 3.8至5.0下通过添加乙酸实施提取和澄清后，沉淀物G溶解组分中的平均PKA活性。

[0028] 图3:在存在和不存在气相二氧化硅(二氧化硅)处理的情形下，在pH 3.8至5.0下通过添加乙酸实施提取和澄清后，沉淀物G溶解组分中的平均纤维蛋白原含量。

[0029] 图4:在存在和不存在气相二氧化硅(二氧化硅)处理的情形下，在pH 3.8至5.0下通过添加乙酸实施提取和澄清后，沉淀物G溶解组分中的平均酰胺分解活性。

[0030] 图5:在4℃下孵育两周后(◆)或在室温下另外孵育一周后(■)，在pH 3.8至7.8下提取并澄清的沉淀物G溶解组分中的酰胺分解活性。

[0031] 图6:在pH 3.8至7.8下提取并澄清的沉淀物G溶解组分中的PKA活性。

[0032] 图7:经过和未经烟雾二氧化硅处理的经过修改的组分II+III滤液的纯度差异。仅通过助滤剂澄清(A)和在烟雾二氧化硅处理后澄清(B)的经过修改的组分II+III滤液的乙

酸纤维素电泳色谱图。

[0033] 图8:在大规模IgG制备中添加沉淀醇后组分II+III上清液的pH值从6.9的偏离。

[0034] 图9:在经过修改的组分II+III沉淀物提取缓冲液中冰乙酸的量与pH值的关系图。

[0035] 图10:在经过修改的组分II+III悬浮液过滤器后洗涤缓冲液中冰乙酸的量与pH值的关系图。

[0036] 定义

[0037] 本文所用的“抗体”是指实质上由一种或多种免疫球蛋白基因或其片段编码的多肽,其可特异性结合和识别分析物(抗原)。所识别的免疫球蛋白基因包括κ、λ、α、γ、δ、ε和μ恒定区基因以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链归类为κ或λ。重链归类为γ、μ、α、δ或ε,其继而分别定义免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0038] 示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元由两对多肽链构成,每一对具有一个“轻”链(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每一链的N端界定主要负责抗原识别的具有约100至110个或更多氨基酸的可变区。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指所述轻链和重链。

[0039] 本文所用的术语“超滤(UF)”涵盖多种膜过滤方法,其中流体静力压将液体压在半透膜上。保留高分子量混悬固体和溶质,而水和低分子量溶质透过所述膜。此分离方法经常用于纯化和浓缩大分子(10^3-10^6Da)溶液,尤其蛋白质溶液。根据所保留分子的大小可使用多种超滤膜。超滤的特征通常在于膜孔径介于1kDa与1000kDa之间且操作压力介于0.01巴与10巴之间,并且尤其可用于分离如蛋白质等胶体与如糖和盐等小分子。

[0040] 本文所用的术语“渗滤”是用与超滤相同的膜来实施并且是切向流动过滤。在渗滤期间,将缓冲液引入循环槽中并同时从单元操作中除去滤液。在产物存在于滞留物(例如IgG)中的方法中,渗滤将各组分从产物池洗出至滤液中,由此交换缓冲液并降低不期望物质的浓度。

[0041] 本文所用的术语“约”表示从指定值加或减10%的大致范围。例如,表述“约20%”涵盖18-22%的范围。

[0042] 本文所用的术语“混合”描述通过任何形式的搅拌使两种或更多种不同的化合物或物质均匀分布于溶液或悬浮液中的活动。本申请中所用的术语“混合”的结果并不要求所有成份皆完全均匀地分布于溶液或悬浮液中。

[0043] 本文所用的术语“溶剂”涵盖能够溶解或分散一种或多种其它物质的任何液体物质。溶剂可具有无机性质,例如水;或其可为有机液体,例如乙醇、丙酮、乙酸甲酯、乙酸乙酯、己烷、石油醚等。术语“溶剂洗涤剂处理”中所用的溶剂表示有机溶剂(例如磷酸三正丁酯),其是用于使溶液中的脂质包膜病毒灭活的溶剂洗涤剂混合物的一部分。

[0044] 本文所用的术语“洗涤剂”在本申请中可与术语“表面活性剂”或“表面活性试剂”互换使用。表面活性剂通常为两亲性有机化合物,即含有疏水基团(“尾”)和亲水基团(“头”)两者,此使得表面活性剂可溶解于有机溶剂和水两者中。表面活性剂可根据其头部中所存在的形式上带电的基团来分类。非离子型表面活性剂在其头部不具有带电基团,而离子型表面活性剂在其头部携带净电荷。两性离子型表面活性剂所含的头部具有两种相反带电基团。常见表面活性剂的某些实例包括:阴离子型(基于硫酸根、磺酸根或碳酸根阴离子):全氟辛酸盐(PFOA或PFO)、全氟辛烷磺酸盐(PFOS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基硫

酸铵和其它烷基硫酸盐、聚氧乙烯烷基硫酸钠(也称作十二烷基醚硫酸钠或SLES)、烷基苯磺酸盐;阳离子型(基于季铵阳离子):溴化鲸蜡基三甲铵(CTAB)(也称作溴化十六烷基三甲铵)和其它烷基三甲铵盐、西吡氯铵(cetylpyridinium chloride)(CPC)、聚乙氧基化牛脂胺(POEA)、苯扎氯铵(benzalkonium chloride)(BAC)、苄索氯铵(benzethonium chloride)(BZT);长链脂肪酸和其盐:包括辛酸盐、辛酸、庚酸盐、己酸、庚酸、壬酸、癸酸等;两性离子型(兼性):十二烷基甜菜碱;椰油酰胺丙基甜菜碱;椰油两性甘氨酸盐;非离子型:烷基聚(环氧乙烷)、烷基酚聚(环氧乙烷)、聚(环氧乙烷)与聚(环氧丙烷)的共聚物(商业上称作帕洛沙姆(Poloxamer)或帕洛沙胺(Poloxamine))、烷基多聚葡萄糖苷(包括辛基葡萄糖苷)、癸基麦芽糖苷、脂肪醇(例如鲸蜡醇和油醇)、椰油酰胺MEA、椰油酰胺DEA、聚山梨醇酯(Tween 20、Tween 80等)、曲拉通(Triton)洗涤剂和氧化十二烷基二甲胺。

[0045] 本文所用的术语“静脉内IgG”或“IVIG”治疗一般是指以静脉内、皮下或肌肉内方式向患者施用IgG免疫球蛋白组合物以治疗诸如免疫缺陷、炎症性疾病和自身免疫病等多种病状的治疗方法。IgG免疫球蛋白通常是从血浆混合和制备的。可使用全抗体或片段。IgG免疫球蛋白可以较高浓度(例如大于10%)配制以供皮下施用,或可配制成用于肌肉内施用。此对于特异性IgG制剂来说特别常见,所述制剂是以高于特定抗原(例如Rho D因子、百日咳毒素、破伤风毒素、肉毒毒素、狂犬病等)的平均效价的浓度制备的。为便于论述,所述皮下或肌肉内配制的IgG组合物也涵盖于本申请的术语“IVIG”中。

[0046] “治疗有效量或剂量”或“足够/有效量或剂量”意思是可产生施用后欲获得的作用的剂量。确切剂量可取决于治疗目的,且可由本领域技术人员使用已知技术来确定(例如,参见Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,1992);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pickar,Dosage Calculations(1999);和Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2003,Gennaro编著,Lippincott,Williams&Wilkins)。

[0047] 本申请所用的术语“喷雾”是指例如在醇沉淀步骤期间(例如经过修改的Cohn分级分离I或II+III沉淀步骤)以液体物质的细液滴或细雾方式向系统中递送液体物质的方式。喷雾可通过任何加压装置来实施,例如容器(例如喷雾瓶),其具有喷头或喷嘴并且是以手动或自动方式操作以从液体产生细雾。通常,在实施喷雾的同时连续搅拌或以其它方式混合接受液体物质的系统以确保所述液体在系统内快速均匀分布。

[0048] 发明详述

[0049] I.综述

[0050] 作为现代医学中的常规实践,使用浓免疫球蛋白(尤其IgG)的灭菌制剂来治疗属于以下三大类的医学病状:免疫缺陷、炎症性和自身免疫病、和急性感染。一种常用IgG产物(静脉内免疫球蛋白或IVIG)以例如10%或约10%IgG的浓度配制成用于静脉内施用。也可以例如20%或约20%IgG的浓度配制浓免疫球蛋白用于皮下或肌肉内施用。为便于论述,所述皮下或肌肉内配制的IgG组合物也涵盖于本申请的术语“IVIG”中。

[0051] 在某些方面,本发明提供制备IVIG的方法,其可提高产物的最终产率并且仍提供具有相同或较高品质且在某些情形下具有较高浓度的IVIG组合物。在一个实施方案中,本发明提供经过修改的Cohn分级分离方法,其可在一个或多个沉淀步骤中降低IgG损失。

[0052] 在另一方面,本发明提供根据本文提供的改进制备方法制备的IgG组合物。有利的

是,因本文提供的方法使产率提高,所以所述组合物的制备成本低于当前可得的可商购产品。此外,所述组合物与使用可商购方法制备的组合物同样纯净(如果并非更纯净)。重要的是,所述组合物适用于免疫缺陷、炎症性和自身免疫病、和急性感染的IVIG疗法。在一个实施方案中,IgG组合物含有10%或约10%IgG以供静脉内施用。在另一实施方案中,IgG组合物含有20%或约20%以供皮下或肌肉内施用。

[0053] 在另一方面,本发明提供根据本文提供的改进制备方法制备的IgG组合物的药物组合物和制剂。在某些实施方案中,所述组合物和制剂提供与市场上其它现有IVIG组合物相比得到改进的特性。举例来说,在某些实施方案中,本文提供的组合物和制剂可在延长时间内保持稳定。

[0054] 在另一方面,本发明提供治疗免疫缺陷、炎症性和自身免疫病、和急性感染的方法,其包括施用使用本文提供的改进方法制备的IgG组合物。

[0055] II.IVIG的制备方法

[0056] 一般来说,本发明的免疫球蛋白制剂可从任何适合起始材料制备,例如回收血浆或原料血浆。在一典型实施例中,从健康供体收集血液或血浆。通常,从物种与接受将施用所述免疫球蛋白制剂的个体相同的动物收集血液(通常称作"同源"免疫球蛋白)。通过适合程序从血液分离免疫球蛋白,例如沉淀法(醇分级分离或聚乙二醇分级分离)、色谱法(离子交换色谱、亲和色谱、免疫亲和色谱等)、超速离心法和电泳制备法等。(例如,参见Cohn等,J.Am.Chem.Soc.68:459-75(1946);Oncley等,J.Am.Chem.Soc.71:541-50(1949);Barundern等,Vox Sang.7:157-74(1962);Koblet等,Vox Sang.13:93-102(1967);美国专利号5,122,373和5,177,194;上述文献的公开内容是全文以引用方式并入本文以用于所有目的)。

[0057] 在多种情形下,免疫球蛋白是从通过本领域技术人员熟知的醇分级分离和/或离子交换色谱和亲和色谱方法产生的含γ球蛋白产物制备的。举例来说,通常使用经过纯化的Cohn组分II作为分离免疫球蛋白的起始点。起始Cohn组分II糊状物通常含有约95%IgG且包括四种IgG亚型。不同亚型存在于组分II中的比率与其存在于用于获得其的混合人血浆中的比率大致相同。在配制为可施用产物之前对组分II实施进一步纯化。举例来说,可使组分II糊状物溶解于纯化冷醇水溶液中且通过沉淀和过滤来除去杂质。在最终过滤后,可对免疫球蛋白悬浮液实施透析或渗滤(例如使用标称分子量极限小于或等于100,000道尔顿的超滤膜)以除去醇。可对溶液实施浓缩或稀释以获得期望蛋白质浓度,并且可通过本领域技术人员熟知的技术对其进行进一步纯化。

[0058] 此外,可使用附加制备步骤来富集特定同种型或亚型的免疫球蛋白。举例来说,可使用蛋白质A、蛋白质G或蛋白质H琼脂糖色谱来富集IgG免疫球蛋白或特定IgG亚型免疫球蛋白的混合物。大体参见Harlow和Lane,Using Antibodies,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1999);Harlow和Lane,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988);和美国专利号5,180,810,上述文献的公开内容是全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0059] 与上述方法不同,在一个方面,本发明提供利用减少冷冻沉淀物的起始材料制备浓缩IgG组合物的方法。一般来说,本文提供的方法利用经过修改的Cohn-Oncley醇分级分离步骤和离子交换色谱来提供较高IgG产率,同时维持与现有可商购IVIG制剂相同(如果未

改进)的品质。举例来说,在某些实施方案中,提供产生含有原料血浆起始材料中存在的IgG含量的近75%的最终总体IgG组合物的方法。所述方法代表总体IgG产率比现有技术状态的纯化方法提高至少10%至12%。举例来说,估计GAMMAGARD®LIQUID制备方法提供的最终产率介于起始材料中存在的IgG含量的约60%与65%之间。因此,本文提供的方法相对于现有IgG纯化技术提供显著改进。

[0060] 在一个实施方案中,本发明提供含有原料血浆起始材料中存在的IgG含量的至少70%的纯化IgG组合物。在另一实施方案中,提供含有原料血浆起始材料中存在的IgG含量的至少75%的纯化IgG组合物。在其它实施方案中,本文提供的纯化IgG组合物含有原料血浆起始材料中存在的IgG含量的至少约65%,或原料血浆起始材料中存在的IgG含量的至少66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%或更多。

[0061] A.经过修改的醇沉淀/离子交换色谱分级分离方法

[0062] 在一个方面,本发明提供制备适用于IVIG疗法的IgG组合物的改进方法。一般来说,相比于产生可商购IVIG产品所用的现行方法,所述方法提供的IgG制剂具有较高产率和相当的(如果并非较高)纯度。

[0063] 在一个特定方面,本发明提供从血浆制备具有浓缩IgG的组合物(例如10%IVIG)的方法,所述方法包括实施至少一个醇沉淀步骤和至少一个离子交换色谱步骤。具体来说,改进上游方法中的若干个步骤与先前方法不同,例如,在较低温度下使用25%乙醇,通过喷雾添加乙醇,通过喷雾调节pH值,和使用细碎的二氧化硅颗粒。

[0064] 在某一实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)在第一沉淀步骤中用介于约6%与约10%之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使减少冷冻沉淀物的血浆组分沉淀,从而获得富含IgG的上清液,(b)在较低温度下和介于约6.7与约7.3之间的pH值下用介于约20%与约30%之间的醇使IgG从上清液沉淀,从而形成第一沉淀物,(c)使步骤(b)中形成的第一沉淀物再悬浮以形成悬浮液,(d)用洗涤剂处理步骤(c)中形成的悬浮液,(e)用介于约20%与约30%之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从悬浮液沉淀,从而形成第二沉淀物,(f)使步骤(e)中形成的第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液,(g)用溶剂和/或洗涤剂处理步骤(f)中形成的悬浮液,和(h)实施至少一次离子交换色谱分级分离,由此制备含有浓缩IgG的组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在步骤(d)之前用细碎的二氧化硅(SiO_2)处理步骤(c)中形成的悬浮液和过滤所述溶液。

[0065] 在一个实施方案中,提供从血浆制备浓缩IgG组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a)将减少冷冻沉淀物的血浆组分的pH值调节至约7.0,(b)在介于约-5℃与约-9℃之间的温度下将步骤(a)的减少冷冻沉淀物的血浆组分的乙醇浓度调节至25%(v/v)或约25%(v/v),由此形成混合物,其中乙醇浓度可通过喷雾来调节,(c)从步骤(b)的混合物分离液体和沉淀物,(d)用含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液使步骤(c)的沉淀物再悬浮,其中每1000L缓冲液用约400mL与约700mL之间的冰乙酸调节缓冲液的pH值,由此形成悬浮液,(e)将细碎的二氧化硅(SiO_2)与步骤(d)的悬浮液混合至少约30分钟,(f)用压滤机过滤所述悬浮液,由此形成滤液,(g)用至少3倍压滤机死体积的含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液洗涤压滤机,其中每1000L缓冲液用约150mL冰乙酸调节缓冲液的pH值,由此形成洗涤溶液,(h)合并步骤(f)的滤液与步骤(g)的洗涤溶液,由此形成溶液,并且用洗涤剂处理所述溶液,(i)将步骤(h)的溶液的pH值调节至约7.0且添加乙醇至25%或约25%的终浓度,由此形成沉淀物,其

中乙醇浓度和/或pH值可通过喷雾来调节，(j)从步骤(i)的混合物分离液体和沉淀物，(k)使沉淀物溶解于包含溶剂或洗涤剂的水溶液中且将所述溶液维持至少60分钟，(l)在步骤(k)后使所述溶液流过阳离子交换色谱管柱并将吸附在管柱上的蛋白质洗脱于洗出液中，(m)使步骤(l)的洗出液流过阴离子交换色谱管柱以产生流出液(即流过液(flow-through))，(n)使步骤(m)的流出液流过纳米过滤器以产生纳米滤液，(o)使步骤(n)的纳米滤液流过超滤膜以产生超滤液，和(p)相对于渗滤缓冲液渗滤步骤(o)的超滤液以产生蛋白质浓度介于约8％(w/v)与约22％(w/v)之间的渗滤液，由此获得具有浓缩IgG的组合物。在一个实施方案中，步骤(b)的温度为-7℃或约-7℃。在一个特定实施方案中，步骤(d)中的混悬缓冲液用约600mL冰乙酸调节。

[0066] 在某些实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度可介于约8％与约12％之间，例如约8％或约9％、10％、11％或12％。在一优选实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度为10％或约10％。在另一优选实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度为11％或约11％。在另一优选实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度为12％或约12％。在其它实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度介于约13％与约17％之间，例如约13％或约14％、15％、16％或17％。在其它实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度介于约18％与约22％之间，例如约18％或约19％、20％、21％或22％。在一优选实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度为20％或约20％。在另一优选实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度为21％或约21％。在另一优选实施方案中，渗滤液的蛋白质浓度为22％或约22％。

[0067] 在本发明某些实施方案中，本文提供的方法可包括对上述分级分离方法步骤中的两者或更多步骤的改进。举例来说，各实施方案可包括以下步骤中的改进：第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III沉淀步骤、经过修改的组分II+III溶解步骤、和/或经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤。

[0068] 在一个实施方案中，在第一沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加醇。在另一实施方案中，在第一沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加pH值调整剂。在另一实施方案中，在第一沉淀步骤中进行的改进是在添加醇后调节溶液的pH值。在一相关实施方案中，在第一沉淀步骤中进行的改进是在添加醇期间维持pH值。在另一相关实施方案中，在第一沉淀步骤中进行的改进是在沉淀孵育时间期间通过连续调节溶液的pH值来维持pH值。在某些实施方案中，可通过实施一项以上所述改进步骤，来改进第一沉淀步骤。可在此步骤中实现的其它改进将通过参见下文提供的论述第一沉淀步骤的部分-经过修改的分级分离I显而易见。通过实施上述改进中的一项或多项，第一沉淀步骤的沉淀物组分中的IgG损失量将减少和/或沉淀步骤期间不可逆变性的IgG比例将降低。

[0069] 在一个实施方案中，在经过修改的组分II+III沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加醇。在另一实施方案中，在经过修改的组分II+III沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加pH值调整剂。在另一实施方案中，在经过修改的组分II+III沉淀步骤中进行的改进是在添加醇后调节溶液的pH值。在一相关实施方案中，在经过修改的组分II+III沉淀步骤中进行的改进是在添加醇期间维持pH值。在另一相关实施方案中，在经过修改的组分II+III沉淀步骤中进行的改进是在沉淀孵育时间期间通过连续调节溶液的pH值来维持pH值。在另一方面，通过将醇浓度提高至25％或约25％，改进经过修改的组分II+III沉淀步骤。在再一实施方案中，通过将孵育温度降低至介于约-7℃与-9℃之间，改进经过修改的组分II+III沉淀步骤。在某些实施方案中，经过修改的组分II+III沉淀步骤可通过实施一项以上所述

改进来进行改进。可在此步骤中实现的其它改进将通过参见下文提供的论述第二沉淀步骤的部分-经过修改的分级分离II+III显而易见。通过实施上述改进中的一项或多项，经过修改的组分II+III沉淀步骤的上清液组分中的IgG损失量将减少和/或沉淀步骤期间不可逆变性的IgG比例将降低。

[0070] 在一个实施方案中，在经过修改的组分II+III溶解步骤中进行的改进是通过将溶解缓冲液的冰乙酸含量提高至约0.06％来实现。在另一实施方案中，在经过修改的组分II+III溶解步骤中进行的改进是通过在溶解孵育时间期间通过连续调节溶液的pH值维持溶液的pH值来实现。在另一实施方案中，在经过修改的组分II+III溶解步骤中进行的改进是通过在过滤之前混合细碎的二氧化硅(SiO_2)与组分II+III悬浮液来实现。在某些实施方案中，经过修改的组分II+III溶解步骤可通过实施一项以上所述改进来进行改进。可在此步骤中实现的其它改进将通过参见下文提供的论述经过修改的组分II+III溶解步骤的部分-经过修改的组分II+III沉淀物的提取显而易见。通过实施上述改进中的一项或多项，组分II+III悬浮液中回收的IgG的量将提高和/或组分II+III悬浮液中杂质的量将降低。

[0071] 在经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中进行的一示例性改进是通过用至少约3.6死体积的每1000L含有150mL或约150mL冰乙酸的溶解缓冲液后洗涤滤器来实现。可在此步骤中实现的其它改进将通过参见下文提供的论述经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤的部分-经过修改的组分II+III悬浮液的预处理和过滤显而易见。通过实施上述改进中的一项或多项，在经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤期间损失的IgG量将减少。

[0072] 在一个实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤和经过修改的组分II+III沉淀步骤中的改进。

[0073] 在另一实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤和经过修改的组分II+III溶解步骤中的改进。

[0074] 在另一实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中的改进。

[0075] 在另一实施方案中，所述方法可包括经过修改的组分II+III沉淀步骤和经过修改的组分II+III溶解步骤中的改进。

[0076] 在另一实施方案中，所述方法可包括经过修改的组分II+III沉淀步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中的改进。

[0077] 在另一实施方案中，所述方法可包括经过修改的组分II+III溶解步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中的改进。

[0078] 在另一实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III沉淀步骤和经过修改的组分II+III溶解步骤中的改进。

[0079] 在另一实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III沉淀步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中的改进。

[0080] 在另一实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III溶解步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中的改进。

[0081] 在另一实施方案中，所述方法可包括经过修改的组分II+III沉淀步骤、经过修改的组分II+III溶解步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中的改进。

[0082] 在另一实施方案中，所述方法可包括第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III沉淀

步骤、经过修改的组分II+III溶解步骤和经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤全部中的改进。

[0083] 在某些实施方案中，本文提供的IgG纯化方法中的一个方法改进包括喷雾添加一种或多种原本通过流动添加引入血浆组分中的溶液。举例来说，在某些实施方案中，方法改进包括通过喷雾将醇(例如乙醇)添加至血浆组分中以实现使一种或多种蛋白质物质沉淀的目的。在其它实施方案中，可通过喷雾添加至血浆组分中的溶液包括但不限于pH值调整溶液、溶剂溶液、洗涤剂溶液、稀释缓冲液、电导率调整溶液等。在一优选实施方案中，通过喷雾向血浆组分中添加醇来实施一个或多个醇沉淀步骤。在一第二优选实施方案中，通过喷雾向血浆组分中添加pH值调整溶液来实施一个或多个pH值调整步骤。

[0084] 在某些实施方案中，可与任何其它方法改进组合的另一方法改进包括在添加沉淀剂(例如醇或聚乙二醇)之后和/或同时调节所沉淀血浆组分的pH值。在某些实施方案中，提供方法改进，其中在整个沉淀孵育或保持步骤期间通过连续监测和调节pH值来维持正有效地沉淀的血浆组分的pH值。在优选实施方案中，通过喷雾添加pH值调整溶液来实施pH值的调节。

[0085] 在其它实施方案中，可与任何其它方法改进组合的另一方法改进包括使用细碎的二氧化硅处理步骤来除去杂质。

[0086] 1.减少冷冻沉淀物的血浆的制备

[0087] 用于制备浓缩IgG组合物的起始材料一般是由回收血浆(即已在体外与全血分离的血浆)或原料血浆(即通过血浆去除术收集的血浆)组成。纯化方法通常始于使先前冷冻的混合血浆解冻，所述混合血浆已经过安全性和品质因素分析。解冻通常是在不高于6℃的温度下实施。在冷冻血浆在低温下完全解冻后，在冷环境(例如≤6℃)中实施离心以分离固体低温沉淀物与液体上清液。或者，可通过过滤而非离心来实施分离步骤。随后在下一步骤中处理液体上清液(也称作“减少冷冻沉淀物的血浆”，其是通过离心从刚解冻血浆除去冷不溶性蛋白质后获得)。此时可实施多个附加步骤来分离因子VIII抑制剂旁路活性(factor eight inhibitor bypass activity)(FEIBA)、因子IX-复合体、因子VII-浓缩物或抗凝血酶III-复合体。

[0088] 2.第一沉淀事件-经过修改的的分级分离I

[0089] 在此步骤中，通常将减少冷冻沉淀物的血浆冷却至约0±1℃并将pH值调节至介于约7.0与约7.5之间、优选介于约7.1与约7.3之间，最优选为约7.2。在一个实施方案中，将减少冷冻沉淀物的血浆的pH值调节至pH值为7.2或约7.2。随后在搅拌血浆的同时添加预冷却的乙醇至8％v/v或约8％v/v的目标乙醇浓度。同时使温度进一步降低至介于约-4℃与约0℃之间。在一优选实施方案中，使温度降低至-2℃或约-2℃以使诸如α_2-巨球蛋白、β_{1A}-球蛋白和β_{1C}-球蛋白、纤维蛋白原和因子VIII等污染物沉淀。通常，沉淀事件可包括至少约1小时的保持时间，但也可采用更短或更长的保持时间。随后，通过离心、过滤或另一适合方法来收集理想地含有减少冷冻沉淀物的血浆中存在的全部IgG含量的上清液(上清液I)。

[0090] 与用作减少冷冻沉淀物的血浆的第一分级分离步骤的常规方法(Cohn等，如前所述；Oncley等，如前所述)相比，本发明在若干个实施方案中提供在上清液I组分中获得提高的IgG产率的方法。在一个实施方案中，提高的IgG产率是通过喷雾添加醇来实现。在另一实施方案中，提高的IgG产率是通过喷雾添加pH值调整剂来实现。在再一实施方案中，提高的

IgG产率是通过在添加醇后调节溶液的pH值来实现。在一相关实施方案中，提高的IgG产率是通过在添加醇期间调节溶液的pH值来实现。

[0091] 在一个特定方面，改进涉及在方法中第一沉淀步骤的沉淀物组分中损失的IgG量降低。举例来说，在某些实施方案中，与Cohn方法6方案的第一沉淀步骤中损失的IgG量相比，在第一沉淀步骤的沉淀物组分中损失的IgG量降低。

[0092] 在某些实施方案中，方法改进是通过在添加沉淀用醇之后将溶液的pH值调节至介于约7.0与约7.5之间来实现。在其它实施方案中，在添加沉淀用醇之后将溶液的pH值调节至介于约7.1与约7.3之间。在其它实施方案中，在添加沉淀用醇之后将溶液的pH值调节至约7.0或约7.1、7.2、7.3、7.4或7.5。在一特定实施方案中，在添加沉淀用醇之后将溶液的pH值调节至约7.2。因此，在某些实施方案中，与在添加沉淀用醇之前而非之后调节溶液的pH值的类似沉淀步骤相比，第一沉淀步骤的沉淀物组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中，在沉淀保持或孵育时间期间通过连续调节溶液的pH值来将pH值维持在期望pH值。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0093] 在某些其它实施方案中，方法改进是通过喷雾添加而非流动添加沉淀用醇和/或用于调节pH值的溶液来实现。因此，在某些实施方案中，与通过流动添加引入醇和/或用于调节pH值的溶液的类似沉淀步骤相比，第一沉淀步骤的沉淀物组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0094] 在某些其它实施方案中，改进是通过将溶液的pH值调节至介于约7.0与约7.5之间来实现。在一优选实施方案中，将溶液的pH值调节至介于约7.1与约7.3之间。在其它实施方案中，在添加沉淀用醇之后且通过喷雾添加而非流动添加沉淀用醇和/或用于调节pH值的溶液来将溶液的pH值调节至7.0或约7.0、7.1、7.2、7.3、7.4或7.5。在一特定实施方案中，在添加沉淀用醇之后且通过喷雾添加而非流动添加沉淀用醇和/或用于调节pH值的溶液来将溶液的pH值调节至7.2或约7.2。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0095] 3.第二沉淀事件-经过修改的的分级分离II+III

[0096] 为进一步提高分级分离中的IgG含量和纯度，对上清液I实施第二沉淀步骤，其是经过修改的Cohn-Oncley组分II+III分级分离。一般来说，将溶液的pH值调节至介于约6.6与约6.8之间的pH值。在一优选实施方案中，将溶液的pH值调节至6.7或约6.7。然后在搅拌的同时将醇(优选为乙醇)添加至溶液中至介于约20％与约25％(v/v)之间的终浓度，从而使组分中的IgG沉淀。在一优选实施方案中，添加醇至25％(v/v)或约25％(v/v)的终浓度以使组分中的IgG沉淀。一般来说，所述条件不会使诸如以下等污染物沉淀：α_1-脂蛋白、α_1-抗胰蛋白酶、Gc-球蛋白、α_{1X}-糖蛋白、结合球蛋白、血浆铜蓝蛋白、转铁蛋白、血液结合素、克雷斯马斯因子(Christmas factor)的组分、甲状腺素结合球蛋白、胆碱酯酶、高血压蛋白原和白蛋白。

[0097] 在添加醇之前或同时，使溶液进一步冷却至介于约-7℃与约-9℃之间。在一优选实施方案中，使溶液冷却至-7℃或约-7℃的温度。在醇添加完成后，立即将溶液的pH值调节至介于约6.8与约7.0之间。在一优选实施方案中，将溶液的pH值调节至6.9或约6.9。通常，沉淀事件可包括至少约10小时的保持时间，但也可采用更短或更长保持时间。随后，通过离心、过滤或另一适合方法从上清液分离理想地含有减少冷冻沉淀物的血浆中存在的IgG含量的至少约85％、优选至少约90％、更优选至少约95％的沉淀物(经过修改的组分II+III)

并加以收集。与用作减少冷冻沉淀物的血浆的第二分级分离步骤的常规方法(Cohn等,如前所述;Oncley等,如前所述)相比,本发明在若干个实施方案中提供在经过修改的组分II+III沉淀物中获得提高的IgG产率的方法。在一相关实施方案中,本发明提供使得经过修改的II+III上清液中IgG损失降低的方法。

[0098] 与用作减少冷冻沉淀物的血浆的第二分级分离步骤的常规方法(Cohn等,如前所述;Oncley等,如前所述)相比,本发明在若干个实施方案中提供在经过修改的组分II+III沉淀物中获得提高的IgG产率的方法。在一个实施方案中,改进是通过喷雾添加醇来实现。在另一实施方案中,改进是通过喷雾添加pH值调整剂来实现。在另一实施方案中,改进是通过在添加醇后调节溶液的pH值来实现。在一相关实施方案中,改进是通过在添加醇期间调节溶液的pH值来实现。在另一实施方案中,改进是通过将醇(例如乙醇)浓度提高至约25%(v/v)来实现。在另一实施方案中,改进是通过将沉淀步骤的温度降低至介于约-7℃与-9℃之间来实现。在一优选实施方案中,改进是通过将醇(例如乙醇)浓度提高至约25%(v/v)和将温度降低至介于约-7℃与-9℃之间来实现。相比之下,Cohn等和Oncley等两者皆在-5℃下实施沉淀且Oncley等使用20%醇以降低沉淀物中污染物的水平。有利的是,本文提供的方法使得可实现最大IgG产率而终产物中不含高水平的污染物。

[0099] 已发现,当在添加沉淀用醇之前将溶液的pH值调节至pH值为约6.9时,部分归因于蛋白质沉淀,溶液的pH值从6.9变至介于约7.4与约7.7之间(参见图8)。因为溶液的pH值偏离6.9,所以IgG的沉淀变得不太顺利并且某些污染物的沉淀变得较为顺利。有利的是,发明人已发现,通过在添加沉淀用醇之后调节溶液的pH值,在组分II+III沉淀物中回收到较高百分比的IgG。

[0100] 因此,在一个方面,改进涉及在方法中在经过修改的组分II+III沉淀步骤的上清液组分中损失的IgG量降低。换句话说,组分II+III沉淀物中存在的起始IgG的百分比增加。在某些实施方案中,方法改进是通过在添加沉淀用醇之后或期间将溶液的pH值调节至介于约6.7与约7.1之间来实现。在另一实施方案中,方法改进是通过在沉淀孵育期中使溶液的pH值连续维持在介于约6.7与约7.1之间来实现。在其它实施方案中,在添加沉淀用醇之后或期间将溶液的pH值调节至介于约6.8与约7.0之间,或在添加沉淀用醇之后立即或在添加期间调节至pH值为约6.7、6.8、6.9、7.0或7.1。在一特定实施方案中,在添加沉淀用醇之后或期间将溶液的pH值调节至约6.9。在某些实施方案中,在沉淀孵育期中使溶液的pH值连续维持在介于约6.8至约7.0之间,或在沉淀孵育期中连续维持pH值为约6.9。因此,在某些实施方案中,与在添加沉淀用醇之前而非之后调节溶液的pH值的类似沉淀步骤相比,或与并未在整个沉淀孵育期中维持溶液的pH值的类似沉淀步骤相比,第二沉淀步骤的上清液组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中,在沉淀保持或孵育时间期间通过连续调节溶液的pH值来将pH值维持在期望pH值。在一个实施方案中,醇是乙醇。

[0101] 在另一实施方案中,方法改进是通过喷雾添加而非流动添加沉淀用醇和/或用于调节pH值的溶液来实现。因此,在某些实施方案中,与通过流动添加引入醇和/或用于调节pH值的溶液的类似沉淀步骤相比,第二沉淀步骤的上清液组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中,醇是乙醇。

[0102] 在另一实施方案中,方法改进是通过在介于约-7℃与约-9℃之间的温度下实施沉淀步骤来实现。在一个实施方案中,沉淀步骤是在-7℃或约-7℃的温度下实施。在另一实施

方案中，沉淀步骤是在-8℃或约-8℃的温度下实施。在另一实施方案中，沉淀步骤是在-9℃或约-9℃的温度下实施。在某些实施方案中，沉淀步骤的醇浓度介于约23％与约27％之间。在一优选实施方案中，醇浓度介于约24％与约26％之间。在另一优选实施方案中，醇浓度为25％或约25％。在其它实施方案中，醇浓度可为或约为23％、24％、25％、26％或27％。在一特定实施方案中，第二沉淀步骤是在-7℃或约-7℃的温度下实施且醇浓度为25％或约25％。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0103] 将第二沉淀中的醇浓度从20％(如Oncley等所用，如前所述)提高至25％和使孵育温度从-5℃(如Cohn和Oncley方法中所用)降低至-7℃或约-7℃的作用是使经过修改的组分II+III沉淀物中的IgG含量增加5％至6％。

[0104] 在另一实施方案中，方法改进是通过以下来实现：在添加沉淀用醇之后立即或在添加期间将溶液的pH值调节至介于约6.7与约7.1之间(优选为6.9或约6.9)，在沉淀孵育期中通过连续调节pH值来使溶液的pH值维持在pH值介于约6.7与约7.1之间(优选为6.9或约6.9)，和喷雾添加而非流动添加沉淀用醇和/或用于调节pH值的溶液。在另一特定实施方案中，方法改进是通过以下来实现：在介于约-7℃与约-9℃之间(优选为-7℃或约-7℃)的温度下实施沉淀步骤，和用介于约23％与约27％之间(优选为25％或约25％)的醇浓度使IgG沉淀。在另一特定实施方案中，方法改进是通过纳入所有以上提供的经过修改的组分II+III改进来实现。在一优选实施方案中，方法改进是通过以下来实现：在-7℃或约-7℃的温度下通过喷雾添加25％或约25％的乙醇使IgG沉淀，并且接着在添加沉淀用醇之后将溶液的pH值调节至6.9或约6.9。在另一优选实施方案中，在整个沉淀孵育或保持时间期间使溶液的pH值维持在6.9或约6.9。

[0105] 4.经过修改的组分II+III沉淀物的提取

[0106] 为溶解经过修改的组分II+III沉淀物的IgG含量，使用冷提取缓冲液以1份沉淀物比15份提取缓冲液的典型比率使分级分离II+III沉淀物再悬浮。可使用其它适合再悬浮比率，例如约1:8至约1:30或约1:10至约1:20或约1:12至约1:18或约1:13至约1:17或约1:14至约1:16。在某些实施方案中，再悬浮比率可为约1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30或更高。

[0107] 用于提取经过修改的II+III沉淀物的适合溶液的pH值一般介于约4.0与约5.5之间。在某些实施方案中，溶液的pH值介于约4.5与约5.0之间，在其它实施方案中，提取溶液的pH值可为约4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4或5.5。在一优选实施方案中，提取缓冲液的pH值为4.5或约4.5。在另一优选实施方案中，提取缓冲液的pH值为4.7或约4.7。在另一优选实施方案中，提取缓冲液的pH值为4.9或约4.9。一般来说，所述pH值要求可使用选自以下的缓冲剂来满足：例如乙酸盐、柠檬酸盐、磷酸二氢盐、磷酸一氢盐、其混合物等。适合缓冲液浓度通常介于约5至约100mM范围内，或为约10至约50mM或约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mM缓冲剂。

[0108] 提取缓冲液的电导率优选为约0.5mS·cm^{-1}至约2.0mS·cm^{-1}。举例来说，在某些实施方案中，提取缓冲液的电导率为约0.5mS·cm^{-1}，或约0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或约2.0mS·cm^{-1}。本领域技术人员将了解如何产生具有适当电导率的提取缓冲液。

[0109] 在一个特定实施方案中，示例性提取缓冲液可在4.5±0.2或约4.5±0.2的pH值和0.7至0.9mS/cm或约0.7至0.9mS/cm的电导率下含有5mM或约5mM的磷酸二氢钠和5mM或约5mM的乙酸盐。

[0110] 一般来说，在介于约0℃与约10℃之间或介于约2℃与约8℃之间的温度下实施提取。在某些实施方案中，可在约0℃、1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃或10℃下实施提取。在一特定实施方案中，在介于约2℃与约10℃之间的温度下实施提取。通常，提取过程将进行介于约60与约300分钟之间或介于约120与240min之间或介于约150与210分钟之间的时长，同时连续搅拌悬浮液。在某些实施方案中，提取过程将进行约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或约300分钟。在一优选实施方案中，提取过程将在连续搅拌下进行至少160分钟。

[0111] 已发现，采用含有5mM磷酸二氢钠、5mM乙酸盐和0.051％至0.06％冰乙酸(v/v)的提取缓冲液，最终IgG组合物中的产率提高可获得实质性增加而不危害终产物的纯度。乙酸量与提取缓冲液pH值的相关性在图9中示出。在一优选实施方案中，在4.5±0.2或约4.5±0.2的pH值下以糊状物与缓冲液比率为1:15或约1:15下提取组分II+III沉淀物。

[0112] 有利的是，人们已发现，与GAMMAGARD®LIQUID(Baxter Healthcare)的采用含有5mM磷酸二氢钠、5mM乙酸盐和0.051％冰乙酸(v/v)的提取缓冲液的现行制备方法相比，通过将冰乙酸含量提高至0.06％(v/v)或约0.06％(v/v)可使最终IgG组合物的产率提高获得实质性增加。与先前用于提取第二沉淀步骤(GAMMAGARD®LIQUID)中形成的沉淀物的方法相比，本发明在若干个实施方案中提供在经过修改的组分II+III悬浮液中获得提高的IgG产率的方法。

[0113] 在一个方面，改进涉及在方法中经过修改的组分II+III沉淀物的不溶性组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中，方法改进是通过以1:15(沉淀物与缓冲液)的比率用含有5mM磷酸二氢钠、5mM乙酸盐和0.06％冰乙酸(v/v)的溶液提取经过修改的组分II+III沉淀物来实现。在另一实施方案中，改进是通过在提取过程的持续期间维持溶液的pH值来实现。在一个实施方案中，在提取过程的持续过程中溶液的pH值维持在介于约4.1与约4.9之间。在一优选实施方案中，在提取过程的持续过程中溶液的pH值维持在介于约4.2与约4.8之间。在一更优选实施方案中，在提取过程的持续过程中溶液的pH值维持在介于约4.3与约4.7之间。在另一优选实施方案中，在提取过程的持续过程中溶液的pH值维持在介于约4.4与约4.6之间。在另一优选实施方案中，在提取过程的持续过程中溶液的pH值维持在4.5或约4.5。

[0114] 在另一方面，改进涉及在方法中在组分II+III溶解步骤中从组分II+III沉淀物溶解的IgG量增加。在一个实施方案中，方法改进是通过使组分II+III沉淀物溶解于每1000L含有600mL冰乙酸的溶解缓冲液中来实现。在另一实施方案中，改进涉及在方法中在组分II+III沉淀物中的IgG溶解后杂质减少。在一个实施方案中，方法改进是通过将细碎的二氧化硅(SiO_2)与组分II+III悬浮液混合至少约30分钟来实现。

[0115] 5.经过修改的组分II+III悬浮液的预处理和过滤

[0116] 为除去经过修改的组分II+III沉淀物(即经过修改的组分II+III滤饼)中的不溶性组分，通常使用深层过滤来过滤悬浮液。可用于本文提供的方法中的深层过滤器包括金属、玻璃、陶瓷、有机(例如硅藻土)深层过滤器等。适合过滤器的实例包括但不限于Cuno

50SA、Cuno 90SA和Cuno VR06过滤器(Cuno)。或者,可通过离心而非过滤来实施分离步骤。

[0117] 尽管上述制备方法改进使纯化过程初始步骤中的IgG损失最少,但在例如于pH 4.5或4.6下提取II+III糊状物时关键性的杂质(包括PKA活性、酰胺分解活性和纤维蛋白原含量)远多于在pH值为约4.9至5.0下进行提取(参见实施例2至5)。

[0118] 为消除本文提供的方法中所提取的杂质,现已发现通过在过滤/离心之前增加预处理步骤可显著提高IgG组合物的纯度。在一个实施方案中,此预处理步骤包括添加细碎的二氧化硅颗粒(例如烟雾二氧化硅、气相二氧化硅(Aerosil®)),之后孵育40至80分钟的时期,在此期间持续混合悬浮液。在某些实施方案中,孵育期可介于约50分钟与约70分钟之间,或为约30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80分钟或更久。一般来说,可在介于约0℃与约10℃之间或介于约2℃与约8℃之间实施处理。在某些实施方案中,可在约0℃、1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃或10℃下实施处理。在一特定实施方案中,在介于约2℃与约10℃之间实施处理。

[0119] 烟雾二氧化硅处理的作用通过实施例17中发现的结果来例示。在此实施例中,使组分II+III沉淀物混悬并分为两个样品,其中一者仅在过滤前用助滤剂来澄清(图7A),且其中一者在添加助滤剂和过滤之前用烟雾二氧化硅处理(图7B)。如色谱图和定量数据中可见,经过烟雾二氧化硅预处理的滤液样品的IgG纯度远高于仅用助滤剂处理的样品(68.8%对55.7%;分别比较表17与18)。

[0120] 在某些实施方案中,以介于约20g/kg II+III糊状物与约100g/kg II+III糊状物之间的浓度添加烟雾二氧化硅(即对于以1:15的比率提取的经过修改的组分II+III沉淀物来说,应以约20g/16kg II+III悬浮液至约100g/16kg II+III悬浮液的浓度或以约0.125%(w/w)至约0.625%(w/w)的终浓度添加烟雾二氧化硅)。在某些实施方案中,可以约20g/kg II+III糊状物或约25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100g/kg II+III糊状物的浓度添加烟雾二氧化硅。在一个具体实施方案中,将烟雾二氧化硅(例如气相二氧化硅380或等同物)添加至经过修改的组分II+III悬浮液中至约40g/16kg II+III的终浓度。在约2至8℃下混合至少50至70分钟。

[0121] 在某些实施方案中,将在二氧化硅处理后添加助滤剂(例如Celpure C300(Celpure)或Hyflo-Supper-Cel(World Minerals))以促进深层过滤。可以约0.1kg/kg II+III糊状物至约0.07kg/kg II+III糊状物或约0.2kg/kg II+III糊状物至约0.06kg/kg II+III糊状物或约0.3kg/kg II+III糊状物至约0.05kg/kg II+III糊状物的终浓度添加助滤剂。在某些实施方案中,可以约0.1kg/kg II+III糊状物或约0.2、0.3、0.4、0.5、0.6或0.7kg/kg II+III糊状物的终浓度添加助滤剂。

[0122] 在GAMMAGARD®LIQUID制备方法的过滤步骤期间损失较大比例的IgG。已发现,过滤后洗涤的现行方法使用1.8死体积的混悬缓冲液来清洗压滤机框架和管线,其在此步骤中不足以实现IgG的最大回收。令人惊讶的是,人们发现为有效回收经过修改的组分II+III澄清悬浮液中的总IgG,需要至少3.0死体积、优选3.6死体积的混悬缓冲液(参见实施例12和图1)。在某些实施方案中,可用任何适合混悬缓冲液来洗涤压滤机。在一特定实施方案中,洗涤缓冲液包含例如5mM磷酸二氢钠、5mM乙酸盐和0.015%冰乙酸(v/v)。

[0123] 在一个方面,改进涉及在方法中在组分II+III悬浮液过滤步骤期间损失的IgG量

降低。在一个实施方案中，方法改进是通过用至少约3.6死体积的每1000L含有150mL冰乙酸的溶解缓冲液后洗涤过滤器来实现。后洗涤缓冲液中冰乙酸量与pH值之间的关系于图10中示出。在一个实施方案中，后洗涤提取缓冲液的pH值介于约4.6与约5.3之间。在一优选实施方案中，后洗涤缓冲液的pH值介于约4.7与约5.2之间。在另一优选实施方案中，后洗涤缓冲液的pH值介于约4.8与约5.1之间。在另一优选实施方案中，后洗涤缓冲液的pH值介于约4.9与约5.0之间。

[0124] 与先前用于澄清第二沉淀步骤(GAMMAGARD®LIQUID)中形成的悬浮液的方法相比，本发明在若干个实施方案中提供在澄清的组分II+III悬浮液中获得提高的IgG产率和纯度的方法。在一个方面，改进涉及在方法中经过修改的组分II+III滤饼中损失的IgG量降低。在另一方面，改进涉及在方法中在澄清的组分II+III悬浮液中存在的杂质量降低。

[0125] 在一个实施方案中，方法改进是通过在过滤或离心澄清经过修改的组分II+III悬浮液之前纳入烟雾二氧化硅处理来实现。在某些实施方案中，烟雾二氧化硅处理包括添加约0.01kg/kg II+III糊状物至约0.07kg/kg II+III糊状物或约0.02kg/kg II+III糊状物至约0.06kg/kg II+III糊状物或约0.03kg/kg II+III糊状物至约0.05kg/kg II+III糊状物或约0.02、0.03、0.04、0.05、0.06或0.07kg/kg II+III糊状物，且混合物在介于约2℃与约8℃之间的温度下孵育介于约50分钟与约70分钟之间或约30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80分钟或更久。在另一实施方案中，方法改进是通过纳入烟雾二氧化硅处理来实现，其使残余纤维蛋白原、酰胺分解活性和/或前激肽释放酶活化因子活性的水平降低。

[0126] 在另一实施方案中，方法改进是通过在完成经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤后用介于约3与约5体积之间的过滤器死体积洗涤深层过滤器来实现。在某些实施方案中，用介于约3.5体积与约4.5体积之间或至少约2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0体积的过滤器死体积洗涤过滤器。在一特定实施方案中，用至少约3.6死体积的混悬缓冲液洗涤压滤机。

[0127] 6.洗涤剂处理

[0128] 为从经过修改的组分II+III滤液除去其它污染物，随后对样品实施洗涤剂处理。洗涤剂处理血浆源组分的方法为本领域中所熟知。一般来说，可结合本文提供的方法使用任何标准非离子型洗涤剂处理。举例来说，洗涤剂处理的示例性方案提供于下文中。

[0129] 简单的说，在搅拌下以约0.2％(w/v)的终浓度将聚山梨醇酯-80添加至经过修改的组分II+III滤液中，且在介于约2至8℃之间的温度下将样品孵育至少30分钟。然后以约8g/L的终浓度将去水柠檬酸钠混合至溶液中，并在介于约2至8℃之间的温度下在连续搅拌下将样品再孵育30分钟。

[0130] 在某些实施方案中，可使用任何适合非离子型洗涤剂。适合非离子型洗涤剂的实例包括但不限于辛基葡糖苷、洋地黄皂苷(Digitonin)、C12E8、芦布若尔(Lubrol)、曲拉通(Triton)X-100、Nonidet P-40、Tween-20(即聚山梨醇酯-20)、Tween-80(即聚山梨醇酯-80)、烷基聚(环氧乙烷)、Brij洗涤剂、烷基酚聚(环氧乙烷)、帕洛沙姆、辛基葡萄糖苷、癸基麦芽糖苷等。

[0131] 在一个实施方案中，方法改进是通过喷雾添加而非流动添加洗涤试剂(例如聚山梨醇酯-80和去水柠檬酸钠)来实现。在其它实施方案中，洗涤试剂可以固体形式添加至经

过修改的组分II+III滤液中，同时混合样品以确保添加剂快速分布。在某些实施方案中，优选通过将固体撒布在滤液的非局部表面区域上来添加固体试剂，以使得不发生局部过浓(例如在流动添加中)。

[0132] 7.第三沉淀事件-沉淀G

[0133] 为除去若干残余小蛋白质(例如白蛋白和转铁蛋白)，以25％醇浓度实施第三沉淀。简单的说，用适合pH值调整溶液(例如1M氢氧化钠或1M乙酸)将经过洗涤剂处理的II+III滤液的pH值调节至介于约6.8与7.2之间、优选介于约6.9与约7.1之间、最优选为约7.0。然后将冷醇添加至溶液中至约25％(v/v)的终浓度并在搅拌下在约-6℃至-10℃之间的温度下孵育所述混合物，从而形成第三沉淀物(即沉淀物G)。在一个实施方案中，将混合物孵育至少2小时或至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24小时或更长时间。在一优选实施方案中，将混合物孵育至少2小时。在一更优选实施方案中，将混合物孵育至少4小时。在一甚至更优选实施方案中，将混合物孵育至少8小时。

[0134] 在一个方面，方法改进涉及在方法中第三沉淀步骤的上清液组分中损失的IgG量降低。在某些实施方案中，方法改进是通过在添加沉淀用醇之后立即或添加期间将溶液的pH值调节至介于约6.8与约7.2之间来实现。在另一实施方案中，方法改进是通过在沉淀孵育期中使溶液的pH值连续维持在介于约6.8与约7.2之间来实现。在其它实施方案中，在添加沉淀用醇之后立即或在添加期间将溶液的pH值调节至介于约6.9与约7.1之间，或在添加沉淀用醇之后立即或在添加期间调节至pH值为约6.8、6.9、7.0、7.1或7.2。在一特定实施方案中，在添加沉淀用醇之后立即或在添加期间将溶液的pH值调节至约7.0。在某些实施方案中，在沉淀孵育期中使溶液的pH值连续维持在介于约6.9与约7.1之间，或在沉淀孵育期中连续维持pH值为约7.0。因此，在某些实施方案中，与在添加沉淀用醇之前而非之后调节溶液的pH值的类似沉淀步骤相比，或与并未在整个沉淀孵育期中维持溶液的pH值的类似沉淀步骤相比，在第三沉淀步骤的上清液组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中，在沉淀保持或孵育时间期间通过连续调节溶液的pH值来将pH值维持在期望pH值。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0135] 在另一实施方案中，方法改进是通过喷雾添加而非流动添加沉淀用醇和/或用于调节pH值的溶液来实现。因此，在某些实施方案中，与通过流动添加引入醇和/或用于调节pH值的溶液的类似沉淀步骤相比，在第三沉淀步骤的上清液组分中损失的IgG量降低。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0136] 8.沉淀物G(PptG)的混悬和过滤

[0137] 为溶解沉淀物G中的IgG含量，使用冷提取缓冲液来使PptG再悬浮。简单地说，在介于约0℃与约8℃之间下将沉淀物G以1比3.5溶解于注射用水(WFI)中以使得$AU_{280-320}$值介于约40至95之间。随后将搅拌至少2小时的溶液的最终pH值调节至5.2±0.2或约5.2±0.2。在一个实施方案中，用1M乙酸实施此pH值调节。为增加IgG的溶解度，使悬浮液的电导率增至介于约2.5与约6.0mS/cm之间。在一个实施方案中，通过添加氯化钠来使悬浮液的电导率增加。然后用标称孔径介于约0.1μm与约0.4μm之间的适合深层过滤器过滤混悬PptG溶液以除去任何未溶解的颗粒。在一个实施方案中，深层过滤器的标称孔径为约0.2μm(例如Cuno VR06过滤器或等同物)以获得澄清滤液。在另一实施方案中，对混悬PptG溶液进行离心以回收澄清上清液。使用电导率介于约2.5与约6.0mS/cm之间的氯化钠溶液实施过滤器的后洗

涤。通常，用于提取沉淀物G的适合溶液包括WFI和低电导率缓冲液。在一个实施方案中，低电导率缓冲液的电导率小于约10mS/cm。在一优选实施方案中，低电导率缓冲液的电导率小于约9、8、7、6、5、4、3、2或1mS/cm。在一优选实施方案中，低电导率缓冲液的电导率小于约6mS/cm。在另一优选实施方案中，低电导率缓冲液的电导率小于约4mS/cm。在另一优选实施方案中，低电导率缓冲液的电导率小于约2mS/cm。

[0138] 9.溶剂洗涤剂处理

[0139] 为使血浆源产物中可能存在的各种病毒污染物灭活，随后对澄清PptG滤液实施溶剂洗涤剂(S/D)处理。洗涤剂处理血浆源组分的方法为本领域中所熟知(综述参见Pelletier JP等，Best Pract Res Clin Haematol.2006;19(1):205-42)。一般来说，可结合本文提供的方法使用任何标准S/D处理。举例来说，S/D处理的示例性方案提供于下文中。

[0140] 简单的说，分别以约1.0％、0.3％和0.3％的终浓度将曲拉通X-100、Tween-20和磷酸三(正丁基)酯(TNBP)添加至澄清PptG滤液中。然后在介于约18℃与约25℃之间的温度下将混合物搅拌至少约1小时。

[0141] 在一个实施方案中，方法改进是通过喷雾添加而非流动添加S/D试剂(例如曲拉通X-100、Tween-20和TNBP)来实现。在其它实施方案中，可将洗涤试剂以固体形式添加至澄清PptG滤液中，对其进行混合以确保S/D组分快速分布。在某些实施方案中，优选通过将固体撒布在滤液的非局部表面区域上来添加固体试剂，以使得不发生局部过浓(例如在流动添加中)。

[0142] 10.离子交换色谱

[0143] 为从经过S/D处理的PptG滤液进一步纯化并浓缩IgG，可采用阳离子交换和/或阴离子交换色谱。使用离子交换色谱纯化并浓缩IgG的方法为本领域中所熟知。举例来说，美国专利号5,886,154描述如下方法：其中在低pH值(介于约3.8与4.5之间)下提取组分II+III沉淀物，之后使用辛酸使IgG沉淀，且最后实施两个阴离子交换色谱步骤。美国专利号6,069,236描述完全不依赖醇沉淀的色谱型IgG纯化方案。PCT专利公布号WO 2005/073252描述IgG纯化方法，其涉及提取组分II+III沉淀物、辛酸处理、PEG处理和单一阴离子交换色谱步骤。美国专利号7,186,410描述IgG纯化方法，其涉及提取组分I+II+III或组分II沉淀物，之后在碱性pH值下实施单一阴离子交换步骤。美国专利号7,553,938描述一种方法，其涉及提取组分I+II+III或组分II+III沉淀物、辛酸盐处理和一个或两个阴离子交换色谱步骤。美国专利号6,093,324描述一种纯化方法，其包括使用在介于约6.0与约6.6之间的pH值下操作的大孔阴离子交换树脂。美国专利号6,835,379描述在不存在醇分级分离的情形下依赖阳离子交换色谱的纯化方法。上述公布的公开内容都是全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0144] 在本发明方法的一个实施方案中，可对经过S/D处理的PptG滤液实施阳离子交换色谱和阴离子交换色谱两者。举例来说，在一个实施方案中，使经过S/D处理的PptG滤液流过阳离子交换管柱，其结合溶液中的IgG。然后可从所吸附的IgG洗去S/D试剂，之后用pH值介于约8.0与9.0之间的高pH值洗脱缓冲液将所吸附的IgG洗脱出管柱。以此方式，可使用阳离子交换色谱步骤从制剂除去S/D试剂，浓缩含IgG的溶液，或同时进行两者。在某些实施方案中，pH值洗脱缓冲液的pH值可介于约8.2与约8.8之间，或介于约8.4与约8.6之间，或pH值为约8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9或9.0。在一优选实施方案中，洗脱缓冲

液的pH值为约8.5±0.1。

[0145] 在某些实施方案中，可将来自阳离子交换管柱的洗出液调节至较低pH值，例如介于约5.5与约6.5之间，且用适当缓冲液稀释以使溶液的电导率降低。在某些实施方案中，可将阳离子交换洗出液的pH值调节至pH值介于约5.7与约6.3之间或介于约5.9与约6.1之间，或pH值为约5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5。在一优选实施方案中，将洗出液的pH值调节至pH值为约6.0±0.1。然后将洗出液装载至阴离子交换管柱上，其结合制剂中存在的若干污染物。在管柱装载和洗涤期间收集含有IgG组分的管柱流过液。在某些实施方案中，可以管柱模式、分批模式或两种模式的组合来实施本发明离子交换色谱步骤。

[0146] 在某些实施方案中，方法改进是通过喷雾添加而非流动添加用于调节pH值的溶液来实现。

[0147] 11.纳米过滤和超滤/渗滤

[0148] 为进一步降低本文提供的IgG组合物的病毒负载量，可使用适合纳米过滤装置对阴离子交换管柱流出液实施纳米过滤。在某些实施方案中，纳米过滤装置的平均孔径介于约15nm与约200nm之间。适用于此用途的纳米过滤器的实例包括但不限于DVD、DV 50、DV 20(Pall)、Viresolve NFP、Viresolve NFR(Millipore)、Planova 15N、20N、35N和75N(Planova)。在一具体实施方案中，纳米过滤器的平均孔径可介于约15nm与约72nm之间，或介于约19nm与约35nm之间，或为约15nm、19nm、35nm或72nm。在一优选实施方案中，纳米过滤器的平均孔径为约35nm，例如Asahi PLANOVA 35N过滤器或其等同物。

[0149] 任选地，可实施超滤/渗滤以进一步浓缩纳米滤液。在一个实施方案中，使用开放通道膜且在制备方法接近结束时实施特别设计的后洗涤和配制可使所得IgG组合物的蛋白质浓度(200mg/mL)约为现有技术IVIG(例如GAMMAGARD®LIQUID)的两倍且不影响产率和储存稳定性。大多数可商购超滤膜皆不能在不损失较多蛋白质的情形下实现200mg/mL IgG的浓度。所述膜会过早封闭且因此难以实现充分后洗涤。因此不得不使用开放通道膜构造。即使采用开放通道膜，也不得不使用特别设计的后洗涤程序以获得期望浓度而不造成较多蛋白质损失(损失小于2%)。甚至更令人惊讶的事实在于，200mg/mL的较高蛋白质浓度并不影响低pH值储存步骤的病毒灭活能力。

[0150] 在纳米过滤后，可通过超滤/渗滤进一步浓缩滤液。在一个实施方案中，可通过超滤来将纳米滤液浓缩至蛋白质浓度介于约2％与约10％(w/v)之间。在某些实施方案中，在具有开放通道筛网的盒中实施超滤且超滤膜的标称切割分子量(NMWCO)小于约100kDa或小于约90、80、70、60、50、40、30kDa或更小。在一优选实施方案中，超滤膜的NMWCO不超过50kDa。

[0151] 在完成超滤步骤后，可通过相对于适合静脉内或肌肉内施用的溶液实施渗滤来进一步浓缩浓缩物。在某些实施方案中，渗滤溶液可包含稳定和/或缓冲剂。在一优选实施方案中，稳定和缓冲剂是具有适当浓度的甘氨酸，例如浓度介于约0.20M与约0.30M之间，或介于约0.22M与约0.28M之间，或介于约0.24M与约0.26M之间，或浓度为约2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0。在一优选实施方案中，渗滤缓冲液含有0.25M或约0.25M甘氨酸。

[0152] 通常，最小交换体积为初始浓缩物体积的至少约3倍或初始浓缩物体积的至少约4、5、6、7、8、9倍或更多倍。可将IgG溶液浓缩至最终蛋白质浓度介于约5％与约25％(w/v)之

间，或介于约6％与约18％(w/v)之间，或介于约7％与约16％(w/v)之间，或介于约8％与约14％(w/v)之间，或介于约9％与约12％之间，或浓缩至终浓度为约5％或6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％或更高。在一个实施方案中，在不向浓缩溶液中添加后洗涤组分的情形下实现至少约23％的最终蛋白质浓度。在另一实施方案中，在不向浓缩溶液中添加后洗涤组分的情形下实现至少约24％的最终蛋白质浓度。在不向浓缩溶液中添加后洗涤组分的情形下实现至少约25％的最终蛋白质浓度。通常，在浓缩过程结束时，溶液的pH值将介于约4.6至5.1之间。

[0153] 在一示例性实施方案中，在超滤前将IgG组合物的pH值调节至约4.5。通过超滤将溶液浓缩至蛋白质浓度为5±2％w/v。UF膜的标称切割分子量(NMWCO)为50,000道尔顿或更小(Millipore Pellicon聚醚砜膜)。相对于10倍体积的0.25M甘氨酸溶液(pH 4.5±0.2)对浓缩物进行渗滤。在整个超滤-渗滤操作中，使溶液维持在介于约2℃至约8℃之间的温度下。在渗滤后，溶液浓缩至蛋白质浓度为至少11％(w/v)。

[0154] 12.配制

[0155] 在完成渗滤步骤后，用渗滤缓冲液将溶液的蛋白质浓度调节至终浓度介于约5％与约20％(w/v)之间，或介于约6％与约18％(w/v)之间，或介于约7％与约16％(w/v)之间，或介于约8％与约14％(w/v)之间，或介于约9％与约12％之间，或调节至终浓度为约5％或6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％或20％。在一优选实施方案中，溶液的最终蛋白质浓度介于约9％与约11％之间，更优选为约10％。

[0156] 通过利用绝对孔径不超过约0.22微米(例如约0.2微米)的膜滤器过滤来对经过配制的总体溶液实施进一步灭菌。然后以无菌方式将溶液分配至适当密封的最终容器中，且取样以供测试。

[0157] 在一个实施方案中，用渗滤缓冲液将IgG组合物进一步调节至浓度为约10.2±0.2％(w/v)。必要时，将pH值调节至约4.4至约4.9。最后，对溶液实施无菌过滤并在30℃或约30℃下孵育三周。

[0158] 13.醇添加

[0159] 有利的是，已发现，出于从血浆分级分离IgG的目的，喷雾添加而非流动添加醇使得IgG产率的损失降低。不希望受理论限制，在流动添加至血浆组分期间，醇在流体流入处的瞬时局部过浓可导致蛋白质变性和不可逆损失和/或在IgG应保留在上清液中的步骤期间导致IgG沉淀。此外，所述作用可在需要添加大体积醇时放大，例如涉及分级分离至少100L混合血浆的工业规模纯化。

[0160] 通过喷雾添加醇的作用例示于实施例14中，其中用通过流动添加(1和2)或喷雾添加(3和4)引入的8％乙醇使减少冷冻沉淀物的血浆样品沉淀。如表14中可见，在将乙醇通过喷雾添加至样品中时存在于减少冷冻沉淀物的血浆中的IgG近100％回收于上清液中，而在流动添加醇后损失4-5％的IgG。仅在此步骤中，此即导致介于约0.20g/L与0.25g/L之间的IgG损失。对于2007年的生产水平来说，此可换算为损失约530万克(5,300公斤)IgG。考虑到IVIG的现行市场价格介于每克$50与$100之间的范围内，此步骤中损失4-5％代表全球经济每年损失多达5亿美元。

[0161] 因此，在本文提供的方法的一个方面，通过喷雾添加醇来实施一个或多个沉淀步骤。在某些实施方案中，喷雾添加可通过使用任何加压装置来实施，例如具有喷头或喷嘴且

手动或自动化操作以从液体产生细雾的容器(例如喷雾瓶)。在某些实施方案中,喷雾添加是在连续搅拌或以其它方式混合系统的同时实施,从而确保液体在系统内快速均匀地分布。

[0162] 14.pH值的调节

[0163] 血浆组分的蛋白质沉淀特征高度依赖于沉淀出血浆蛋白质的溶液的pH值。自从分别在1946年和1949年引入Cohn法和Oncley法以来,科学家已利用此事实来分级分离血浆蛋白质。传统上,在添加醇之前调节血浆组分的pH值以有利于目标组分的最高回收产率。有利的是,现已发现,通过在添加醇后直接调节溶液的pH值或在添加醇的同时调节溶液的pH值可获得更明确且可重现的沉淀。人们发现,将乙醇添加至血浆组分中可导致溶液pH值波动,一般是使溶液的pH值升高。因此,通过在添加醇之前而非之后将血浆组分的pH值调节至预定pH值,将会使沉淀反应在非最适pH值下发生。

[0164] 同样,从血浆组分沉淀蛋白质会影响静电环境且由此改变溶液的pH值。因此,随着容许沉淀事件继续进行,溶液的pH值会开始偏离使得目标蛋白质物质可实现最大回收率的预定pH值。对于大部分蛋白质沉淀的沉淀事件、使用高醇含量的沉淀事件和需要较长孵育期的沉淀事件来说,尤其会发生所述pH值偏离。

[0165] 调节血浆组分的pH值的作用由实施例16中所示的结果例示。在此实施例中,在喷雾添加醇之后从上清液I组分的两个样品沉淀IgG。在添加醇之前将两个样品的pH值都调节至6.7且在添加醇之后但在10小时的沉淀孵育步骤之前将其再调节至6.9。在第一样品(参照)中,在10小时的孵育期间不调节pH值,而在样品2(连续调节)中,在10小时的孵育期间将pH值持续调节至pH 6.9。如表16中可见,在从样品除去经过修改的组分II+III沉淀物后,第一上清液含有0.2g IgG/L血浆,而在沉淀孵育期间使pH值保持恒定的第二样品仅含有0.13g IgG/L血浆。第二样品中所减少的0.07g IgG/L血浆的损失对于2007年的生产水平来说代表损失约190万克(1,900公斤)IgG。考虑到IVIG的现行市场价格介于每克$50与$100之间的范围,此步骤中损失1.5%代表全球经济每年损失多达2亿美元。

[0166] 因此,在本文提供的方法的一个方面,在添加醇后直接调节血浆组分的pH值。在相关实施方案中,可在添加醇之前和之后或在添加醇期间和之后或在添加醇之前、期间和之后调节pH值。在一相关实施方案中,在一个或多个醇沉淀事件或孵育期间连续调节溶液的pH值。在某些实施方案中,在连续搅拌或以其它方式混合系统的同时连续调节或维持溶液的pH值,从而确保pH值调整剂在系统内的快速均匀分布。

[0167] 与流动添加醇的情形类似,现已发现,流动添加大体积的pH值调整剂可引发瞬时局部pH值变化,从而导致不期望的蛋白质变性或沉淀。因此,在本文提供的方法的一个实施方案中,可通过喷雾添加将pH值调整剂引入一个或多个血浆分级分离步骤中。在本文提供的方法的另一实施方案中,可通过喷雾添加pH值调整剂来调节血浆组分或沉淀步骤的pH值。在某些实施方案中,喷雾添加可通过使用任何加压装置来实施,例如具有喷头或喷嘴且手动或自动化操作以从液体产生细雾的容器(例如喷雾瓶)。在某些实施方案中,喷雾添加是在连续搅拌或以其它方式混合系统的同时实施,从而确保液体在系统内快速均匀地分布。

[0168] III.浓缩IgG组合物

[0169] 已描述包含全抗体的IVIG组合物可用于治疗某些自体免疫性病状。(例如,参见美

国专利公布号US 2002/0114802、US 2003/0099635和US 2002/0098182)。所述参考文献中所公开的IVIG组合物包括多克隆抗体。

[0170] 1.水性IgG组合物

[0171] 在一个方面,本发明涉及通过本文提供的方法制备的水性IgG组合物。一般来说,通过本文所述的新颖方法制备的IgG组合物将具有高IgG含量和纯度。举例来说,本文提供的IgG组合物的蛋白质浓度可为至少约3%(w/v)且IgG含量大于约90%纯度。所述高纯度IgG组合物适合于治疗性施用,例如适合IVIG疗法。在一个实施方案中,IgG的浓度为约10%且用于静脉内施用。在另一实施方案中,浓度为约20%且用于皮下或肌肉内施用。

[0172] 在一个实施方案中,本发明提供通过包括以下步骤的方法制备的水性IgG组合物:(a)在第一沉淀步骤中用介于约6%与约10%之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使减少冷冻沉淀物的血浆组分沉淀,从而获得富含IgG的上清液,(b)用介于约20%与约30%之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从上清液沉淀,从而形成第一沉淀物,(c)使步骤(b)中形成的第一沉淀物再悬浮以形成悬浮液,(d)用洗涤剂处理步骤(c)中形成的悬浮液,(e)用介于约20%与约30%之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从悬浮液沉淀,从而形成第二沉淀物,(f)使步骤(e)中形成的第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液,(g)用溶剂和/或洗涤剂处理步骤(f)中形成的悬浮液,和(h)实施至少一次离子交换色谱分级分离,由此制备含有浓缩IgG的组合物。

[0173] 在一具体实施方案中,提供通过包括以下步骤的方法制备的IgG组合物:(a)将减少冷冻沉淀物的血浆组分的pH值调节至约7.0,(b)在介于约-5℃与约-9℃之间的温度下将步骤(a)中减少冷冻沉淀物的血浆组分的乙醇浓度调节至约25%(v/v),由此形成混合物,(c)从步骤(b)的混合物分离液体和沉淀物,(d)用含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液使步骤(c)的沉淀物再悬浮,其中每1000L缓冲液用600mL冰乙酸调节缓冲液的pH值,由此形成悬浮液,(e)将细碎的二氧化硅(SiO2)与步骤(d)的悬浮液混合至少约30分钟,(f)用压滤机过滤所述悬浮液,由此形成滤液,(g)用至少3倍压滤机死体积的含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液洗涤压滤机,其中每1000L缓冲液用150mL冰乙酸调节缓冲液的pH值,由此形成洗涤溶液,(h)合并步骤(f)的滤液与步骤(g)的洗涤溶液,由此形成溶液,且用洗涤剂处理所述溶液,(i)将步骤(h)的溶液的pH值调节至约7.0并添加乙醇至终浓度为约25%,由此形成沉淀物,(j)从步骤(i)的混合物分离液体和沉淀物,(k)使沉淀物溶解于包含溶剂或洗涤剂的水溶液中且将所述溶液维持至少60分钟,(l)在步骤(k)后使所述溶液流过阳离子交换色谱管柱并将吸附在管柱上的蛋白质洗脱于洗出液中,(m)使步骤(l)的洗出液流过阴离子交换色谱管柱以产生流出液,(n)使步骤(m)的流出液流过纳米过滤器以产生纳米滤液,(o)使步骤(n)的纳米滤液流过超滤膜以产生超滤液,和(p)相对于渗滤缓冲液渗滤步骤(o)的超滤液以产生蛋白质浓度介于约8%(w/v)与约12%(w/v)之间的渗滤液,由此获得具有浓缩IgG的组合物。

[0174] 在某些实施方案中,使用本文提供的方法制备水性IgG组合物,所述方法在上述分级分离方法步骤中的两个或多个中包括改进。举例来说,在某些实施方案中,改进可存在于第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III沉淀步骤、经过修改的组分II+III溶解步骤和/或经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中。

[0175] 在一个实施方案中,提供通过本文所述的纯化方法制备的水性IgG组合物,其中所

述方法包括喷雾添加一种或多种原本通过流动添加引入血浆组分中的溶液。举例来说，在某些实施方案中，所述方法包括通过喷雾将醇(例如乙醇)引入血浆组分中。在其它实施方案中，可通过喷雾添加至血浆组分中的溶液包括但不限于pH值调整溶液、溶剂溶液、洗涤剂溶液、稀释缓冲液、电导率调整溶液等。在一优选实施方案中，通过将醇喷雾添加至血浆组分中来实施一个或多个醇沉淀步骤。在一第二优选实施方案中，通过将pH值调整溶液喷雾添加至血浆组分中来实施一个或多个pH值调整步骤。

[0176] 在某些实施方案中，提供通过本文所述的纯化方法制备的水性IgG组合物，其中所述方法包括在添加沉淀剂(例如醇或聚乙二醇)之后和/或同时调节所沉淀血浆组分的pH值。在某些实施方案中，提供方法改进，其中在整个沉淀孵育或保持步骤期间通过连续监测和调节pH值来维持正有效地沉淀的血浆组分的pH值。在优选实施方案中，通过喷雾添加pH值调整溶液来实施pH值的调节。

[0177] 在一个实施方案中，本发明提供水性IgG组合物，其包含介于约30g/L与约250g/L之间的蛋白质浓度。在某些实施方案中，IgG组合物的蛋白质浓度介于约50g/L与约200g/L之间，或介于约70g/L与约150g/L之间，或介于约90g/L与约120g/L，或为所述范围内的任何适合浓度，例如约30g/L或约35g/L、40g/L、45g/L、50g/L、55g/L、60g/L、65g/L、70g/L、75g/L、80g/L、85g/L、90g/L、95g/L、100g/L、105g/L、110g/L、115g/L、120g/L、125g/L、130g/L、135g/L、140g/L、145g/L、150g/L、155g/L、160g/L、165g/L、170g/L、175g/L、180g/L、185g/L、190g/L、195g/L、200g/L、205g/L、210g/L、215g/L、220g/L、225g/L、230g/L、235g/L、240g/L、245g/L、250g/L或更高。在一优选实施方案中，水性IgG组合物的浓度为10％或约10％。在一特别优选实施方案中，组合物的浓度为10.2±0.2％(w/v)。在另一优选实施方案中，水性IgG组合物的浓度为20％或约20％。

[0178] 本文提供的方法使得可制备具有极高纯度的IgG组合物。在一个实施方案中，本文提供的组合物中至少约95％的总蛋白质为IgG。在其它实施方案中，至少约96％的蛋白质为IgG，或组合物中总蛋白质的至少约97％、98％、99％、99.5％或更多为IgG。在一优选实施方案中，组合物中至少97％的总蛋白质为IgG。在另一优选实施方案中，组合物中至少98％的总蛋白质为IgG。在另一优选实施方案中，组合物中至少99％的总蛋白质为IgG。

[0179] 类似地，本文提供的方法使得可制备含有极低水平污染物的IgG组合物。举例来说，表19提供通过本文提供的改进方法制备的三种总体IgG溶液的杂质测试的结果。在某些实施方案中，提供含有少于约140mg/L IgA的IgG组合物。在其它实施方案中，IgG组合物含有少于约60mg/L IgA、优选少于约40mg/L IgA、最优选少于约30mg/L IgA。

[0180] 在另一实施方案中，提供含有少于约50mg/L IgM的IgG组合物。在其它实施方案中，IgG组合含有少于约25mg/L IgM、优选少于约10mg/L IgM、更优选少于约5mg/L IgM、更优选少于约4mg/L IgM、更优选少于约3mg/L IgM、最优选少于约2.5mg/L IgM。

[0181] 在另一实施方案中，提供含有少于约100PL-1nmol/mL min酰胺分解活性的IgG组合物。在其它实施方案中，IgG组合物含有少于约50PL-1nmol/mL min酰胺分解活性、优选少于约25PL-1nmol/mL min酰胺分解活性、更优选少于约20PL-1nmol/mL min酰胺分解活性、更优选少于约15PL-1nmol/mL min酰胺分解活性、最优选少于约10PL-1nmol/mL min酰胺分解活性。

[0182] 在另一实施方案中，提供含有少于约20mg/L纤维蛋白原的IgG组合物。在其它实施

方案中，IgG组合物含有少于约10mg/L纤维蛋白原、优选少于约5mg/L纤维蛋白原、更优选少于约2.5mg/L纤维蛋白原、更优选少于约1mg/L纤维蛋白原、更优选少于约0.5mg/L纤维蛋白原、最优选少于约0.25mg/L纤维蛋白原。

[0183] 在另一实施方案中，提供主要由IgG单体/二聚体组成的IgG组合物。在一个实施方案中，提供至少95％、96％、97％、98％、99％、99.1％、99.2％、99.3％、99.4％、99.5％、99.6％、99.7％、99.8％或99.9％的IgG是单体或二聚体的IgG组合物。在一优选实施方案中，提供至少97％的IgG是单体或二聚体的IgG组合物。在一更优选实施方案中，至少99％的IgG是单体或二聚体。在一更优选实施方案中，至少99.5％的IgG是单体或二聚体。在一更优选实施方案中，至少99.7％的IgG是单体或二聚体。

[0184] 2.药物组合物

[0185] 在另一方面，本发明提供包含通过本文提供的方法制备的纯化IgG的药物组合物和制剂。一般来说，通过本文所述的新颖方法制备的IgG药物组合物和制剂具有高IgG含量和纯度。举例来说，本文提供的IgG药物组合物和制剂的蛋白质浓度可为至少约7％(w/v)且IgG含量可大于约95％纯度。所述高纯度IgG药物组合物和制剂适合于治疗性施用，例如适合IVIG疗法。在一优选实施方案中，配制药用IgG组合物以供静脉内施用(例如IVIG疗法)。

[0186] 在一个实施方案中，本文提供的药物组合物是通过配制使用本文提供的方法分离的水性IgG组合物来制备。一般来说，将已对经过配制的组合物实施至少一个、优选至少两个、最优选至少三个病毒灭活或除去步骤。可用于本文提供的方法的病毒灭活或除去步骤的非限制性实例包括溶剂洗涤剂处理(Horowitz等，Blood Coagul Fibrinolysis 1994(5增刊3):S21-S28；和Kreil等，Transfusion 2003(43):1023-1028，两个参考文献都是全文以引用方式明确并入本文以用于所有目的)、纳米过滤(Hamamoto等，Vox Sang 1989(56)230-236；和Yuasa等，J Gen Virol.1991(72(pt 8)):2021-2024，两个参考文献都是全文以引用方式明确并入本文以用于所有目的)和在高温下的低pH值孵育(Kempf等，Transfusion 1991(31)423-427；和Louie等，Biologicals 1994(22):13-19)。

[0187] 在某些实施方案中，提供IgG含量介于约80g/L IgG与约120g/L IgG之间的药用制剂。一般来说，所述IVIG是通过以下方式来制备：使用本文所述的方法从血浆分离IgG组合物，浓缩所述组合物，并在适合静脉内施用的溶液中配制浓缩组合物。可使用本领域技术人员已知的任何适合方法来浓缩IgG组合物。在一个实施方案中，通过超滤/渗滤来浓缩组合物。在某些实施方案中，用于浓缩组合物的超滤装置将采用标称切割分子量(NMWCO)小于约100kDa或小于约90、80、70、60、50、40、30kDa或更小的超滤膜。在一优选实施方案中，超滤膜的NMWCO不超过50kDa。可使用本领域技术人员已知的任何适合技术来实现缓冲液交换。在一具体实施方案中，通过渗滤来实现缓冲液交换。

[0188] 在一具体实施方案中，提供IgG的药物组合物，其中使用包括以下步骤的方法从血浆纯化IgG组合物：(a)在第一沉淀步骤中用介于约6％与约10％之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使减少冷冻沉淀物的血浆组分沉淀，从而获得富含IgG的上清液，(b)用介于约20％与约30％之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从上清液沉淀，从而形成第一沉淀物，(c)使步骤(b)中形成的第一沉淀物再悬浮以形成悬浮液，(d)用洗涤剂处理步骤(c)中形成的悬浮液，(e)用介于约20％与约30％之间的醇在介于约6.7与约7.3之间的pH值下使IgG从悬浮液沉淀，从而形成第二沉淀物，(f)使步骤(e)中形成的第二沉淀物再

悬浮以形成悬浮液，(g)用溶剂和/或洗涤剂处理步骤(f)中形成的悬浮液，(h)实施至少一次离子交换色谱分级分离；(i)实施溶剂洗涤剂处理；和(j)对组合物实施纳米过滤，由此制备IgG的组合物。

[0189] 在一具体实施方案中，提供IgG的药物组合物，其中使用包括以下步骤的方法从血浆纯化IgG组合物：(a)将减少冷冻沉淀物的血浆组分的pH值调节至约7.0，(b)在介于约-5℃与约-9℃之间的温度下将步骤(a)中减少冷冻沉淀物的血浆组分的乙醇浓度调节至约25％(v/v)，由此形成混合物，(c)从步骤(b)的混合物分离液体和沉淀物，(d)用含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液使步骤(c)的沉淀物再悬浮，其中每1000L缓冲液用600mL冰乙酸调节缓冲液的pH值，由此形成悬浮液，(e)将细碎的二氧化硅(SiO2)与步骤(d)的悬浮液混合至少约30分钟，(f)用压滤机过滤所述悬浮液，由此形成滤液，(g)用至少3倍压滤机死体积的含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液洗涤压滤机，其中每1000L缓冲液用150mL冰乙酸调节缓冲液的pH值，由此形成洗涤溶液，(h)合并步骤(f)的滤液与步骤(g)的洗涤溶液，由此形成溶液，且用洗涤剂处理所述溶液，(i)将步骤(h)的溶液的pH值调节至约7.0并添加乙醇至终浓度为约25％，由此形成沉淀物，(j)从步骤(i)的混合物分离液体和沉淀物，(k)使沉淀物溶解于包含溶剂或洗涤剂的水溶液中且将所述溶液维持至少60分钟，(l)在步骤(k)后使所述溶液流过阳离子交换色谱管柱并将吸附在管柱上的蛋白质洗脱于洗出液中，(m)使步骤(l)的洗出液流过阴离子交换色谱管柱以产生流出液，(n)使步骤(m)的流出液流过纳米过滤器以产生纳米滤液，(o)使步骤(n)的纳米滤液流过超滤膜以产生超滤液，和(p)相对于渗滤缓冲液渗滤步骤(o)的超滤液以产生蛋白质浓度介于约8％(w/v)与约12％(w/v)之间的渗滤液，由此获得具有浓缩IgG的组合物。

[0190] 在某些实施方案中，提供IgG的药物组合物，其中使用本文提供的方法制备IgG组合物，所述方法在上述分级分离方法步骤中的两个或多个中包括改进。举例来说，在某些实施方案中，改进可存在于第一沉淀步骤、经过修改的组分II+III沉淀步骤、经过修改的组分II+III溶解步骤和/或经过修改的组分II+III悬浮液过滤步骤中。

[0191] 在某些实施方案中，提供IgG的药物组合物，其中使用本文提供的纯化方法制备IgG组合物，其中所述方法包括喷雾添加一种或多种原本通过流动添加引入血浆组分中的溶液。举例来说，在某些实施方案中，所述方法包括通过喷雾将醇(例如乙醇)引入血浆组分中。在其它实施方案中，可通过喷雾添加至血浆组分中的溶液包括但不限于pH值调整溶液、溶剂溶液、洗涤剂溶液、稀释缓冲液、电导率调整溶液等。在一优选实施方案中，通过将醇喷雾添加至血浆组分中来实施一个或多个醇沉淀步骤。在一第二优选实施方案中，通过将pH值调整溶液喷雾添加至血浆组分中来实施一个或多个pH值调整步骤。

[0192] 在某些实施方案中，提供IgG的药物组合物，其中通过本文所述的纯化方法制备IgG组合物，其中所述方法包括在添加沉淀剂(例如醇或聚乙二醇)之后和/或同时调节所沉淀血浆组分的pH值。在某些实施方案中，提供方法改进，其中在整个沉淀孵育或保持步骤期间通过连续监测和调节pH值来维持正有效地沉淀的血浆组分的pH值。在优选实施方案中，通过喷雾添加pH值调整溶液来实施pH值的调节。

[0193] 在一个实施方案中，本发明提供IgG的药物组合物，其包含介于约70g/L与约130g/L之间的蛋白质浓度。在某些实施方案中，IgG组合物的蛋白质浓度介于约80g/L与约120g/L之间，优选介于约90g/L与约110g/L之间，最优选为约100g/L，或为所述范围内的任何适合

浓度，例如约70g/L、75g/L、80g/L、85g/L、90g/L、95g/L、100g/L、105g/L、110g/L、115g/L、120g/L、125g/L或130g/L。在一优选实施方案中，提供蛋白质浓度为100g/L或约100g/L的药物组合物。在一特别优选实施方案中，药物组合物的蛋白质浓度为102g/L或约102g/L。

[0194] 在另一实施方案中，本发明提供IgG的药物组合物，其包含介于约170g/L与约230g/L之间的蛋白质浓度。在某些实施方案中，IgG组合物的蛋白质浓度介于约180g/L与约220g/L之间，优选介于约190g/L与约210g/L之间，最优选为约200g/L，或为所述范围内的任何适合浓度，例如约170g/L、175g/L、180g/L、185g/L、190g/L、195g/L、200g/L、205g/L、210g/L、215g/L、220g/L、225g/L或230g/L。在一优选实施方案中，提供蛋白质浓度为200g/L或约200g/L的药物组合物。

[0195] 本文提供的方法使得可制备具有极高纯度的IgG药物组合物。举例来说，在一个实施方案中，本文提供的组合物中至少约95％的总蛋白质为IgG。在其它实施方案中，至少约96％的蛋白质为IgG，或组合物中总蛋白质的至少约97％、98％、99％、99.5％或更多为IgG。在一优选实施方案中，组合物中至少97％的总蛋白质为IgG。在另一优选实施方案中，组合物中至少98％的总蛋白质为IgG。在另一优选实施方案中，组合物中至少99％的总蛋白质为IgG。

[0196] 类似地，本文提供的方法使得可制备含有极低水平污染物的IgG药物组合物。举例来说，在某些实施方案中，提供含有少于约100mg/L IgA的IgG组合物。在其它实施方案中，IgG组合物含有少于约50mg/L IgA、优选少于约35mg/L IgA、最优选少于约20mg/L IgA。

[0197] 本文提供的药物组合物通常包含一种或多种适合静脉内、皮下和/或肌肉内施用的缓冲剂或pH值稳定剂。适合配制本文提供的IgG组合物的缓冲剂的非限制性实例包括甘氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、组氨酸或其它氨基酸、葡糖酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、甲酸盐、丙酸盐、碳酸盐或其调节至适当pH值的任何组合。一般来说，缓冲剂将足以将制剂中的适合pH值维持延长时间段。在一优选实施方案中，缓冲剂是甘氨酸。

[0198] 在某些实施方案中，缓冲剂在制剂中的浓度介于约100mM与约400mM之间，优选介于约150mM与约350mM之间，更优选介于约200mM与约300mM之间，最优选为约250mM。在一特别优选实施方案中，IVIG组合物包含介于约200mM与约300mM之间的甘氨酸，最优选包含约250mM甘氨酸。

[0199] 在某些实施方案中，制剂的pH值介于约4.1与约5.6之间，优选介于约4.4与约5.3之间，最优选介于约4.6与约5.1之间。在特定实施方案中，制剂的pH值可为约4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5或5.6。在一优选实施方案中，制剂的pH值介于约4.6与约5.1之间。

[0200] 在某些实施方案中，本文提供的药物组合物任选地可更包含用于调节组合物摩尔渗透压浓度的试剂。摩尔渗透压浓度试剂的非限制性实例包括甘露醇、山梨醇、甘油、蔗糖、葡萄糖、右旋糖、左旋糖、果糖、乳糖、聚乙二醇、磷酸盐、氯化钠、氯化钾、氯化钙、葡糖酸葡庚糖酸钙、二甲基砜等。

[0201] 通常，本文提供的制剂的摩尔渗透压浓度将与生理摩尔渗透压浓度相当，为约285-295mOsmol/kg(Lacy等，Drug Information Handbook-Lexi-Comp 1999:1254)。在某些实施方案中，制剂的摩尔渗透压浓度介于约200mOsmol/kg与约350mOsmol/kg之间，优选介

于约240与约300mOsmol/kg之间。在特定实施方案中，制剂的摩尔渗透压浓度为约200mOsmol/kg或210mOsmol/kg、220mOsmol/kg、230mOsmol/kg、240mOsmol/kg、245mOsmol/kg、250mOsmol/kg、255mOsmol/kg、260mOsmol/kg、265mOsmol/kg、270mOsmol/kg、275mOsmol/kg、280mOsmol/kg、285mOsmol/kg、290mOsmol/kg、295mOsmol/kg、300mOsmol/kg、310mOsmol/kg、320mOsmol/kg、330mOsmol/kg、340mOsmol/kg、340mOsmol/kg或350mOsmol/kg。

[0202] 本文提供的IgG制剂一般可在延长时间段内以液体形式保持稳定。在某些实施方案中，制剂可在室温下稳定至少约3个月，或在室温下稳定至少约4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24个月。制剂一般也可在冷藏条件(通常介于约2℃与约8℃之间)下稳定6个月或至少约18个月，或在冷藏条件下稳定至少约21、24、27、30、33、36、39、42或45个月。

[0203] IV.治疗方法

[0204] 如现代医学中的常规实践，使用浓缩免疫球蛋白(尤其IgG)的灭菌制剂来治疗属于以下三大类的医学病状：免疫缺陷、炎症性和自身免疫病、和急性感染。所述IgG制剂也可用于治疗多发性硬化症(尤其复发-缓解型多发性硬化症或RRMS)、阿兹海默氏病和帕金森氏病。本发明的纯化IgG制剂适合于所述目的以及临床上可接受的IgG制剂的其它用途。

[0205] FDA已批准使用IVIG来治疗各种适应症，包括同种异体骨髓移植、慢性淋巴细胞白血病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、儿科HIV、原发性免疫缺陷、川崎病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、和具有高抗体接受体或具有ABO不相容性供体的肾移植。在某些实施方案中，本文提供的IVIG组合物可用于治疗或管控所述疾病和病状。

[0206] 此外，一般向患者提供IVIG的标示外用法，以治疗或管控各种适应症，例如慢性疲劳综合症、难辨梭菌结肠炎、皮肌炎和多肌炎、格雷夫氏眼病、吉兰-巴雷综合症、肌营养不良症、包涵体肌炎、兰伯特-伊顿综合症、红斑狼疮、多灶性运动神经病、多发性硬化症(MS)、重症肌无力、新生儿同种免疫性血小板减少症、B19型细小病毒感染、天疱疮、输血后紫癜、肾移植排斥、自然流产/早产、僵硬人综合症、眼阵挛-肌阵挛综合症、成年危重病人的严重败血症和败血症性休克、中毒性表皮坏死溶解症、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、X-连锁丙种球蛋白缺乏血症和低丙球蛋白血症。在某些实施方案中，本文提供的IVIG组合物可用于治疗或管控所述疾病和病状。

[0207] 最后，已提出IVIG用于治疗或管控包括原发性免疫缺陷、RRMS、阿兹海默氏病和帕金森氏病在内的疾病的实验用途(美国专利申请公布号U.S.2009/0148463，其是全文以引用方式并入本文以用于所有目的)。在某些实施方案中，本文提供的IVIG组合物可用于治疗或管控原发性免疫缺陷、RRMS、阿兹海默氏病或帕金森氏病。在包括每日施用的某些实施方案中，可由医师在考虑以下个体差异后来确定施用至受试者的有效量：年龄、体重、疾病严重度、施用路径(例如静脉内与皮下)和对疗法的反应。在某些实施方案中，本发明的免疫球蛋白制剂可依每天约5mg/公斤至约2000mg/公斤的量施用至受试者。在其它实施方案中，免疫球蛋白制剂可依以下量施用：至少约10mg/公斤、至少15mg/公斤、至少20mg/公斤、至少25mg/公斤、至少30mg/公斤或至少50mg/公斤。在其它实施方案中，免疫球蛋白制剂可依每天最多约100mg/公斤、最多约150mg/公斤、最多约200mg/公斤、最多约250mg/公斤、最多约300mg/公斤、最多约400mg/公斤的剂量施用至受试者。在其它实施方案中，免疫球蛋白制剂

的剂量可增加或减少。此外，免疫球蛋白制剂可每天施用一个或多个剂量。熟悉IgG制剂所治疗疾病的临床医师可根据本领域中已知的标准来确定患者的适合剂量。

[0208] 根据本发明，完成治疗时程所需要的时间可由医师来确定且可介于短至一天至一个月以上的范围内。在某些实施方案中，治疗时程可为1至6个月。

[0209] 通过静脉内方式将有效量的IVIG制剂施用至受试者。术语“有效量”是指IVIG制剂可使受试者的疾病或病状获得改善或补救的量。欲施用至受试者的有效量可由医师在考虑以下个体差异后来确定：年龄、体重、所治疗疾病或病状、疾病严重度和对疗法的反应。在某些实施方案中，IVIG制剂可以每次施用约5mg/公斤至约2000mg/公斤的剂量施用至受试者。在某些实施方案中，剂量可为至少约5mg/kg或至少约10mg/kg或至少约20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、550mg/kg、600mg/kg、650mg/kg、700mg/kg、750mg/kg、800mg/kg、850mg/kg、900mg/kg、950mg/kg、1000mg/kg、1100mg/kg、1200mg/kg、1300mg/kg、1400mg/kg、1500mg/kg、1600mg/kg、1700mg/kg、1800mg/kg、1900mg/kg或至少约2000mg/kg。

[0210] IVIG治疗的剂量和频率尤其取决于以下因素：所治疗的疾病或病状和患者疾病或病状的严重度。一般来说，对于原发性免疫功能障碍来说，大约每3至4周施用介于约100mg/公斤体重与约400mg/公斤体重之间的剂量。对于神经性和自身免疫病来说，在3至6个月内施用最多2g/公斤体重，每月施用一次，每次时程为5天。此一般补充有维持疗法，其包括大约每3至4周施用一次介于约100mg/公斤体重与约400mg/公斤体重之间的剂量。一般来说，患者将接受大约每14至35天或大约每21至28天一次的剂量或治疗。治疗频率尤其取决于以下因素：所治疗的疾病或病状和患者疾病或病状的严重度。

[0211] 在一优选实施方案中，提供治疗有需要的人的免疫缺陷、自身免疫病或急性感染的方法，所述方法包括施用本发明的药用IVIG组合物。在一相关实施方案中，本发明提供根据本文提供的方法制备的IVIG组合物，其用于治疗有需要的人的免疫缺陷、自身免疫病或急性感染。

[0212] 在某些实施方案中，免疫缺陷、自身免疫病或急性感染是选自同种异体骨髓移植、慢性淋巴细胞白血病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、儿科HIV、原发性免疫缺陷、川崎病、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、具有高抗体接受体或具有ABO不相容性供体的肾移植、慢性疲劳综合症、难辨梭菌结肠炎、皮肌炎和多肌炎、格雷夫氏眼病、吉兰-巴雷综合症、肌营养不良症、包涵体肌炎、兰伯特-伊顿综合症、红斑狼疮、多灶性运动神经病、多发性硬化症(MS)、重症肌无力、新生儿同种免疫性血小板减少症、B19型细小病毒感染、天疱疮、输血后紫癜、肾移植排斥、自然流产/早产、僵硬人综合症、眼阵挛-肌阵挛综合症、成年危重病人的严重败血症和败血症性休克、中毒性表皮坏死溶解症、慢性淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤、X-连锁丙种球蛋白缺乏血症、低丙球蛋白血症、原发性免疫缺陷、RRMS、阿兹海默氏病和帕金森氏病。

实施例

[0213] 仅以说明性方式而非限制性方式提供以下实施例。本领域技术人员将容易地了解多种非关键参数，可对所述参数进行改变或修改而获得基本上相同或类似的结果。

[0214] 实施例1

[0215] 本实施例证实，可在过滤前通过用气相二氧化硅处理从所提取的修改的组分II+III糊状物悬浮液除去大量纤维蛋白原、酰胺分解活性、前激肽释放酶活性和脂蛋白。

[0216] 当前使用烟雾二氧化硅(气相二氧化硅380)来吸附纤维蛋白原、酰胺分解活性、前激肽释放酶活性和脂蛋白。为更详细地研究气相二氧化硅的作用，在过滤前用不同量的气相二氧化硅处理6份经过修改的组分II+III悬浮液。简单的说，使用含有5mM乙酸钠/5mM磷酸二氢钠缓冲液的溶解缓冲液(pH 4.5)以每克II+III糊状物15克溶解缓冲液的比率来再悬浮如本文所述制备的经过修改的II+III糊状物。在添加糊状物后，在介于2℃与8℃之间的温度下于pH值受控环境(pH IPC限值:4.9至5.3)中将悬浮液搅拌1小时。我们已发现，此悬浮液的pH值通常变至pH值为约5.1，且因此不需要其它pH值调节。在至少120分钟的附加提取后，将气相二氧化硅380以每克II+III糊状物0至100mg添加至容器中并将悬浮液孵育1小时。添加硅藻土，之后用Cuno 50SA过滤器实施深层过滤。在过滤后，用含有8g L^{-1}柠檬酸盐和0.2％聚山梨醇酯80的提取缓冲液(pH 5.0)洗涤过滤器并将洗涤液添加至滤液中。然后用聚山梨醇酯80处理合并的滤液和洗涤溶液以进一步溶解例如脂蛋白等疏水性杂质，且用25％乙醇(pH 7)在介于-8℃与-10℃之间的温度下使IgG沉淀。所得Ppt G沉淀物几乎为白色且具有较高IgG纯度。然后以每2克Ppt G沉淀物7克水的比率将沉淀物溶解于纯水中。

[0217] 在Cuno过滤步骤后分析IgG溶液的IgG回收率和杂质。具体来说，测量酰胺分解活性(PL-1)、PKA活性和纤维蛋白原的水平(表1)。值得注意的是，如表1中所见，使用每克II+III糊状物40至60mg气相二氧化硅380提取方案实现可接受水平的IgG回收，且显著降低酰胺分解和PKA活性，以及显著降低滤液中的纤维蛋白原的水平。与不进行气相二氧化硅处理而实施的提取相比，每克II+III糊状物添加40mg气相二氧化硅380使PKA活性和纤维蛋白原含量降低几乎90％且使酰胺分解活性降低60％，同时维持类似的IgG回收率(73％)。

[0218] 表1.

[0219] 在II+III Cuno过滤步骤中气相二氧化硅380的量的作用(以GAMMAGARD® LIQUID条件提取)

[0220]

气相二氧化硅	IgG	IgG	PL-1	PKA	纤维蛋白原
mg g^{-1} II+III糊状物	g L^{-1} 血浆	回收率	μmol min^{-1} g^{-1} 蛋白质(Ppt G)	IU g^{-1} 蛋白质 (Ppt G)	mg g^{-1}蛋白质 (Ppt G)
0	4.9	72％	1.3	2403	19.5
20	5.2	82％	0.7	974	8.2
40	4.8	73％	0.5	290	2.1
60	4.8	71％	0.3	90	0.1
80	4.2	63％	低于检出限	37	0.0
100	4.3	65％	低于检出限	16	0.0

[0221] 实施例2

[0222] 本实施例证实，可在过滤前通过用气相二氧化硅处理从所提取的修改的组分II+III糊状物悬浮液除去大量纤维蛋白原。此实验的一个目的是找出适于有效除去纤维蛋白原且不导致IgG大量损失的条件。

[0223] 使根据本文提供的方法制备的经过修改的II+III糊状物溶解于5mM乙酸钠/5mM磷酸二氢钠缓冲液(pH 4.5)中。溶解比率为每1kg II+III糊状物15kg缓冲液。所选添加至缓冲液中的乙酸的量应使得pH值在搅拌60分钟后为4.9。为使悬浮液完全均质化,在2至8℃下将其搅拌最多20小时,之后将其分为6份,每份50mL,各自于100mL烧杯中,其中已添加有不同量的气相二氧化硅380,如表2中所示。然后在气相二氧化硅存在下将II+III混悬溶液搅拌80分钟,之后加以处理和分析。搅拌后,将所有样品在4℃下于50mL法肯(falcon)管中用Heraeus Cryofuge 8500i以4600RPM离心30分钟。

[0224] 在此实验中,使用比浊法测试来实施IgG测量,选择此方法是因为在II+III混悬溶液中存在的高浓度下,其值比ELISA测试更准确。为使非特异性浊度的刺激最小,在测试前通过0.45μm过滤器过滤样品。对于IgM、IgA和纤维蛋白原来说,ELISA测试优选,这是因为所述杂质在悬浮液中的浓度较低。实验结果展示于下表2中。

[0225] 为进一步表征如实施例1中所述的气相二氧化硅处理对纤维蛋白原除去和IgG损失的影响,在每克经过修改的II+III糊状物0mg与40mg之间进一步滴定气相二氧化硅浓度。表2中所示的结果证实气相二氧化硅具有较强的减少此组分中的纤维蛋白原的能力。值得注意的是,使用每克II+III糊状物40mg可使纤维蛋白原降低几乎90%,同时仅使滤饼中的IgG回收率降低10%。

[0226] 表2.

[0227] 在以1kg II+III加15kg缓冲液的溶解比率用5mM NaAc/5mM NaH_2PO_4(pH 4.5)提取II+III并离心后,不同溶解条件下的结果

[0228]

溶解条件			上清液中的值													
					蛋白质(双缩脲法(Biuret))			IgM ELISA		IgG，比浊法		IgA ELISA		纤维蛋白原，ELISA	
条件		附加搅拌时间(min)	pH值	电导率 ($mS\ cm^{-1}$)	($g\ L^{-1}$)	(g)	($g\ L^{-1}$血浆)	$\mu g\ mL^{-1}$	($g\ L^{-1}$血浆)	$\mu g\ mL^{-1}$	($g\ L^{-1}$血浆)	$\mu g\ mL^{-1}$	($g\ L^{-1}$血浆)	$\mu g\ mL^{-1}$	($g\ L^{-1}$血浆)
空白，80 min	mg·g⁻¹ II+III糊状物	80	5.0	1.5	13.76	0.69	8.5	476	0.29	7.19	4.44	993	0.61	400	0.25
气相二氧化硅5		80	5.0	1.5	13.40	0.67	8.3	457	0.28	7.30	4.51	983	0.61	353	0.22
气相二氧化硅10		80	5.0	1.5	13.44	0.67	8.3	464	0.29	6.97	4.30	1009	0.62	272	0.17
气相二氧化硅15		80	5.0	1.5	12.01	0.60	7.4	451	0.28	7.04	4.35	1005	0.62	230	0.14
气相二氧化硅		80	5.0	1.5	12.49	0.62	7.7	468	0.29	6.77	4.18	944	0.58	95	0.06

[0229]

30															
气相二氧化硅40		80	5.0	1.5	12.21	0.61	7.5	449	0.28	6.71	4.14	899	0.56	41	0.03

[0230] 实施例3

[0231] 本实施例证实允许从经过修改的组分II+III糊状物高效提取IgG同时限制有害杂质水平的适合条件。具体来说,检查各参数,包括II+III溶解缓冲液中所用的乙酸浓度和在过滤前对所提取溶液实施的气相二氧化硅处理。

[0232] 如表3中所示,在2℃至8℃下在5mM乙酸钠、5mM磷酸二氢钠和不同量的浓乙酸中经过180分钟提取II+III糊状物,之后如表3中所示添加气相二氧化硅380。在搅拌1小时后,通过在硅藻土存在下实施Cuno 50SA过滤来使悬浮液澄清。用除乙酸量不同外与提取相同的

缓冲液，使用过滤前悬浮液体积的40％，对过滤器实施后洗涤，如表3中所示。于-8℃下在25％乙醇；8g L^{-1}柠檬酸钠和0.2％Tween 80(pH 7)存在下实施沉淀物G的沉淀，且在8小时的保持时间后，通过在-10℃下用Heraeus Cryofuge 8500i在不锈钢烧杯中以4600RPM离心30分钟来实施分离。使沉淀物以1:2的比率溶解于纯水中。

[0233] 表3.

[0234] 表3.用于调节提取缓冲液的pH值的乙酸量和澄清用气相二氧化硅的量对IgG产率和Ppt G纯度和滤饼中IgG损失的影响

[0235]

	气相二氧化硅(mg·g-1 II+III)	0	20	40	40
溶解缓冲液	乙酸(g·L-1)	0.40	0.40	0.40	0.51
	pH值	4.52	4.52	4.52	4.46
II+III提取物	pH值	5.00	5.00	5.00	4.94
	电导率(mS·cm-1)	1.340	1.340	1.340	1.344
前/后洗涤缓冲液	乙酸(g·L-1)	0.12	0.12	0.12	0.12
滤液II+III	pH值	5.02	5.02	5.02	5.02
	CAE白蛋白(%)	11.9	12.5	12.3	10.7
	CAE α/â-球蛋白	25.5	22.9	18.9	17.2
	CAE变性蛋白质	3.2	0.0	0.0	0.0

[0236]

	CAE(γ-球蛋白%)	59.4	64.6	68.8	72.1
	pH值	5.00	5.03	5.04	4.92
滤饼的IgG损失	(g·L-1血浆)	0.09	0.20	0.56	0.29
溶解的Ppt G	CAE白蛋白(%)	0.3	0.5	0.3	0.3
	CAE α/â-球蛋白	16.2	14.3	12.5	13.0
	CAE变性蛋白质	0.0	0.0	0.0	0.0
	CAE(γ-球蛋白%)	83.5	85.2	87.2	86.7
	纤维原蛋白(mg·L-1血浆)	129	32	<4	4
	PKA(IU mg^{-1}蛋白质)	126	60	9	10
	PL-1 (μmol $mL^{-1}g^{-1}$)	0.9	0.6	0.5	0.6
Ppt G上清液	pH值	7.20	7.35	7.30	6.96
Ppt G上清液的IgG损失	(g·L^{-1}血浆)	0.14	0.13	0.11	0.09

[0237] 如表3中可见，将气相二氧化硅添加至II+III糊状物悬浮液中显著影响Ppt G组分中的γ-球蛋白纯度。在无气相二氧化硅的情形下，γ-球蛋白纯度仅为83.5％，而将每克II+III糊状物40mg气相二氧化硅添加至II+III糊状物悬浮液中使γ-球蛋白纯度提高至87.2％。如所证实，气相二氧化硅处理使纤维蛋白原、PKA和酰胺分解活性显著降低。使杂质吸附于气相二氧化硅上的一个缺点在于，滤饼中的IgG损失随气相二氧化硅的量增加而提高。然而，如表3中所示，提取缓冲液中较高浓度的乙酸部分消除气相二氧化硅对滤饼中IgG损失的影响，且进一步减少上清液Ppt G组分中的IgG损失。如表3中可见，将溶解缓冲液中乙酸的量从每升糊状物400μL提高至每升糊状物510μL使滤饼中的IgG损失量减少几乎50％。有利的是，较高乙酸浓度不影响Ppt G组分中的γ-球蛋白纯度(使用每升糊状物400μL时纯度为87.2％，而使用每升糊状物510μL时纯度为86.7％)。此外，结果显示，不同乙酸量所导致的pH值差异可忽略不计，这是因为乙酸在其pka值4.75(Merck)附近具有高缓冲能力。此表明，为在大规模制备中获得较好的精确度，应根据重量添加乙酸。因此，在所研究范

围内，气相二氧化硅对纯度的影响远高于乙酸对纯度的影响，如通过CAE测量的γ-球蛋白含量所示。

[0238] 实施例4

[0239] 实施例3中所见的结果表明，在给定气相二氧化硅浓度下，滤饼中损失的IgG的量主要取决于用于调节提取缓冲液的pH值的乙酸的量。为进一步表征此作用，在纯水中将经过修改的II+III糊状物提取约120分钟以获得均质悬浮液并将其分为4部分。用1M乙酸分别将所述部分调节至pH 3.8、4.2、4.6和5.0，之后再实施120分钟的第二次提取。此后，用每克II+III糊状物40mg气相二氧化硅380实施气相二氧化硅处理。在搅拌1小时后，在硅藻土存在下通过Cuno 50SA过滤来澄清悬浮液。以过滤前悬浮液体积的100％的量用调节至上述pH值的提取缓冲液对过滤器实施后洗涤。用调节至pH 7.0的8g L^{-1}柠檬酸钠和0.2％Tween 80处理滤液，并在-8℃下用25％醇使IgG沉淀。通过在-10℃下于Heraeus Cryofuge 8500i中使用不锈钢烧杯以4600RPM离心30分钟来回收Ppt G沉淀物。然后以7克水/2克Ppt G沉淀物的比率将沉淀物溶解于纯水中。然后分析相关组分的IgG回收率、PKA活性、纤维蛋白原含量和酰胺分解活性，以确定回收率的pH值依赖性(表4)。

[0240] 表4.

[0241] 通过实施提取以及使用气相二氧化硅处理的澄清，pH依赖性地除去纤维蛋白原、PKA和酰胺分解活性

[0242]

					沉淀物G		
提取和澄清乙酸的pH值	在pH值调节后乙酸的浓度(mM)	滤饼中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	Ppt G上清液中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	IgG损失∑($g \cdot L^{-1}$血浆)	PKA(IU mg^{-1})	纤维蛋白原($mg \cdot L^{-1}$血浆)	PL-1(μmol mL^{-1} g^{-1})
3.8	75	0.02	0.85	0.87	138	243	-
4.2	25	0.04	0.53	0.57	35	182	-
4.6	10	0.07	0.05	0.12	2	99	2
5.0	5	0.19	0.06	0.25	0.6	3	0.5
3.8	75	-	-	-	116	304	3.8
4.2	25	0.02	0.34	0.36	44	313	2.6
4.6	10	0.04	0.52	0.56	8	148	1.7

[0243]

5.0	5	0.14	0.09	0.23	3	10	<0.2

[0244] 表4显示，在澄清期间，在较低pH值下用气相二氧化硅除去PKA、酰胺分解活性(PL-1)和纤维蛋白原的效率较低。根据此处获得的结果可见，有效除去PKA、酰胺分解活性(PL-1)和纤维蛋白原且同时在Ppt G组分中维持有效IgG回收率的最有效pH值为约pH 5。高乙酸浓度导致在Ppt G上清液中IgG大量损失(在75mM乙酸存在下为0.85g L^{-1})，而使滤饼中的IgG损失最少。

[0245] 实施例5

[0246] 为确定实施例4中发现的结果对气相二氧化硅处理的依赖性，重复实验，但省略气相二氧化硅处理步骤。简单的说，在纯水中将II+III糊状物提取约120分钟以获得均质悬浮

液并将其分为4部分。用1M乙酸分别将所述部分调节至pH 3.8、4.2、4.6和5.0，之后再实施120分钟的第二次提取。此后，在硅藻土存在下通过Cuno 50SA过滤来澄清悬浮液。以过滤前悬浮液体积的100％的量用调节至上述pH值的提取缓冲液对过滤器实施后洗涤。用调节至pH 7.0的8g L^{-1}柠檬酸钠和0.2％Tween 80处理滤液，并在-8℃下用25％醇使IgG沉淀。通过在-10℃下于Heraeus Cryofuge 8500i中使用不锈钢烧杯以4600RPM离心30分钟来回收Ppt G沉淀物。然后以7克水/2克Ppt G沉淀物的比率将沉淀物溶解于纯水中。然后分析相关组分的IgG回收率、PKA活性、纤维蛋白原含量和酰胺分解活性，以确定回收率的pH值依赖性(表5)。

[0247] 表5.

[0248] 通过实施提取以及不使用气相二氧化硅处理的澄清，pH依赖性地除去纤维蛋白原、PKA和酰胺分解活性

[0249]

					沉淀物G		
提取	在pH值	滤饼中的	Ppt G上清	IgG损失	PKA	纤维蛋	PL-1

[0250]

和澄清乙酸的pH值	调节后乙酸的浓度(mM)	IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	液中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	∑($g \cdot L^{-1}$血浆)	(IU mg^{-1})	白原($mg \cdot L^{-1}$血浆)	(μmol mL^{-1} g^{-1})
3.8	75	0.00	0.42	0.42	214	173	3.9
4.2	25	0.01	0.19	0.20	170	134	3.2
4.6	10	0.01	0.09	0.10	38	193	1.4
5.0	5	0.09	0.04	0.13	6.4	114	0.4
3.8	75	0.00	0.53	0.53	193	355	3.8
4.2	25	0.00	0.28	0.28	171	346	3.2
4.6	10	0.01	0.14	0.15	131	340	1.5
5.0	5	0.16	0.05	0.21	5.3	189	<0.2

[0251] 与实施例4中的结果一致，将提取/溶解缓冲液的pH值提高至5.0使滤饼中的IgG损失少量增加，然而，Ppt G上清液中IgG损失的较大降低足以抵消此损失。

[0252] 在比较实施例4与实施例5的结果时可发现，当在较低pH值(3.8、4.2和4.6)下而非在pH 5.0下(图2)提取II+III糊状物时，气相二氧化硅处理降低了存在于溶解PptG组分中的残余PKA活性的量。相反，当在较高pH值(图3;比较pH 4.6和5.0与pH 3.8和4.2)下提取II+III糊状物时，气相二氧化硅处理显著减少溶解Ppt G组分中的纤维蛋白原含量。气相二氧化硅处理似乎不影响溶解Ppt G组分中存在的残余酰胺分解活性的水平(图4)。值得注意的是，与pH 3.8、4.2和4.6相比，当在pH 5.0下提取II+III糊状物时，所有三种污染物在溶解Ppt G组分中的水平皆显著降低。

[0253] 实施例6

[0254] 如上述实施例中可见，当在约4.5至4.6的pH值下提取II+III糊状物时，使滤饼和Ppt G上清液中的IgG损失最少。然而，前述实施例中也证实，当在pH 4.5或4.6下提取II+III糊状物时，包括PKA活性、酰胺分解活性和纤维蛋白原含量在内的关键杂质比在约4.9至5.0的pH值下实施提取时高得多。因此，实施本实施例以确定，在pH 4.5下提取II+III糊状

物时所见的较高杂质水平是否可通过增加用于吸附污染物的气相二氧化硅的量来抵消，同时维持滤饼和Ppt G上清液中较低水平的IgG损失。

[0255] 以此方式，如上所述用pH值为4.5的提取缓冲液对经过修改的II+III糊状物实施提取。然后添加递增量的气相二氧化硅380直至每克II+III糊状物200mg并将悬浮液搅拌1小时。如上所述对样品实施进一步处理。

[0256] 如表6中可见，通过用大量气相二氧化硅澄清显著改进纤维蛋白原和PKA活性两者的除去。在使用大量气相二氧化硅时，滤饼中的IgG损失由于结合于气相二氧化硅上而增加，但Ppt G上清液中IgG损失的降低稍微抵消此作用。然而，重要的是，在pH 4.5下提取II+III糊状物时，大量气相二氧化硅不能减少酰胺分解活性。此外，尽管较高量的气相二氧化硅会提高γ-球蛋白纯度，但在所有情形下可能因提取和澄清中的pH值较低而仍使Ppt G低于>86％的规格限值。

[0257] 表6.

[0258] 表6给出在pH 4.5下提取和澄清时不同气相二氧化硅浓度的结果

[0259]

				沉淀物G			
气相二氧化硅的量(每克II+III的mg数)	滤饼中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	Ppt G上清液中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	IgG损失∑($g \cdot L^{-1}$血浆)	PKA (IU mg^{-1})	纤维蛋白原($mg \cdot L^{-1}$血浆)	PL-1 (μmol mL^{-1} g^{-1})	CAE(γ球蛋白%)
0	0.01	0.21	0.22	177.1	272	5.4	69.1
40	0.13	0.50	0.63	9.3	173	1.8	76.8
100	0.11	0.30	0.41	0.1	76	6.1	79.4
200	0.25	0.08	0.33	低于检出限	10	4.5	84.1

[0260] 实施例7

[0261] 本实施例证实，在II+III糊状物的再悬浮和澄清后提取缓冲液pH值对杂质除去的影响。

[0262] 在pH 4.2下使用每克II+III糊状物15克缓冲液的比率对经过修改的II+III糊状物实施低pH值提取。然后将悬浮液分为3份且用3M Tris将pH值分别调节至4.5、4.7或5.0。此后，将各溶液进一步分为两部分，在4℃或25℃下将其孵育1小时。使用pH值与各自的澄清缓冲液相同的10mM乙酸钠后洗涤缓冲液以Cuno 50(90)SA实施过滤。用8g L^{-1}柠檬酸盐和0.2％Tween 80处理滤液，且随后通过添加25％乙醇并在-10℃下保持至少8小时来使IgG沉淀。如上所述通过离心来回收沉淀物，且使沉淀物溶解于2倍体积的纯水中。使用Cuno VR06过滤装置将所得悬浮液过滤至电导率为约1.3mS cm^{-1}的最终溶液中。

[0263] 为评估不同条件，测定IgG、IgA、IgM、转铁蛋白、纤维蛋白原和其它杂质的水平。此分析的结果展示于表7中，其显示II+III糊状物悬浮液的澄清具有pH值依赖性。在4.5至5.0的pH值范围内，IgA、IgM、转铁蛋白和纤维蛋白原的量不会在大范围内变动，但在使用较低pH值缓冲液时存在较高水平的其它不期望蛋白质。据计算，所述其它杂质在pH 4.5下占总蛋白质的10％，但在pH 5下小于1％。IgG含量在pH 5.0下最高，而IgG含量和杂质水平的温度依赖性在4℃与25℃之间可忽略不计。

[0264] 表7.

[0265] 表7比较在未使用添加剂实施低pH值提取后，使II+III糊状物再悬浮且随后过滤后通过在1小时孵育期间改变pH值和温度，杂质从溶解的II+III至VR06滤液中的降低

[0266]

孵育和	孵育和	步骤	蛋白质%					
两个过滤步骤的pH值	第一过滤步骤的温度		IgG，比浊法	IgA ELISA	IgM ELISA	转铁蛋白，ELISA	纤维原蛋白，ELISA	计算的其它杂质
4.5	4℃	溶解的II+III	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 90-滤液	51.7	8.5	4.0	1.6	2.5	31.7
		溶解的Ppt G	64.4	8.3	4.4	0.1	2.8	20.0
		VR06-滤液	**71.8**	**9.5**	**5.1**	**0.1**	**3.0**	**10.6**
	25℃	溶解的II+III	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 90-滤液	52.3	8.0	4.2	1.6	2.6	31.3
		溶解的Ppt G	64.5	7.4	4.8	0.1	3.8	19.4
		VR06-滤液	**72.5**	**9.1**	**5.0**	**0.1**	**3.3**	**9.9**
4.7	4℃	溶解的II+III	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50-滤液	49.4	8.2	3.7	1.6	2.5	34.6
		溶解的Ppt G	68.8	9.5	5.0	0.1	3.5	13.2
		VR06-滤液	**76.5**	**9.8**	**5.4**	**0.1**	**3.5**	**4.7**
	25℃	溶解的II+III	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50-滤液	49.6	8.6	3.7	1.5	3.1	33.6
		溶解的Ppt G	66.9	8.8	4.9	0.1	4.1	15.2
		VR06-滤液	**75.8**	**10.2**	**5.3**	**0.1**	**4.3**	**4.3**
5.0	4℃	溶解的II+III	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50-滤液	52.5	9.3	3.4	1.7	2.1	31.0
		溶解的Ppt G	76.9	10.1	4.9	0.1	3.0	5.0
		VR06-滤液	**83.6**	**10.6**	**4.5**	**0.1**	**3.0**	**0.0**
	25℃	溶解的II+III	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50-滤液	53.4	8.9	3.4	1.8	2.6	30.0
		溶解的Ppt G	76.6	10.3	4.8	0.1	3.9	4.3
		VR06-滤液	**79.9**	**10.9**	**4.7**	**0.1**	**3.6**	**0.8**

[0267]

[0268] 如表8中可见，对溶解的Ppt G组分和VR06-滤液的进一步分析表明，使用pH值为

4.5的缓冲液实施II+III澄清和II+III滤液处理步骤导致聚集体和低分子量组分水平增加。当在25℃而非4℃下实施所述步骤时此作用进一步增强。相反，当在较高pH值(pH 5.0)下处理样品时，所得Ppt G悬浮液和滤液所含的约350kDa的材料(二聚IgG或IgA)的水平高于在pH 4.5下处理的溶液(表8)。此外，较低pH值处理所获得的酰胺分解活性水平高于pH 5.0下的处理。

[0269] 表8.

[0270] 在II+III糊状物悬浮液的孵育和过滤期间，pH值和温度对溶解的沉淀物G中PKA和酰胺分解活性和对VR06滤液中分子大小分布的影响。

[0271]

孵育和两个过滤步骤的pH值	孵育和第一过滤步骤的温度	溶解的Ppt G				VR06滤液			
		PKA活性		酰胺分解活性(PL-1)		分子大小分布(%)			
pH值	温度，℃	IU mL^{-1}	IU g^{-1}	nmol mL^{-1} min^{-1}	nmol mL^{-1} g^{-1}	>450 kDa	约350 kDa	约160 kDa	<60 kDa
4.5	4	60.2	2028	171.8	5788	28.33	6.61	63.21	1.85
4.5	25	103.4	3569	239.4	8264	29.44	6.02	61.76	2.79
4.7	4	1343.2	38029	152.1	4306	23.71	8.82	65.82	1.64
4.7	25	2215.9	67702	180.2	5506	24.54	8.02	65.06	2.38
5.0	4	134.5	4009	67.6	2015	17.81	10.78	70.03	1.38
5.0	25	186.6	5738	87.3	2685	19.16	10.54	68.84	1.46

[0272] 实施例8

[0273] 表7和8中所示的结果显示，II+III沉淀物的再悬浮应在冷藏温度(2℃至8℃)下实施且pH值应保持在pH 5.0以使高(>450KDa)和低(>70KDa)分子量组分以及具有酰胺分解活性的组分的溶解最少。在II+III糊状物混悬后实施有效澄清将降低Ppt G的色谱下游处理的杂质负载量，因此是再现地满足IVIG最终容器规格的关键。为进一步确认此发现，如上所述溶解和处理经过修改的II+III糊状物，在pH 4.2下溶解经过修改的II+III糊状物并接着调节至pH值为4.5、4.7或5.0。如表9中可见，在II+III糊状物混悬和澄清期间，在pH 5.0下除去IgM比在pH 4.5下除去更有效。在此实验中，在pH 5.0和4.5下的IgG产率类似。

[0274] 表9

[0275] 在II+III糊状物再悬浮、过滤和Ppt G沉淀的各步骤中，IgG、IgA、IgM、转铁蛋白和纤维蛋白原的产率

[0276]

				产率%				
孵育和两个过滤步骤的pH值	孵育和第一过滤步骤的温度	步骤	总蛋白质	IgG，比浊法/ELISA[1]	IgA ELISA	IgM ELISA	转铁蛋白，ELISA	纤维原蛋白，ELISA
4.5	4℃	溶解的II+III	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50滤液	100.2	92.9	100.2	97.8	118.7	86.3
		Cuno 90滤液	97.0	91.1	105.3	108.6	123.2	80.1
		Ppt G上清液	33.5	4.4	-	-	-	-
		溶解的Ppt G	71.7	83.9	75.6	89.6	5.0	66.5
		VR06滤液	**65.3**	**85.2**	**78.8**	**93.1**	**5.2**	**64.8**
	25℃	溶解的II+III	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50滤液	101.0	92.3	100.9	104.4	113.2	96.7
		Cuno 90滤液	97.2	92.4	98.9	113.4	123.9	84.6
		Ppt G上清液	33.8	5.1	-	-	-	-
		溶解的Ppt G	72.9	85.5	68.8	97.5	4.7	89.9
		VR06滤液	**68.3**	**90.0**	**78.9**	**95.9**	**5.5**	**75.0**
4.7	4℃	溶解的II+III	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50滤液	93.5	83.9	98.0	98.0	115.9	75.3
		Ppt G上清液	27.5	2.7	-	-	-	-
		溶解的Ppt G	64.8	81.1	78.2	90.2	4.5	73.9
		VR06滤液	**60.5**	**84.1**	**75.0**	**92.1**	**5.1**	**70.2**
	25℃	溶解的II+III	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50滤液	94.7	85.3	103.1	98.5	113.8	95.8
		Ppt G上清液	28.5	4.1	-	-	-	-
		溶解的Ppt G	65.3	79.5	73.1	90.9	5.0	87.0
		VR06滤液	**61.9**	**85.3**	**80.7**	**93.0**	**5.3**	**86.9**

[0277]

5.0	4℃	溶解的II+III	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50滤液	86.1	82.3	101.5	81.5	117.5	59.8
		Ppt G上清液	26.0	4.1	-	-	-	-
		溶解的Ppt G	58.1	81.2	74.8	79.3	4.5	57.0
		VR06滤液	**54.0**	**82.1**	**72.5**	**67.8**	**4.7**	**52.5**
	25℃	溶解的II+III	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50滤液	88.0	85.4	99.7	83.2	124.1	75.4
		Ppt G上清液	23.4	1.5	-	-	-	-
		溶解的Ppt G	60.5	84.2	79.0	81.6	4.5	78.2
		VR06滤液	**59.0**	**85.7**	**82.0**	**77.6**	**4.5**	**69.0**

[0278] 实施例9

[0279] 为评估在II+III糊状物提取步骤中使滤液中的蛋白质分解活性最小的最适pH值，在pH 3.8至7.8的较大范围内改变提取和过滤期间的pH值。出于此目的，在低pH值下以1+8的比率提取经过修改的II+III糊状物。在短时间搅拌后，为获得均质分散液，将悬浮液分为8部分，用乙酸或Tris缓冲液将pH值调节至pH 3.8、4.2、4.6、5.0、6.6、7.0、7.4或7.8，且再提取120分钟。此后，将pH值调节至5.1且在50mL法肯管中通过离心实施澄清。在标准条件下实施Ppt G沉淀。如图5和图6所示，在溶解的Ppt G组分中测量酰胺分解活性和PKA。

[0280] 如图5中在4℃下储存的样品中可见，当在pH 5.0下提取II+III糊状物时，酰胺分解活性最小。另外强调的是，样品不应在高温(室温)下保持延长时间，这是因为在溶解的Ppt G组分在室温下储存一周后酰胺分解活性升高。类似地，如图6中可见，当在pH 5.0或更高pH值下提取II+III糊状物时，PKA活性最小。

[0281] 实施例10

[0282] 本实施例评估在提取和澄清期间IgG产率损失的pH值依赖性。简单的说，以每克II+III糊状物15克纯水的比率使110克经过修改的II+III糊状物再悬浮，之后提取120分钟。然后将样品分为4部分并用乙酸将pH值调节至pH 3.8、4.2、4.6或5.0。进行预提取，随后在原有pH值下分成4部分以确保四个相同的部分，接着将其调节至所述pH值并进一步再提取1小时。然后在与各提取和Ppt G沉淀所用相同的pH值下通过Cuno 50SA过滤澄清样品。Cuno过滤后，所有部分以相同方式处理，这意谓所有部分都在pH 7.0下进行标准沉淀物G沉淀。所述两个实验的结果在下表10和11中概述。

[0283] 表10.

[0284] 滤液中的蛋白质和IgG回收率以及再溶解沉淀物G的MSD和CAE结果

[0285]

			38/1				41			
		提取和澄清的pH值	3.8	4.2	4.6	5.0	3.8	4.2	4.6	5.0
		在pH值调节后的乙酸浓度	75	25	10	5	75	25	10	5
	滤液	蛋白质回收率(%)	100.3	99.6	92.8	76.0	106.4	107.5	99.7	81.0
		IgG回收率(%)	87.6	89.8	90.3	86.0	96.2	97.3	95.1	88.3
沉淀物G	MSD(面积%)	>450 kDa	19.2	20.5	14.8	13.2	22.5	22 8	20.7	16.8
		约350 kDa	8.7	7.6	10.5	11.7	5.2	5.0	7.7	9.4
		约160 kDa	69.5	69.2	72.9	74.2	66.0	65.6	67.5	72.0
		<70 kDa	2.7	2.7	1.8	1.0	6.2	5.6	4.1	1.9
	CAE(γ球蛋白%)		67.4	68.3	78.1	86.7	68.3	69.8	77.5	85.1

[0286] 表11

[0287] 在提取和澄清期间的IgG损失以及再溶解沉淀物G中的蛋白质分解活性和纤维蛋白原

[0288]

					沉淀物G		
提取和澄清乙酸的pH值	在pH值调节后的乙酸浓度(mM)	滤饼中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	PptG上清液中的IgG损失($g \cdot L^{-1}$血浆)	IgG损失∑($g \cdot L^{-1}$血浆)	PKA (IU mg^{-1})	纤维蛋白原($mg \cdot L^{-1}$血浆)	PL-1 ($\mu mol\ mL^{-1}\ g^{-1}$)
3.8	75	0.00	0.42	0.42	214	173	3.9
4.2	25	0.01	0.19	0.20	170	134	3.2
4.6	10	0.01	0.09	0.10	38	193	1.4
5.0	5	0.09	0.04	0.13	6.4	114	0.4
3.8	75	0.00	0.53	0.53	193	355	3.8
4.2	25	0.00	0.28	0.28	171	346	3.2
4.6	10	0 01	0.14	0.15	131	340	1.5
5.0	5	0.16	0.05	0.21	5.3	189	0.2

[0289] 上述数据证实了图5和图6中所示关于低pH值提取使蛋白水解酶活化的结果。总之，数据显示，低pH值提取因增强所有蛋白质的溶解度而使IgG损失降低。所述结果与以上提供的实施例一致。此外，表11中所示的IgG损失表明，较高乙酸浓度(产生较低pH值)会降低滤饼中的IgG损失但会增加沉淀物G上清液中的IgG损失。此现象可通过在低pH值提取后沉淀步骤中的较高乙酸盐浓度来解释。

[0290] 实施例11

[0291] 为确定适合II+III提取条件，比较采用以纯水(用乙酸调节至pH 4.3且在过滤前再次调节至pH 4.9)实施低pH值提取的方案与在5mM乙酸钠/5mM磷酸二氢钠(用每1000升提取缓冲液600g乙酸获得4.8至4.9的溶解pH值)中实施的提取。以试验规模实施所述实验，其始于3.8至5kg经过修改的II+III糊状物。所有实验皆包括用每kg II+III糊状物40g气相二氧化硅实施气相二氧化硅处理。在澄清中使用过滤器框架为30cm*30cm且配备有Cuno 50SA滤板的Strassburger压滤机。以4倍压滤机死体积用每1000升缓冲液含有150克乙酸的5mM乙酸钠/5mM磷酸二氢钠缓冲液实施后洗涤。用Cepa® Z61H离心机以17000RPM(转子直径为10.5cm)和40升/小时的流速对沉淀物G实施离心。以一式三份进行实验，结果展示于表12中。

[0292] 表12

[0293] 比较在pH 4.3且在气相二氧化硅处理前pH值变为4.9的条件下实施的低pH值提取与通过使用每1000L提取缓冲液600g冰乙酸的改进GAMMAGARD® LIQUID条件实施的提取

实验	单元	P00809NG2	P00909NG2	P01509NG2	P02209NG2	P02509NG2	P02609NG2
方法		低pH值提取			每1000 L提取缓冲液600 g HAc		
II+III 糊状物	批号	VNEGJ039	VNGBJ022	VNGBJ216	VNGBJ216	VNGBJ022	VNEGJ039
	kg	5.00	5.00	4.97	4.96	4.96	3.86
PEG	L	106.65	118.70	123.32	123.31	117.65	82.35

II+III提取物

蛋白质	g	1316	1310	1364	1336	1347	1022
蛋白质产率(双缩脲法(BIURET))	gL^{-1}	12.3	11.0	11.1	10.8	11.5	12.4
IgG产率(ELISA)	gL^{-1}	6.09	5.89	6.25	5.50	6.06	6.38
IgA产率(ELISA)	gL-1	1.06	0.96	0.98	1.00	1.01	1.10
IgM产率(ELISA)	gL-1	0.40	0.40	0.47	0.40	0.43	0.48

滤液

[0294]

蛋白质	g	957	1007	1038	955	926	731
蛋白质产率(双缩脲法)	gL^{-1}	9.0	8.5	8.4	7.7	11.5	12.4
IgG产率(ELISA)	gL^{-1}	5.7	5.62	5.45	5.02	6.06	6.38
IgA产率(ELISA)	gL^{-1}	1.03	0.88	0.96	0.90	1.01	1.10
IgM产率(ELISA)	gL^{-1}	0.32	0.39	0.37	0.27	0.43	0.48

滤饼提取物

IgG产率(ELISA)	gL^{-1}	-	-	-	0.07	0.07	0.07

Ppt G上清液

蛋白质	g	196	130	188	187	168	109
蛋白质产率(双缩脲法)	gL^{-1}	1.8	1.1	1.5	1.5	1.4	1.3
IgG产率(ELISA)	gL^{-1}	0.05	0.02	0.03	0.05	0.03	0.04

[0295] 如表12中所见,两种提取方案都获得类似的IgG回收率。考虑到实施例3至10的结果显示可通过在pH 5.0下提取II+III糊状物来使各种杂质最少,表12中提供的结果显示在pH 4.8至4.9下用每1000L提取缓冲液600g冰乙酸提取优于在低pH值下且随后调节至pH 4.8至5.0下提取。

[0296] 实施例12

[0297] 在制备期间,连接至槽和从槽连接的压滤机框架和管线具有较大空隙体积,其在开始后洗涤之前仍填充有悬浮液或滤液。在后洗涤结束时,压滤机中保留此空隙体积。标准方案通过用压滤机的1至2倍死体积洗涤来补偿此空隙体积。为确定标准过滤后洗涤是否可有效回收总IgG,在大规模制备性IgG纯化中使用不同体积的洗涤缓冲液来实施实验。图1展示残余IgG和总蛋白质水平对后洗涤体积(如通过死体积或空隙体积所测量)的依赖性。

[0298] 值得注意的是,如图1中所见,使用约2倍压滤机死体积的过滤后洗涤导致IgG回收率显著降低,这是因为洗涤溶液每升洗涤溶液含有约1.5克IgG。令人惊讶的是,人们发现有

效回收IgG需要3.6倍压滤机死体积的后洗涤缓冲液(在图1通过箭头来指示)。超过3.6压滤机死体积的进一步后洗涤并无益处,这是因为其将导致滤液稀释且不提高IgG回收率。

[0299] 实施例13

[0300] 在II+III沉淀步骤期间,使醇浓度从20%提高至25%且使温度从-5℃降低至-7℃。在溶解II+III糊状物时,与先前使用510mL冰乙酸/1000L缓冲液的比率相反,每1000L体积使用至少600mL冰乙酸来调节II+III糊状物再悬浮缓冲液的pH值。使用乙酸缓冲液的提取比率为1+15。在澄清中,每克II+III糊状物添加0.04-0.06克气相二氧化硅(通常为此范围的下限,例如0.04g)。在后洗涤中,使用约4倍(4x)压滤机死体积的后洗涤缓冲液。举例来说,在一的特定实验中使用4.3×压滤机死体积,而在另一实验中使用3.6x体积。从先前使用的1.8x死体积增加至4倍死体积或更多的后洗涤缓冲液。从先前每1000L缓冲液使用120mL冰乙酸来调节缓冲液升高至每1000L缓冲液使用150mL冰乙酸。所述改变使IgG的产率升高8%且纯度为至少86%γ-球蛋白。当用0.1M磷酸钠+150mM NaCl(pH 7.4,电导率25.5mS/cm)提取时,在滤饼提取物中发现极低残余量的IgG。

[0301] 实施例14

[0302] A.分级分离I的优化:通过喷雾添加乙醇对流动式添加;在添加乙醇后将pH值调节至pH 7.0或7.5

[0303] 表13展示当前所用制备方法的IgG产率且为下文所述的实验提供比较参照。从Cohn池至滤液损失15-20%的IgG。在II+III上清液中每升血浆损失约0.4g IgG。

[0304] 表13

[0305]

	IgG产率(2009)					
	g/L血浆			Cohn池的%		
组分	LA B1 (来源)	Vienna (来源)	LA B5 (回收)	L.A. (来源)	Vienna (来源)	L.A. (回收)
Cohn池	6.18 (5.28-7.02)	6.26 (5.43-6.68)	7.49 * (6.41-8.41)	100	100	100
II+III上清液	0.41 (0.23-0.63)	0.39 (0.33-0.47)	0.37 (0.23-0.48)	6.6	6.2	4.9
II+III沉淀物 (计算值)	5.77	5.87	7.12	93.4	93.8	95.1
II+III滤液	4.93 (4.21-5.57)	5.19 (4.11-5.48)	6.43 (6.11-7.02)	80	83	86

[0306] *LA B5回收血浆Cohn池:因追加盐水导致IgG浓度较低。平均LA B1回收血浆Cohn池:8.52g/L。

[0307] 方法

[0308] 在24-27℃下于14升桶中使Cohn池解冻6-7小时。此后将材料在2-8℃下混合过夜。然后将池分为4部分(各800g):

[0309] 1:流动式添加乙醇,之后将pH值调节至7.0

[0310] 2:流动式添加乙醇,之后将pH值调节至7.5

[0311] 3.通过喷雾添加乙醇,之后将pH值调节至7.0

[0312] 4.通过喷雾添加乙醇,之后将pH值调节至7.5

[0313] 首先将所有部分冷却至0℃。然后将8%乙醇流动式添加至第1和第2部分中并使用喷头喷雾添加至第3和第4部分中。在两种方法中,以大致相同的速度添加乙醇。在乙醇添加期间,将低温恒温器调节至-5℃并在混合下将75mL乙醇添加至各部分中。用1M乙酸将pH值调节至7.0或7.5。然后将溶液孵育1小时。在孵育后,用杯式离心机对溶液进行离心(4600rpm;30min;-2℃)。

[0314] 结果

[0315] 用比浊法测量IgG产率且展示于表14中。在分级分离I上清液中通过改进方法(乙醇喷雾)获得几乎100%的IgG产率,而通过传统乙醇添加每升血浆损失0.2-0.25g。所述结果表明,在制备中改进方法可使IgG产率提高多达0.2g/L血浆。

[0316] 表14

[0317]

样品	重量(g)	IgG，比浊法(3次测量的平均值)				
		mg/mL	g	%	纯度(%)	g/L血浆
减少冷冻沉淀物的血浆	**800**	**5.72**	**4.57**	**100.00**	**12.2**	**5.72**
上清液1	856	5.10	4.37	95.57	12.6	5.46
上清液2	853	5.16	4.41	96.36	12.7	5.51

[0318]

上清液3	853	5.36	4.58	100.14	13.1	5.72
上清液4	848	5.33	4.52	98.90	13.0	5.65

[0319] B.试验规模:分级分离I(喷雾对流动式;在添加乙醇后将pH值调节至7.4)和分级分离II+III(在添加乙醇之前将pH值调节至6.7,在添加乙醇后再调节至6.9)

[0320] 实施例15

[0321] 方法

[0322] 在2℃下在混合下使2.8kg血浆解冻。组分I:添加8%乙醇且使用5M乙酸将pH值调节至7.4。在混合下,使悬浮液冷却至-2℃的温度。使用喷头来获得喷雾条件。在两种方法中,以大致相同的速度实施乙醇和5M乙酸的添加。在孵育1小时后,使用CEPA离心机在-4℃温度下对溶液进行离心。

[0323] 组分II+III:使用pH 4缓冲液将pH值调节至6.7,然后(1)喷雾添加25%乙醇或(2)以常规方式流动式添加25%乙醇。然后将pH值再调节至6.9。在-7℃下孵育10小时。

[0324] 结果

[0325] 通过比浊法测量在25%乙醇下组分II+III期间的IgG损失且展示于表15中。各IgG测量值具有一定差异,因此取优化方法的平均值。

[0326] 表15

[0327]

	组分I的IgG损失	组分II+III上清液，添加25%乙醇	滤液中的IgG
实验	g /升血浆	g /升血浆	Cohn池的%
NG2C73	0.47	0.08	85.28
NG2C73-1	0.34	0.03	92.27
NG2C73-2	0.05	0.06	95.94
平均值	**0.29**	**0.06**	**91.16**

[0328]

参照(流动式添加乙醇)	0.29	0.10	87.38

[0329] 在获得组分II+III沉淀物时仅损失0.35g IgG/L血浆。与流动式添加25％乙醇相比，在使用喷雾方法的分级分离II+III期间产率获得0.04g IgG/升血浆的提高；且与当前制备中使用的流动式添加20％乙醇相比，产率获得0.3g IgG/升血浆的提高(0.4-0.06g/L范围的平均值)。滤液中的IgG产率显著高于参照且远高于当前制备中通过在II+III沉淀中流动式添加20％乙醇实现的80％-86％。

[0330] C.分级分离II+III(20％乙醇)：在整个分级分离II+III期间维持初始pH值

[0331] 实施例16

[0332] 方法

[0333] 在17-20℃下在混合下使50升血浆解冻27小时。如上述各部分所述来实施分级分离I作为优化方法。将上清液I分为两部分：

[0334] (1)pH值调节的最差情形：在添加乙醇之前和之后调节pH值但不在孵育期中调节。

[0335] (2)优化的pH值调节：在添加乙醇之前和之后调节pH值且在保持时间期间进一步再调节pH值。在保持时间期间始终搅拌溶液。

[0336] 在添加乙醇之前使用pH 4缓冲液将两个部分中上清液I的pH值调节至6.7。通过喷雾添加乙醇且在添加乙醇后将pH值再调节至6.9。

[0337] 在部分(1)中，较少关注pH值调节的实施以模拟最差情形。在添加乙醇后直接调节溶液的pH值但在孵育期间不调节。在部分(2)中，在10小时的孵育时间期间将pH值再调节至6.8至7.0的恒定值。

[0338] 结果

[0339] 再次以比浊法测量IgG并展示于表16中。通过在保持时间期间将pH值持续再调节至约6.9的恒定值，仅损失0.13g IgG/升血浆，而相比之下，在大规模制备中平均损失0.4g/L血浆。与参照(不使用喷雾，而是在保持期中持续搅拌)相比，产率获得0.07g IgG/升血浆的提高。与当前所用的传统方法(损失0.38g IgG/升血浆，参见表13)相比，产率获得约0.20g至约0.30g IgG/升血浆的提高。

[0340] 表16

[0341]

		容量	以比浊法测量的IgG	
	样品	kg	产率(%)	g/L血浆
池	血浆	45.20	100.00	4.90
组分I	上清液I	68.66	102.61	5.03
优化的pH值调节	**上清液II+III**	**53.09**	**0.26**	**0.13**
参照	上清液II+III	52.69	0.41	0.20

[0342] 结论

[0343] II+III上清液中的IgG损失从制备批次中0.4g IgG/L血浆的当前水平降低至用20％乙醇沉淀时0.13g/L血浆的水平，且在用25％乙醇沉淀同时喷雾添加乙醇并在沉淀期间连续维持pH值为6.9±0.1时降低至低于0.08g/L血浆的水平。

[0344] 在沉淀I中，在pH值调节之前通过喷雾添加乙醇使分级分离I上清液中的IgG产率提高0.1至0.2g/L血浆。

[0345] 讨论

[0346] 在所有实验中皆以比浊法测量IgG且其可具有至少-/+5.0％的差异(如比浊计制备商Siemens AG所指出)。因此在制备期间通过改进方法获得的实际产率提高可比实施例中所示稍低或稍高。

[0347] 作为经改进新方法提高产率的另一证据，比较沉淀物IgG重量与在制备中从相同血浆来源获得的平均沉淀物IgG重量。通过制备中当前所用的方法，每1000升US源Cohn池获得18kg沉淀物IgG，相比之下，试验规模研究(上文部分B)中获得20.8kg沉淀物IgG(在分级分离II+III中采用20％乙醇和优化的pH值调节，所有缓冲液和乙醇都是通过喷雾添加)。此表示每1000升Cohn池增加超过2kg沉淀物IgG。

[0348] 实施例17

[0349] 此实施例证实，在过滤组分II+III悬浮液之前增加烟雾二氧化硅处理步骤使IgG滤液纯度提高。简单的说，如上所述对减少冷冻沉淀物的血浆实施分级分离至组分II+III阶段，此时将其分为两个样品。第一样品仅通过在标准组分II+III悬浮液过滤之前添加助滤剂来澄清(图7A)。如本文所述对第二样品实施烟雾二氧化硅预处理，之后添加助滤剂并实施标准组分II+III悬浮液过滤(图7B)。

[0350] 然后通过乙酸纤维素电泳来分离滤液中的蛋白质组分并使用标准方法来计算个别峰的面积。如色谱图和定量数据中可见，在过滤前经过烟雾二氧化硅处理的第二样品所产生滤液的IgG纯度远高于未经烟雾二氧化硅处理的样品(68.8％对55.7％γ-球蛋白；比较表18与表16)。

[0351] 表17.通过乙酸纤维素电泳从仅通过在过滤前添加助滤剂来澄清的组分II+III悬浮液分离的蛋白质峰的定量，展示于图7A中。

[0352]

峰编号(从左到右)	面积(%)	组分
1	55.7	γ-球蛋白
2	3.2	变性蛋白质
3	3.7	γ-球蛋白
4	25.5	α/â-球蛋白

[0353]

5	11.9	白蛋白

[0354] 表18.通过乙酸纤维素电泳从经过烟雾二氧化硅预处理且通过在过滤前添加助滤剂来澄清的组分II+III悬浮液分离的蛋白质峰的定量,展示于图7B中。

[0355]

峰编号(从左到右)	面积(%)	组分
1	68.8	γ-球蛋白
2	18.9	α/â-球蛋白
3	12.3	白蛋白

[0356] 实施例18

[0357] 本实施例说明适合皮下施用的20％IgG制剂的超滤和配制。在制备放大规模试验和临床前20％IgG制剂时收集此信息。用于在纳米过滤步骤之前制备浓度为20％的批料的方法如上文所述。改进超滤/渗滤以将溶液浓缩至20％。为将产率损失降至最低,通过配备有相同膜的第二较小装置来浓缩用于渗滤的超滤装置的后洗涤液,且随后将其添加至总体溶液中。

[0358] 令人惊讶的是,显示溶液的蛋白质浓缩并不影响低pH值储存期间的病毒灭活。在10％溶液(GAMMAGARD®LIQUID)和20％溶液中实现相似的病毒减少。因此,对于20％产物来说维持作为病毒减少步骤的低pH值储存。

[0359] 在纳米过滤之前,将IgG溶液的甘氨酸浓度调节至0.25M的目标浓度。然后通过超滤(UF)将溶液浓缩至蛋白质浓度为6±2％w/v。将pH值调节至5.2±0.2。所用UF膜的标称切割分子量(NMWCO)为50,000道尔顿或更小且经过特别设计以用于高粘度产物(例如来自Millipore的V筛网)。

[0360] 然后相对于0.25M甘氨酸溶液(pH 4.2±0.2)对浓缩物实施渗滤。最小交换体积为初始浓缩物体积的10倍。在整个超滤/渗滤操作中,使溶液维持在介于约4℃至20℃之间。

[0361] 在渗滤后,将溶液浓缩至蛋白质浓度为至少22％(w/v)。将溶液温度调节至2℃至8℃。

[0362] 为回收系统中的全部残余蛋白质,以再循环模式用至少2倍死体积对第一较大超滤系统实施后洗涤,以确保洗出所有蛋白质。然后用配备有相同类型的膜且尺寸为第一系统的十分之一或更小的第二超滤/渗滤系统将第一超滤系统的后洗涤液浓缩至蛋白质浓度为至少22％w/v。将后洗涤浓缩物添加至总体溶液中。然后对第二超滤系统实施后洗涤。使用此后洗涤液来调节最终制剂的蛋白质浓度。使溶液温度维持在介于约2℃至8℃之间。

[0363] 为配制最终溶液,用第二较小超滤系统的后洗涤液和/或用渗滤缓冲液将蛋白质

浓度调节至约20.4±0.4%(w/v)。必要时,将pH值调节至介于约4.4至4.9之间。

[0364] 实施例19

[0365] 为比较当前GAMMAGARD®LIQUID制备方法中组分II+III滤液中回收的IgG组分,使用本文提供的改进组分II+III沉淀和溶解方法实施五个IgG的制备规模纯化。简单地说,在-7℃下用通过流动添加纳入的25%乙醇实施起始IgG浓度为约6.14g/L的IgG Cohn池的沉淀,并与当前制备方法中所用的-5℃和20%乙醇相比较。接着将经过修改的组分II+III沉淀物用pH值为4.3或用0.06%冰乙酸调节的溶解缓冲液按1比15提取并且随后通过深层过滤器在用4.3倍过滤器死体积的溶解缓冲液最终洗涤下进行过滤。如表18中所见,根据本文提供的改进方法制备的经过修改的组分II+III滤液所含的起始Cohn池中存在的IgG的百分比显著高于(至少提高8.0%)根据当前制备程序制备的组分II+III滤液(分别为91.1%和91.6%对83.1%和83.8%)。

[0366] 表18.在2008和部分2009期间在Vienna实施的所有Baxter制备操作中组分II+III滤液的IgG平均回收率,与根据本文提供的改进方法制备的批料中的IgG回收率的比较。

[0367]

方法	Vienna 制备		R&D 规模扩大**	
	当前	2008		
Cohn池中的IgG(g/L)	6.26	6.31	6.14	6.13
II+III沉淀时的醇.(%)	20	20	25	25
每1000L溶解缓冲液的乙酸m数	510	510	在pH 4.3下溶解;过滤前变为4.9	600
气相二氧化硅(g/g糊状物)	0.045	0.04	0.04	0.04
后洗涤的压滤机死体积	1.8	1.8	4.3	4.3
滤液中的平均IgG (Cohn池的%)	83.1% 57批	83.8% 200批	91.1% 3批	91.6% 2批
滤液中的额外IgG	n.a.	n.a.	+ 8.0%	+ 8.5%

[0368] 实施例20

[0369] 为测定本文提供的IgG组合物的纯度,根据本文提供的改进方法制备三批IgG。接着测试所述纯化的最终IgG产物的若干污染物,包括IgA、IgM、酰胺分解活性、C3和纤维蛋白原,以及测定最终组合物中IgG单体/二聚体的百分比。如下表19中可见,本文提供的改进制备方法得到的最终总体组合物的IgG回收率提高,为起始材料的73.6%至78.5%,相比之下当前所用的方法为60%至70%,同时维持与当前IgG制备标准相比同样好(如果并非更好)的纯度特征。

[0370] 表19.根据本文提供的改进制备方法制备的IgG组合物中的杂质水平和IgG单体/二聚体组成。

[0371]

选项	1	3	6
实验编号#(P0..10NG2)	19	20	21
ANX流过液中的蛋白质产率 [g/L plasma]	**4.35**	**4.35**	**4.38**
IgG回收率:Cohn起始材料比总体组合物[%]	73.6	78.5	78.5
最终总体组合物的表征			
IgA [μg/mL @ 10%蛋白质]	29	26	未测定
IgM [μg/mL @ 10%蛋白质]	1.1	1.1	未测定
酰胺分解活性 [PL-1 nmol/mL min]	未测定	<10	<10
MSD单体/二聚体 [%]	99.7	99.9	99.7
C3 [μg/mL @ 10%蛋白质]	未测定	未测定	未测定
纤维蛋白原 [μg/mL @ 10%蛋白质]	<0.2	未测定	未测定

[0372] 应了解,本文所述的实施例和实施方案仅出于说明目的,且基于其的各种修改或变化应为本领域技术人员所了解且意图包括在本申请的精神与范围内和随附权利要求书的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请都是全文以引用方式并入本文以用于所有目的。

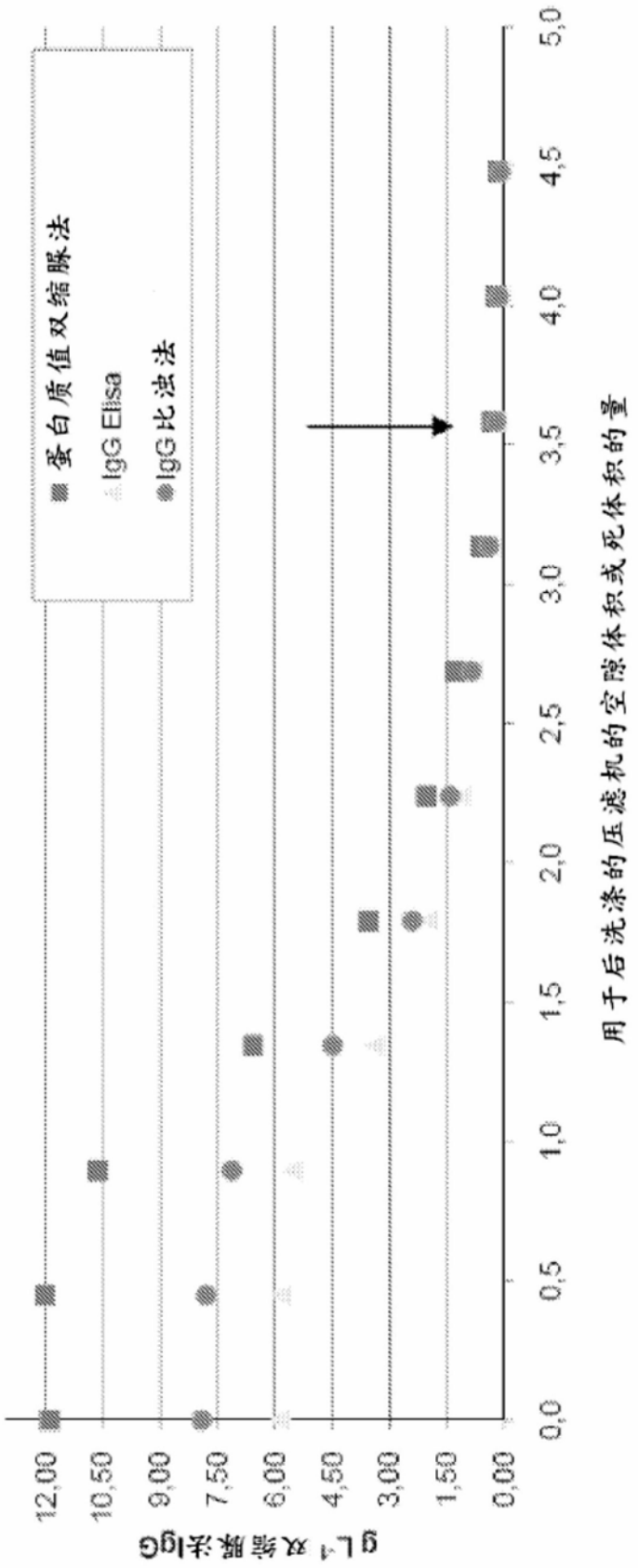

蛋白质值双缩脲法
IgG Elisa
IgG比浊法
g L-1 双缩脲法IgG
12,00
10,50
9,00
7,50
6,00
4,50
3,00
1,50
0,00
0,0
0,5
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
用于后洗涤的压滤机的空隙体积或死体积的量

图1

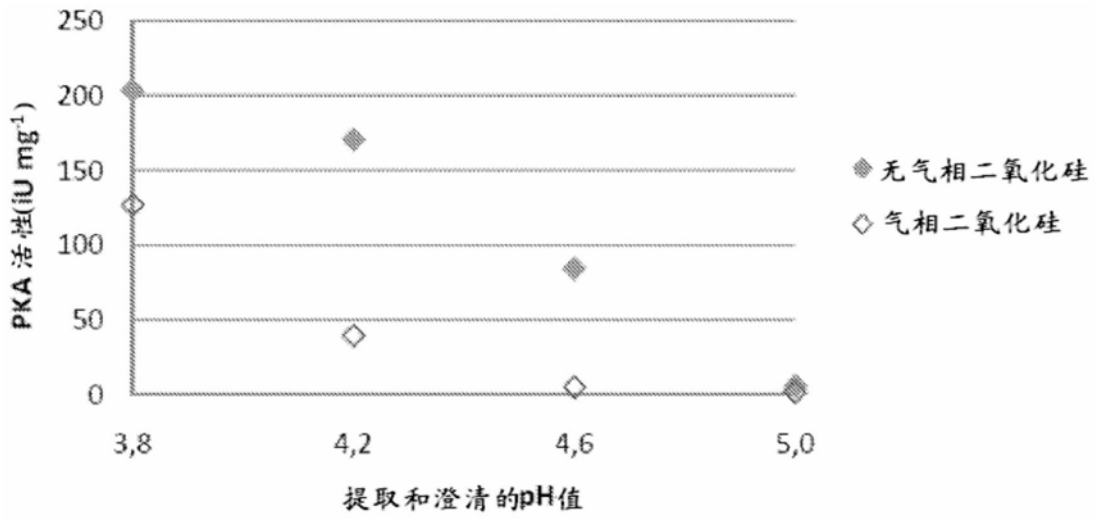

250
200
150
100
50
0
PKA 活性(iU mg-1)
3,8
4,2
4,6
5,0
提取和澄清的pH值
无气相二氧化硅
气相二氧化硅

图2

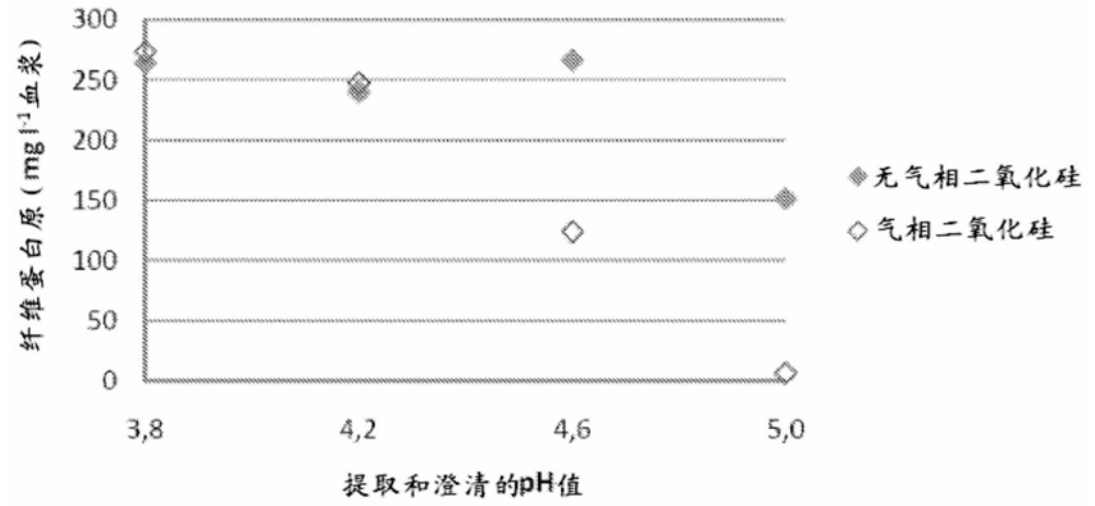

300
250
200
150
100
50
0
纤维蛋白原(mg l-1 血浆)
3,8
4,2
4,6
5,0
提取和澄清的pH值
无气相二氧化硅
气相二氧化硅

图3

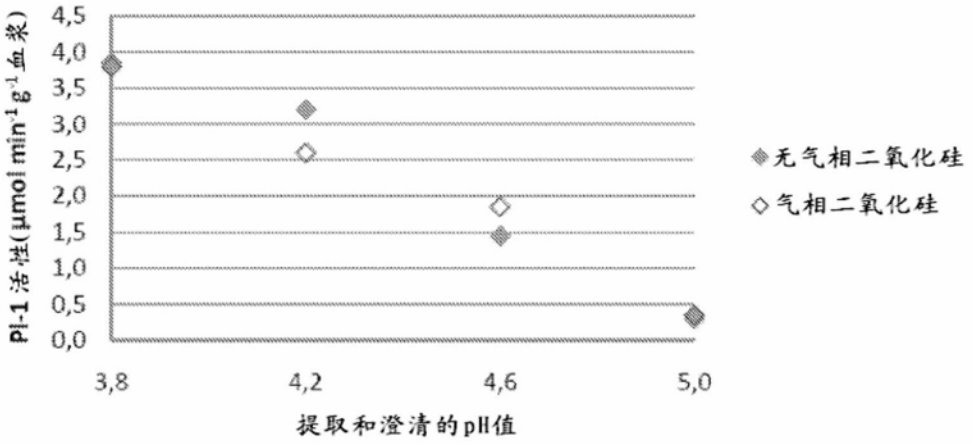

4,5
4,0
3,5
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
3,8
4,2
4,6
5,0
提取和澄清的pH值
无气相二氧化硅
气相二氧化硅

图4

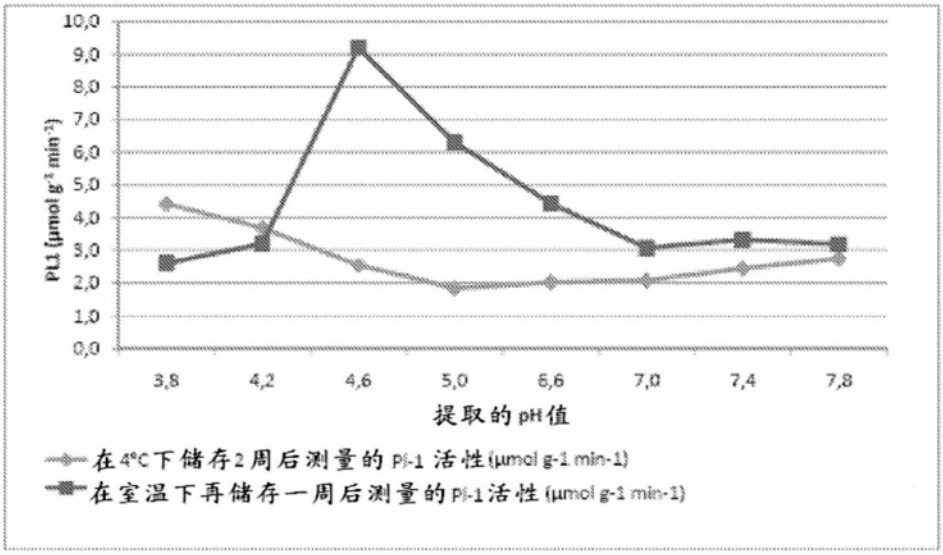

10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
3,8
4,2
4,6
5,0
6,6
7,0
7,4
7,8
提取的pH值
在4°C下储存2周后测量的Pi-1活性(μmol g-1 min-1)
在室温下再储存一周后测量的Pi-1活性(μmol g-1 min-1)

图5

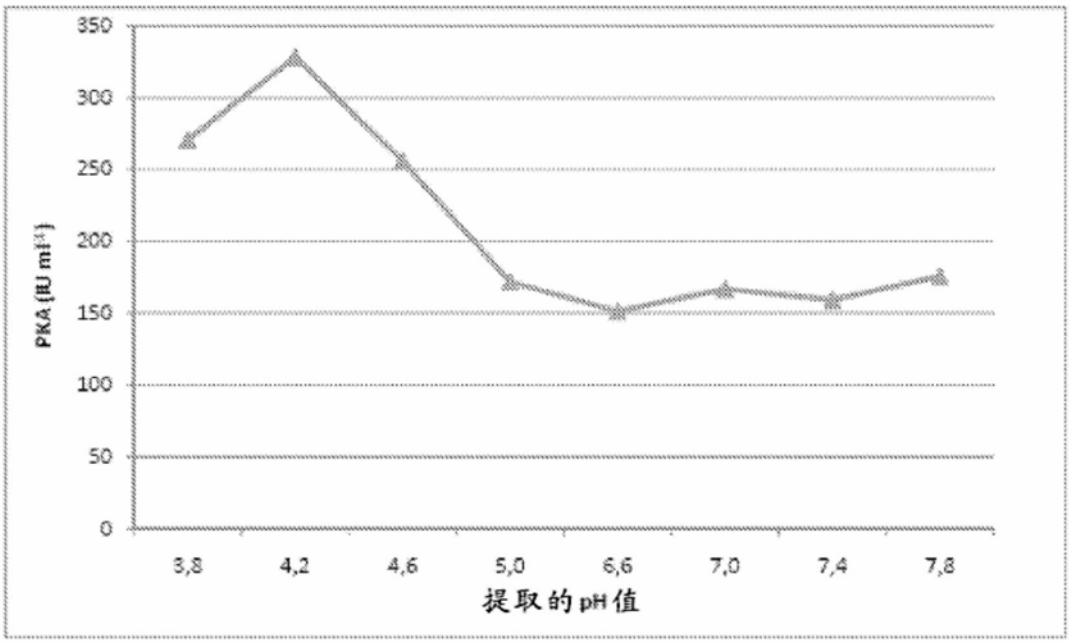

350
300
250
200
150
100
50
0
PKA (IU ml-1)
3,8
4,2
4,6
5,0
6,6
7,0
7,4
7,8
提取的pH值

图6

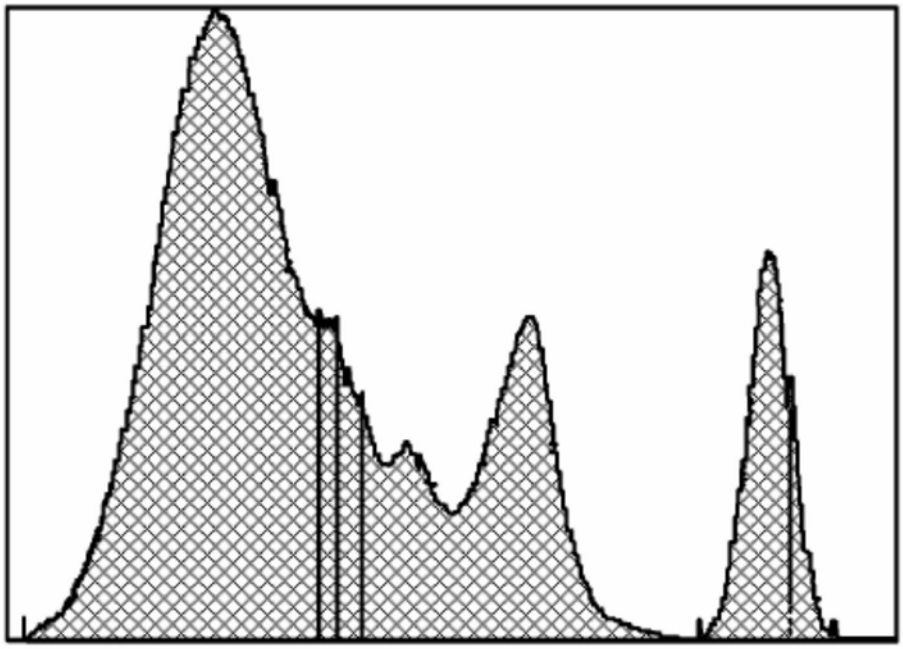


图7A

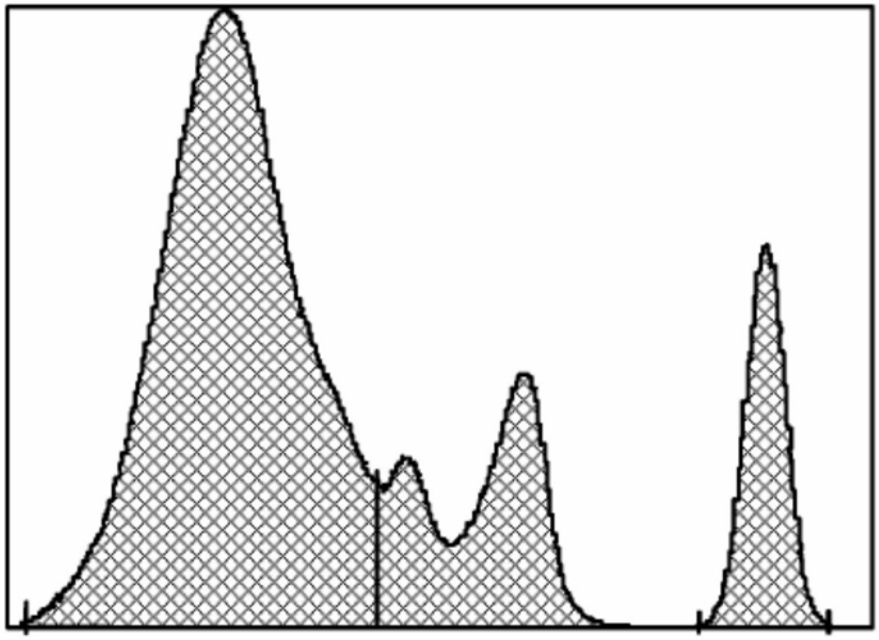


图7B

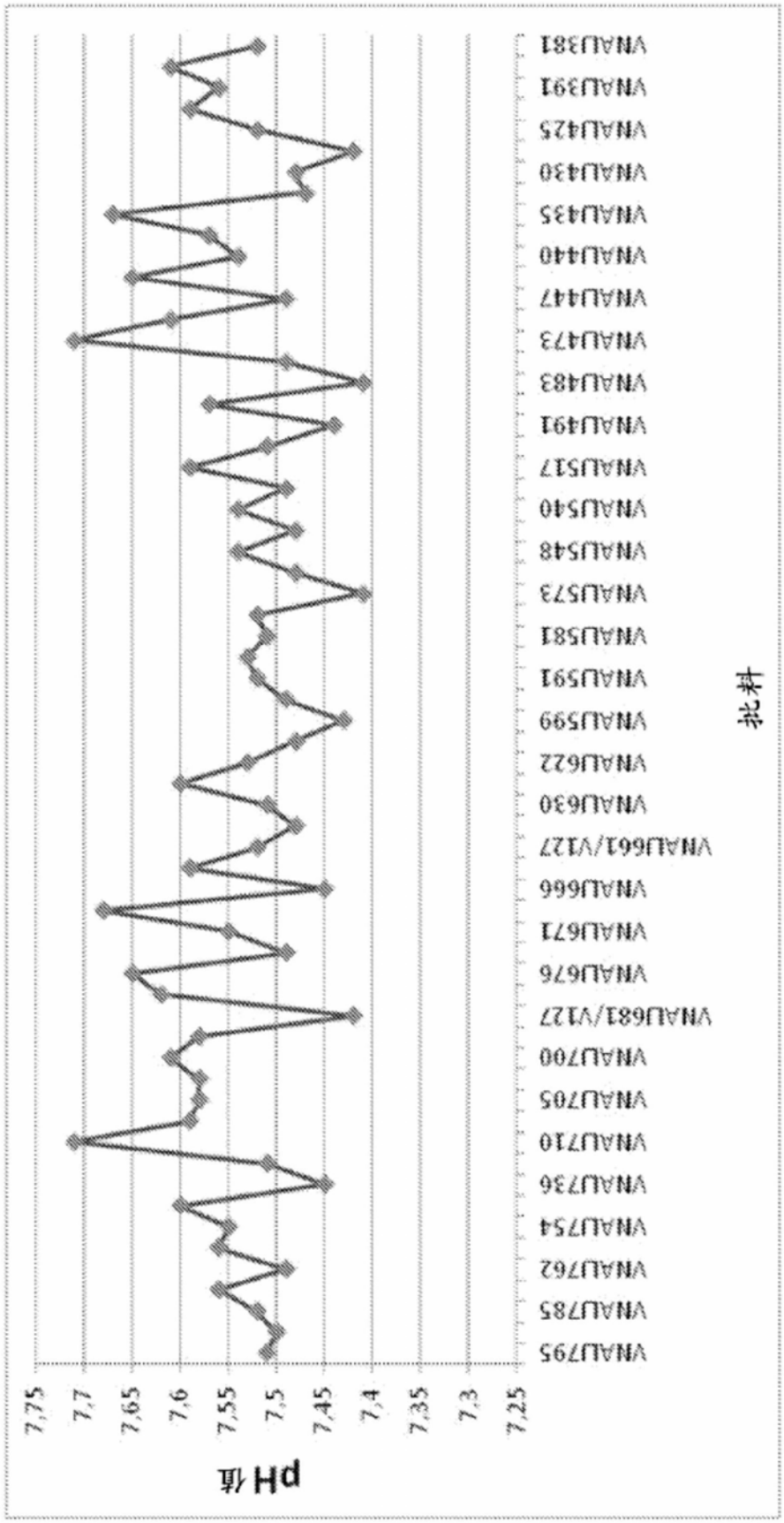

pH值
7,75
7,7
7,65
7,6
7,55
7,5
7,45
7,4
7,35
7,3
7,25
批料
VNAU381
VNAU391
VNAU425
VNAU430
VNAU435
VNAU440
VNAU447
VNAU473
VNAU483
VNAU491
VNAU517
VNAU540
VNAU548
VNAU573
VNAU581
VNAU591
VNAU599
VNAU622
VNAU630
VNAU661/V127
VNAU666
VNAU671
VNAU676
VNAU681/V127
VNAU700
VNAU705
VNAU710
VNAU736
VNAU754
VNAU762
VNAU785
VNAU795

图8

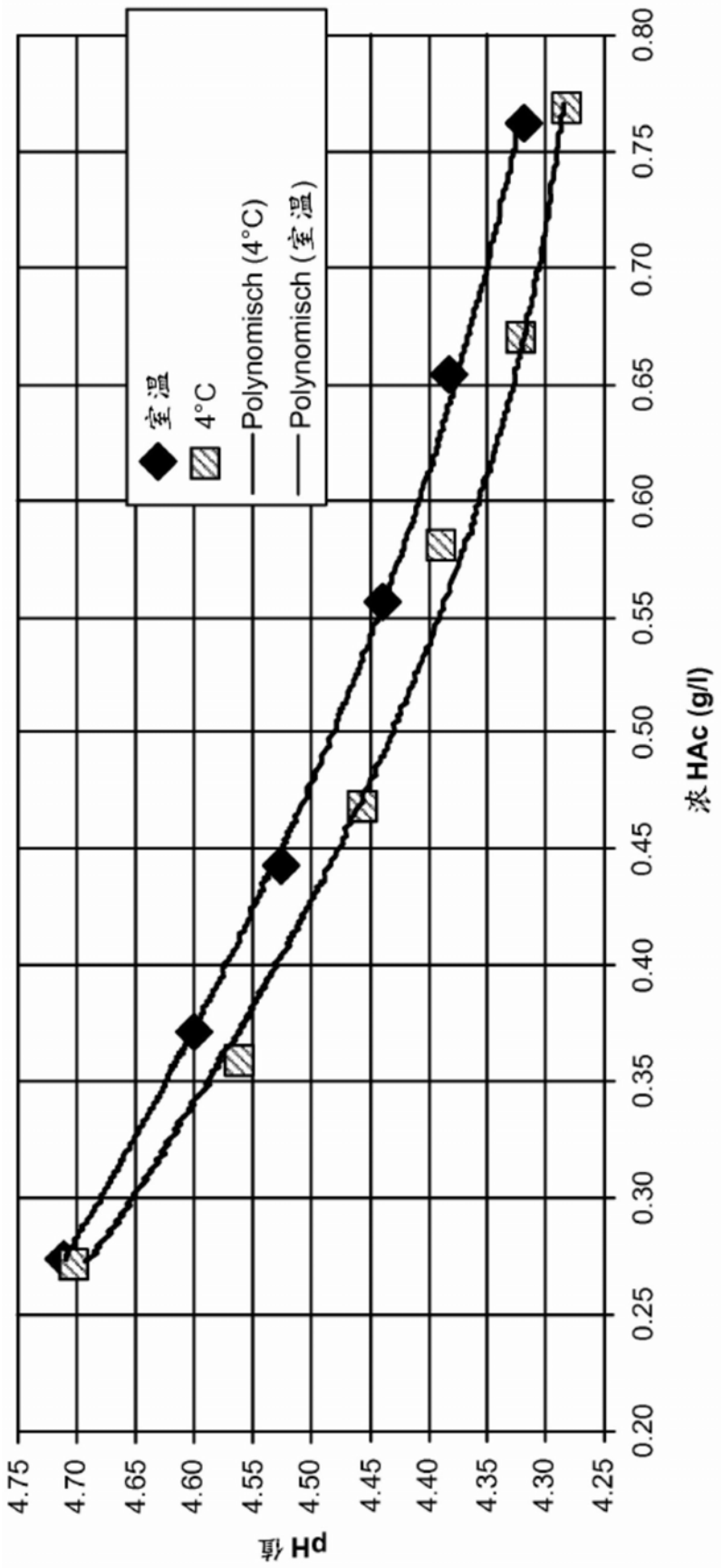

室温
4°C
Polynomisch (4°C)
Polynomisch (室温)
pH 值
浓 HAc (g/l)
4.75
4.70
4.65
4.60
4.55
4.50
4.45
4.40
4.35
4.30
4.25
0.20
0.25
0.30
0.35
0.40
0.45
0.50
0.55
0.60
0.65
0.70
0.75
0.80

图9

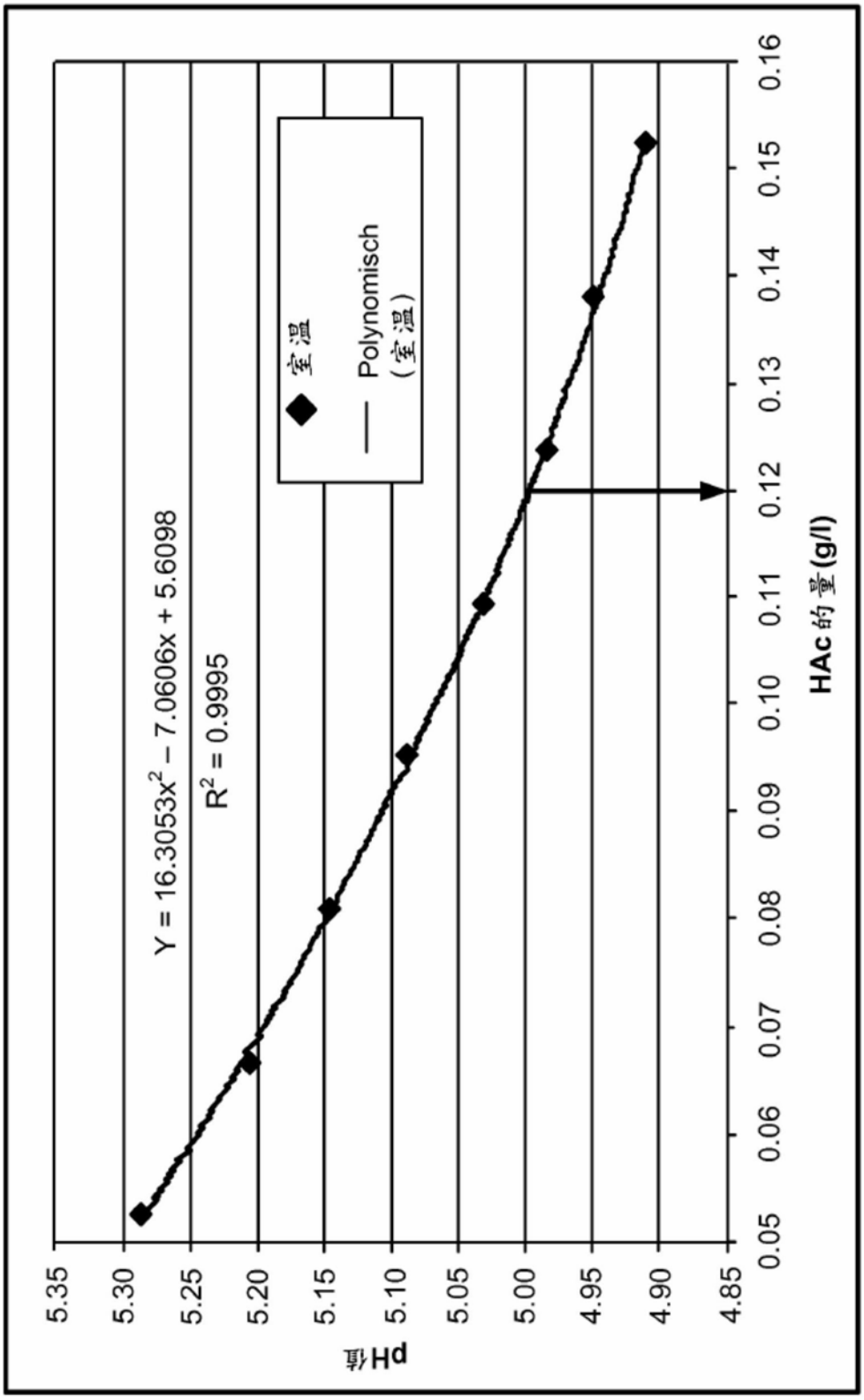

Y = 16.3053x² – 7.0606x + 5.6098
R² = 0.9995
室温
Polynomisch (室温)
pH值
HAc的量(g/l)
5.35
5.30
5.25
5.20
5.15
5.10
5.05
5.00
4.95
4.90
4.85
0.05
0.06
0.07
0.08
0.09
0.10
0.11
0.12
0.13
0.14
0.15
0.16

图10