

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5876474号
(P5876474)

(45) 発行日 平成28年3月2日(2016.3.2)

(24) 登録日 平成28年1月29日(2016.1.29)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 16/00 (2006.01)

C O 7 K 16/00

C O 7 K 1/14 (2006.01)

C O 7 K 1/14

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

X

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 37/02 (2006.01)

A 6 1 P 37/02

請求項の数 33 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-512585 (P2013-512585)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月27日 (2010.5.27)
 (65) 公表番号 特表2013-527201 (P2013-527201A)
 (43) 公表日 平成25年6月27日 (2013.6.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/036470
 (87) 国際公開番号 W02011/149472
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011.12.1)
 審査請求日 平成25年5月24日 (2013.5.24)
 (31) 優先権主張番号 2010202125
 (32) 優先日 平成22年5月26日 (2010.5.26)
 (33) 優先権主張国 オーストラリア(AU)

前置審査

(73) 特許権者 502178849
 バクスター、インターナショナル、インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国60015イリノイ、ディヤフィールド、バクスターパークウェイ1
 (73) 特許権者 512107787
 バクスター ヘルスケア エス. エー.
 スイス国 グラットパーク (オブフィコン)
) サーガワーシュトラッセ130
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血漿由来の富化 I g G 組成物を調製する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 第1の沈殿工程として、pH 7.0 から 7.5 にて 6% から 10% のアルコールを用いて脱クリオ血漿画分を沈殿させ、第1の沈殿物と第1の上清を得る工程と、

(b) 第2の沈殿工程として、pH 6.7 から 7.3 および -7 から -9 の温度にて約 25% のアルコールを用いて前記第1の上清から I g G を沈殿させ、第2の沈殿物を形成する工程と、

(c) 前記第2の沈殿物を懸濁して懸濁液を形成する工程と、

(d) 第3の沈殿工程として、pH 6.7 から 7.3 にて 22% から 28% のアルコールを用いて工程(c)にて形成された前記懸濁液から I g G を沈殿させ、第3の沈殿物を形成する工程と、

(e) 前記第3の沈殿物を酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩を含む緩衝液で懸濁させて懸濁液を形成する工程と、

(f) 工程(e)にて形成された前記懸濁液から I g G を含む可溶性画分を分離することにより富化 I g G 組成物を形成する工程とを含む、

前記第2の沈殿工程または前記第3の沈殿工程の少なくとも1つが、アルコールのスプレー添加を含む、血漿由来の富化 I g G 組成物を調製する方法。

【請求項 2】

前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、および前記第3の沈殿工程の全てがアルコ

ールのスプレー添加を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記第 1 の沈殿工程、前記第 2 の沈殿工程、または前記第 3 の沈殿工程の少なくとも 1 つの前記 pH は前記アルコール添加後、pH 調整溶液の添加により達成される、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記第 1 の沈殿工程、前記第 2 の沈殿工程、および前記第 3 の沈殿工程の全ての前記 pH は前記アルコール添加後、pH 調整溶液の添加により達成される、請求項 1 ~ 請求項 3 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 pH 調整溶液の添加が前記 pH 調整溶液のスプレー添加を含む、請求項 3 または請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記沈殿工程の pH は、前記アルコール添加前および添加後、前記アルコール添加中および添加後、または前記アルコール添加前、添加中および添加後に調整される、請求項 3 ~ 請求項 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

少なくとも 1 つの沈殿工程の pH は、前記 pH の連続的な調整により前記全沈殿工程で維持される、請求項 1 ~ 請求項 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

イオン交換クロマトグラフィー精製工程をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

陰イオン交換クロマトグラフィー精製工程と陽イオン交換クロマトグラフィー工程の両方を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ナノ濾過工程ならびに / または限外濾過および透析濾過工程をさらに含む、請求項 1 ~ 請求項 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

(a) プール血漿供与物の混合物を 2 から 10 の温度に冷却する工程と、
(b) 遠心分離により工程 (a) の前記混合物を液体と沈殿物に分離する工程と、
(c) 工程 (b) で形成された前記液体上清に終濃度が 5 % (体積 / 体積) から 10 % (体積 / 体積) になるようにエタノールを混ぜることにより混合物を形成する工程と、
(d) 工程 (c) で形成された前記混合物を -4 から 0 に冷却する工程と、
(e) 遠心分離により工程 (d) の前記混合物を液体と沈殿物に分離し、上清を単離することにより、第 1 の血漿画分を形成する工程と、

(f) 前記第 1 の血漿画分の pH を約 7.0 に調整する工程と、
(g) -7 から -9 の温度で、工程 (f) の前記第 1 の血漿画分のエタノール濃度を約 25 % (体積 / 体積) に調整することにより、混合物を形成する工程と、

(h) 工程 (g) の前記混合物を液体と沈殿物に分離する工程と、
(i) 工程 (h) の前記沈殿物を、1000 L あたり 300 mL から 700 mL の氷酢酸で pH を調整したリン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液で再懸濁させることにより、懸濁液を形成する工程と、

(j) 微粉化した二酸化ケイ素 (SiO_2) と工程 (i) の前記懸濁液を少なくとも 30 分間混ぜる工程と、

(k) 加圧濾過器で前記懸濁液を濾過することにより濾過液を形成する工程と、
(l) 少なくとも加圧濾過器のデッドボリュームの 3 容量の、1000 L あたり 50 mL から 200 mL の氷酢酸で pH を調整した、リン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液を用いて、前記加圧濾過器を洗浄することにより、洗浄液を形成する工程と、

(m) 工程 (k) の前記濾過液と工程 (l) の前記洗浄液を混合することにより溶液を形

10

20

30

40

50

成し、前記溶液に界面活性剤 (d e t e r g e n t) を添加する工程と、

(n) 工程 (m) の前記溶液の前記 p H を約 7 . 0 に調整し、終濃度が約 2 5 % になるようにエタノールを加えることにより、沈殿物を形成する工程と、

(o) 工程 (n) の混合物を液体と沈殿物に分離する工程と、

(p) 前記沈殿物を酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩を含む緩衝液で懸濁させて懸濁液を形成し、前記懸濁液を少なくとも 6 0 分間保持する工程と、

(q) 工程 (p) 後の前記懸濁液を陽イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、前記カラムに吸着したタンパク質を溶出液に溶出する工程と、

(r) 工程 (q) からの前記溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し流出液を生成する工程と、

(s) 工程 (r) からの前記流出液をナノフィルターに通しナノ濾過液を生成する工程と、

(t) 工程 (s) からの前記ナノ濾過液を限外濾過膜に通し限外濾過液を生成する工程と、

(u) 工程 (t) からの前記限外濾過液を透析濾過緩衝液に対して透析濾過し、8 % (重量 / 体積) から 1 2 % (重量 / 体積) のタンパク質濃度を有する透析濾過液を生成することにより濃縮 I g G 組成物を得る工程と、

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

工程 (g) および (n) の少なくとも 1 つにおいて、エタノール濃度はエタノールを前記画分にスプレー法で導入することにより調製される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

工程 (g) および (n) の少なくとも 1 つにおいて、エタノール添加後に p H を適切な p H に調整する、請求項 1 1 または請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

工程 (g) および (n) の少なくとも 1 つにおいて、p H は p H の連続的な調整により全沈殿反応で維持される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

p H の調整をすることができる溶液をスプレーすることにより、p H が少なくとも 1 つの工程において調整される、請求項 1 1 ~ 請求項 1 4 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

氷酢酸をスプレーすることにより p H が調整される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 7】

0 . 2 2 μ m 以下のフィルターを通して前記透析濾過液を濾過する工程をさらに含む、請求項 1 1 ~ 請求項 1 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記血漿がヒト血漿である、請求項 1 1 ~ 請求項 1 7 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

工程 (g) の前記混合物の温度が - 7 ° C である、請求項 1 1 ~ 請求項 1 8 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

工程 (h) で形成された前記沈殿物は沈殿物 1 k g あたり 1 2 L から 1 8 L の緩衝液で再懸濁される、請求項 1 1 ~ 請求項 1 9 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記沈殿物は沈殿物 1 k g あたり約 1 5 L の緩衝液で再懸濁される、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

工程 (j) において前記懸濁液に加えられた二酸化ケイ素の量が、工程 (h) で形成された沈殿物 1 g あたり 0 . 0 2 g から 0 . 0 6 g である、請求項 1 3 ~ 請求項 2 1 の何れか 1 項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 23】

工程(j)において前記懸濁液に加えられた二酸化ケイ素の量が、工程(h)で形成された沈殿物1gあたり約0.04gである、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

工程(k)における濾過の前に濾過助剤を前記混合物に加える、請求項11～請求項23の何れか1項に記載の方法。

【請求項 25】

前記濾過助剤が珪藻土である、請求項24に記載の方法。

【請求項 26】

工程(m)で使用された前記界面活性剤が0.1%(重量/体積)から0.3%(重量/体積)のポリソルベート-80を含む、請求項11～請求項25の何れか1項に記載の方法。

10

【請求項 27】

工程(p)で用いた前記懸濁液がトリトン-X100、ポリソルベート-80、およびTNBPを含む、請求項11～請求項26の何れか1項に記載の方法。

【請求項 28】

工程(p)において前記懸濁液が18 から25 の温度で保持される、請求項11～請求項27の何れか1項に記載の方法。

【請求項 29】

工程(s)の前記ナノフィルターが15nmから72nmの平均ポアサイズを有する、請求項11～請求項28の何れか1項に記載の方法。

20

【請求項 30】

前記ナノフィルターが19nmから35nmの平均ポアサイズを有する、請求項29に記載の方法。

【請求項 31】

前記ナノフィルターが約35nmの平均ポアサイズを有する、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

工程(t)の前記限外濾過膜が約100kDa以下の公称分画分子量(NMWC0)を有する、請求項11～請求項31の何れか1項に記載の方法。

30

【請求項 33】

前記組成物の前記タンパク質濃度が約10%(重量/体積)である、請求項11～請求項32の何れか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

ヒト血漿由来の免疫グロブリン製品は免疫不全を治療するために1952年に初めて使用された。当初は免疫グロブリンアイソタイプG(IgG)の筋肉内投与もしくは皮下投与が選択法であった。しかしながら、様々な疾患の有効な治療に必要な大量のIgGを注射するために、IgG濃度の低い(50mg/mL)静脈内投与可能な製品が開発された。通常、静脈注射用免疫グロブリン(IVIg)は千人以上の血液提供者の血漿由来のプールされた免疫グロブリンG(IgG)、免疫グロブリンを含む。一般的に、完全なFc依存性のエフェクター機能を有する95%以上の未修飾のIgGとごく少量の免疫グロブリンA(IgA)もしくは免疫グロブリンM(IgM)を含むIVIgは、主として3つの主要な病状、(1)低抗体価を特徴とする、X連鎖無ガンマグロブリン症候群および低ガンマグロブリン血症(原発性免疫不全)、後天性の免疫不全状態(続発性免疫不全)、(2)炎症性自己免疫疾患、(3)急性感染症、を治療する、無菌の精製されたIgG製品である。

40

【0002】

50

特に、原発性免疫不全障害を持つ多くの人々は感染症に抵抗するのに必要な抗体が欠乏している。場合によっては、精製 I g G を静脈内注射で投与（すなわち I V I G 治療）することで欠乏を補い得る。X 連鎖無ガンマグロブリン症候群（X L A）および分類不能型低ガンマグロブリン血症（C V I D）、高 I g M 症候群（H I M）、重症複合免疫不全症候群（S C I D）、そしていくつかの I g G サブクラス欠損といった原発性免疫不全障害は一般にその方法で治療される（Blaese and Winkelstein, J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007（非特許文献 1））。

【 0 0 0 3 】

I V I G 療法は原発性免疫不全の治療に非常に有効であるが、病気の治癒というよりも体内で産生されていない抗体への一時的な置換に過ぎない。従って、I V I G 療法に依存している患者は、一般的に月約一度の反復投与を一生続ける必要がある。この必要性は I V I G 組成物の継続的な産生に要求を突きつける。しかしながら、組み換え D N A ベクターの生体外発現を用いて産生される他の生物製剤と異なり、I V I G はヒト血液や血漿から分画される。それゆえ、I V I G 製品は単純に生産量を増やすことでは増えない。むしろ商業利用可能な I V I G のレベルは利用できる血液や血漿の供給量によって制限される。

10

【 0 0 0 4 】

いくつかの要因が I V I G の需要を推進しており、それには I V I G 療法の容認、I V I G 療法が有効であるという追加適応の同定、患者診断や I V I G 製剤の増加が含まれる。とりわけ、I V I G の世界的な需要は 1 9 9 0 年から 4 倍より多く増加しており、今日でも年率約 7 % から 1 0 % の間で増え続けている（Robert P., Pharmaceutical Policy and Law, 11(2009)359-367（非特許文献 2））。例えば、オーストラリア国立血液機関はオーストラリアにおける I V I G の需要が 2 0 0 8 - 2 0 0 9 年度で 1 0 . 6 % 増加したと報告している（National Blood Authority Australia Annual Report 2008-2009（非特許文献 3））。

20

【 0 0 0 5 】

増加する世界的な需要や免疫グロブリン製品の利用可能な供給量の変動により、オーストラリアや英国を含むいくつかの国では、製品不足のときに需要の高い患者への供給を守るための需要管理プログラムを実行してきた。

30

【 0 0 0 6 】

2 0 0 7 年には、2 6 5 0 万リットルの血漿が分画され、7 5 . 2 トンの I V I G が作られ、その平均産生量は 2 . 8 g / L であったと報告されている（Robert P., 上記（非特許文献 2））。この同じ報告書において、全体的な I V I G 収率は 2 0 1 2 年までに約 3 . 4 3 g / L へ増加することが期待されると予想されていた。しかしながら、世界的な I V I G 需要の継続増加によって、今後 2 0 1 5 年までに約 7 % ~ 1 3 % の年間増加が見込まれており、世界的な需要を満たすためには全体的な I V I G 収率のさらなる改善が必要である。

【 0 0 0 7 】

多くの I V I G 調製法が I V I G 製品の市場供給者によって用いられている。今日の I V I G 産生法における 1 つの共通問題は精製過程における I g G の多大な減少であり、出発物質中の I g G 含有量の少なくとも 3 0 % ~ 3 5 % になると見積もられる。I g G 収率を増強する一方で、1 つの課題として副作用の原因となるウイルス不活化や不純物除去の品質を維持することがある。現在の I V I G 生産レベルでは、収率におけるわずかな増加であっても実際には非常に大きな影響を与えられている。2 0 0 7 年時点の生産レベルを例にとると、2 % の効率上昇は 5 6 m g / L の追加に相当し、追加 1 . 5 トンの I V I G を産生することになる。

40

【 0 0 0 8 】

血清、血漿タンパク質の調製および特性に関して一連の影響力をもつ論文の第 4 の連載記事において、コーンら（J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3):459-475（非特許文献 4））

50

はヒト血漿から富化 I g G 画分の単離を可能にする血漿タンパクのアルコール分画法について初めて記述した（方法 6）。数年後、オンクレイら（J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2):541-550（非特許文献 5））はコーン方法を拡張し、より純粋な I g G 調製品の単離をもたらす方法（方法 9）を発表した。

【 0 0 0 9 】

これらの方法は血液因子由来の血漿業界全体の基礎を作った一方、川崎病および血小板減少性紫斑病、原発性免疫不全といったいくつかの免疫系関連疾患の治療に十分に高い濃度の I g G 調製品を与えることができなかった。それで、イオン交換クロマトグラフィーのような様々な技術を用いて、より純粋で濃度の高い I g G 製剤を調製するためのさらなる方法論が開発された。ホッペら（Munch Med Wochenschr 1967(34):1749-1752（非特許文献 6））やファルクスベーデン（スウェーデン特許第348942号（特許文献 1））、ファルクスベーデンとルンドブラッド（Methods of Plasma Protein Fractionation 1980（非特許文献 7））はこの目的でイオン交換クロマトグラフィーを先駆けて用いた。

【 0 0 1 0 】

沈殿の工程では、カプリル酸塩沈殿（Lebing et al., Vox Sang 2003(84):193-201（非特許文献 8））やコーンフラクション（I +）I I + I I I エタノール沈殿法（Tanaka et al., Braz J Med Biol Res 2000(33)37-30（非特許文献 9））とカラムクロマトグラフィーを組み合わせた様々な最新の方法が用いられている。ごく最近では、テシュナーら（Vox Sang, 2007(92):42-55（非特許文献 10））はプール血漿からクリオ沈殿物を最初に除き、それから改変コーン - オンクレイの冷エタノール分画、続いて中間イオン交換クロマトグラフィーの S / D 処理、ナノ濾過、任意で限外濾過 / 透析濾過を行って 10 % I V I G 製品を産生する方法を記述した。

【 0 0 1 1 】

しかしながら、これらの I g G 製造方法によって純度や安全性、収率が改善されたにもかかわらず、精製過程において相当量の I g G が未だ失われている。例えば、テシュナーらは彼らの方法で I g G 収率が 65 % 増加したと報告している（Teschner et al., 上記（非特許文献 10））。様々な血漿製品のミーティングで報告されているように、バクスターや CSL ベーリング、アップフロントテクノロジー、キャンジーン、プロメトリックバイオセラピューティックス、フィンランド赤十字社らの I g G の大規模調製における平均収率は最終製品で約 61 % から 65 % である。これは製造工程中にプール血漿画分に存在する I g G の少なくとも 3 分の 1 が失われていることを意味している。

【 0 0 1 2 】

そのため、I V I G 製品を改良されたより効率の良い方法で製造する必要がある。本発明はこのことや現在よりも少なくとも 6 から 10 % 高い収率を生み出す I V I G 製造方法を提供することにより、これらや他の必要性を満たすものであるとともに、I V I G 組成物を提供するものである。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 3 】

【 特許文献 1 】 スウェーデン特許第348942号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 4 】

【 非特許文献 1 】 Blaese and Winkelstein, J. Patient & Family Handbook for Primary Immunodeficiency Diseases. Towson, MD: Immune Deficiency Foundation; 2007

【 非特許文献 2 】 Robert P., Pharmaceutical Policy and Law, 11(2009)359-367

【 非特許文献 3 】 National Blood Authority Australia Annual Report 2008-2009

【 非特許文献 4 】 コーンら、J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3):459-475

【 非特許文献 5 】 オンクレイら、J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2):541-550

【 非特許文献 6 】 ホッペら、Munch Med Wochenschr 1967(34):1749-1752

【 非特許文献 7 】 ファルクスベーデンとルンドブラッド、Methods of Plasma Protein Fr

10

20

30

40

50

actionation 1980

【非特許文献 8】Lebing et al., Vox Sang 2003(84):193-201

【非特許文献 9】Tanaka et al., Braz J Med Biol Res 2000(33)37-30

【非特許文献 10】テシュナーら、Vox Sang, 2007(92):42-55

【発明の概要】

【0015】

1つの態様では、本発明は血漿由来の富化 I g G 組成物（例えば I V I G 組成物）を調製する方法を提供するものである。有利な点として、ここに提供する方法は I V I G 組成物を調製する現在の最先端の方法に有意な改良を提供する。例えば、ここに提供する方法は静脈注射に必要な純度を失うことなく、最終バルク組成物における I g G 収率を増加させることを可能にする。

10

【0016】

1つの態様では、血漿由来の富化 I g G 組成物を調製する方法として、(a)第1の沈殿工程として、pH 約 7.0 から約 7.5 にて約 6% から約 10% のアルコールを用いて脱クリオ血漿画分を沈殿させ、第1の沈殿物と第1の上清を得る工程、(b)第2の沈殿工程として、pH 約 6.7 から約 7.3 にて約 20% から約 25% のアルコールを用いて前記第1の上清から I g G を沈殿させ、第2の沈殿物を形成させる工程、(c)前記第2の沈殿物を再懸濁して懸濁液を形成させる工程、(d)第3の沈殿工程として、pH 約 6.7 から約 7.3 にて約 22% から約 28% のアルコールを用いて工程(c)にて形成された前記懸濁液から I g G を沈殿させ、第3の沈殿物を形成させる工程、(e)前記第3の沈殿物を再懸濁して懸濁液を形成させる工程、および(f)工程(e)にて形成された前記懸濁液から可溶性画分を分離し、それによって富化 I g G 組成物を形成させる工程を含み、少なくとも前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、前記第3の沈殿工程の少なくとも一つが前記アルコールのスプレー添加を含む、方法を提供する。1つの実施形態では、前記第1の沈殿工程でアルコールがスプレー法にて添加される。別の実施形態では、前記第2の沈殿工程でアルコールがスプレー法にて添加される。さらに別の実施形態では、前記第3の沈殿工程でアルコールがスプレー法にて添加される。

20

【0017】

ある実施形態では、一つ以上の溶液の pH はスプレー法による pH 調整剤の添加によって調整され得る。関連する実施形態では、前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、前記第3の沈殿工程の少なくとも一つ以上の pH は、アルコール添加後、またはアルコール添加前後、またはアルコール添加中および添加後、またはアルコール添加前、添加中および添加後に pH 調整溶液を添加することで達成される。さらに別の関連する実施形態では、pH は、pH の連続的な調整により全沈殿工程で維持される。

30

【0018】

1つの特定の実施形態では、前記第1の沈殿工程の pH が pH 調整剤のスプレー添加によってアルコール添加後に調整される。別の実施形態では、前記第2の沈殿工程の pH が pH 調整剤のスプレー添加によってアルコール添加後に調整される。さらに別の実施形態では、前記第3の沈殿工程の pH が pH 調整剤のスプレー添加によってアルコール添加後に調整される。

40

【0019】

さらに、ここで提供される予備の方法は、イオン交換クロマトグラフィー工程（例えば、陰イオン交換および/または陽イオン交換クロマトグラフィー）、ナノ濾過工程、限外濾過/透析濾過工程や I V I G 調製品の純度または品質をさらに高めるのに適した他の精製技術から成る。

【0020】

別の態様では、脱クリオ血漿画分の pH を 7.0 または約 7.0 に調整する工程、(b)温度 - 7 または約 - 7 から - 9 または約 - 9 の間で工程(a)の前記脱クリオ血漿のエタノール濃度を 25% または約 25% (体積/体積)に調整することにより混合物を形成させる工程、(c)工程(b)の前記混合物を液体と沈殿物に分離する工程、(

50

d) 工程(c)の前記沈殿物を、1000Lあたり600mLまたは約600mLの氷酢酸にてpHを調整したリン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液で再懸濁させることにより、懸濁液を形成する工程、(e)微粉化した二酸化ケイ素(SiO_2)と工程(d)の前記懸濁液を少なくとも約30分間混ぜる工程、(f)加圧濾過器で前記懸濁液を濾過することにより濾過液を形成させる工程、(g)少なくとも加圧濾過器のデッドボリュームの3容量の、1000Lあたり150mLまたは約150mLの氷酢酸でpH調整した、リン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液を用いて、前記加圧濾過器を洗浄することにより、洗浄液を形成させる工程、(h)工程(f)の前記濾過液と工程(g)の前記洗浄液を混合することにより溶液を形成し、前記溶液を界面活性剤で処理する工程、(i)工程(h)の前記溶液のpHを7.0または約7.0に調整して、終濃度が25%または約25%になるようにエタノールを加えることにより沈殿物を形成させる工程、(j)工程(i)の前記混合物を液体と沈殿物に分離する工程、(k)前記沈殿物を溶媒または界面活性剤を含む水溶液に溶解し、少なくとも60分間保持する工程、(l)工程(k)後の前記溶液を陽イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、前記カラムに吸着したタンパク質を溶出液に溶出する工程、(m)工程(l)からの前記溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、流出液を生成させる工程、(n)工程(m)からの前記流出液をナノフィルターに通しナノ濾過液を生成させる工程、(o)工程(n)からの前記ナノ濾過液を限外濾過膜に通し限外濾過液を生成させる工程、(p)工程(o)からの前記限外濾過液を透析濾過緩衝液にて透析濾過し約8%(重量/体積)から約12%(重量/体積)のタンパク質濃度を有する透析濾過液を生成することにより富化IgG組成物を得る工程を含む、血漿から富化IgG組成物を調製する方法を提供する。

10

20

【0021】

別の態様では、本発明はここに記述した方法で調製された水性IgG組成物を提供する。一般的にそのIgG組成物は高純度で(例えば、少なくとも95%、98%、99%またはそれ以上のIgG含有量)、約20g/Lから約200g/Lのタンパク質濃度を含み、IgG、IgM、フィブリノーゲン、トランスフェリン、ACA、アミド分解活性、PKA等の一般的なIVI混入物質を極めて低レベルに含んでいる。

【0022】

さらに別の態様では、医薬IgG組成物やIVI療法での使用に適した製剤を提供する。医薬製剤は高純度で(例えば、少なくとも98%または99%、それ以上のIgG含有量)、約20g/Lから約200g/Lのタンパク質濃度であり、IgG、IgM、フィブリノーゲン、トランスフェリン、ACA、アミド分解活性、PKA等の一般的なIVI混入物質を極めて低レベルに含んでいる。一般的に、医薬組成物は静脈内投与(つまり、IVI療法)、皮下投与または筋肉内投与用に製剤化するのがふさわしい。

30

【0023】

別の態様では、本発明はそれを必要とするヒトの免疫不全または自己免疫疾患、急性感染症を治療する方法を提供し、その方法というのはここに記述した医薬組成物の投与から成る。ここに提供される方法にて治療または処置され得る病気や容態は同種骨髄移植および慢性リンパ性白血病、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、小児HIV、原発性免疫不全、川崎病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(CIDP)、高抗体レシピエントまたはABO不適合ドナーの腎臓移植、慢性疲労症候群、クロストリジウム・ディフィシル大腸炎、皮膚筋炎や多発性筋炎、グレーブス病眼症、ギラン・バレー症候群、筋ジストロフィー、封入体筋炎、イートン・ランバート症候群、エリテマトーデス、多巣性運動ニューロパシー、多発性硬化症(MS)、重症筋無力症、新生児アロ免疫血小板減少症、パルボウイルスB19感染、天疱瘡、輸血後紫斑病、腎移植拒絶反応、自然流産、スティッフパーソン症候群、オプソクロノス・ミオクロノス症候群、重症敗血症や重症成人の敗血性ショック、中毒性表皮剥離症、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、X連鎖無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、原発性免疫不全、RRMS、アルツハイマー病、パーキンソン病に限定されない。

40

[本発明1001]

50

(a) 第1の沈殿工程として、p H 約7 . 0から約7 . 5にて約6%から約10%のアルコールを用いて脱クリオプラスミド画分を沈殿させ、第1の沈殿物と第1の上清を得る工程と、

(b) 第2の沈殿工程として、p H 約6 . 7から約7 . 3にて約20%から約25%のアルコールを用いて前記第1の上清からI g Gを沈殿させ、第2の沈殿物を形成する工程と、

(c) 前記第2の沈殿物を再懸濁して懸濁液を形成する工程と、

(d) 第3の沈殿工程として、p H 約6 . 7から約7 . 3にて約22%から約28%のアルコールを用いて工程 (c) にて形成された前記懸濁液からI g Gを沈殿させ、第3の沈殿物を形成する工程と、

(e) 前記第3の沈殿物を再懸濁して懸濁液を形成する工程と、

(f) 工程 (e) にて形成された前記懸濁液から可溶性画分を分離することにより富化I g G組成物を形成する工程と
を含み、

前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、または前記第3の沈殿工程の少なくとも1つが、アルコールのスプレー添加を含む、血漿由来の富化I g G組成物を調製する方法。

[本発明1002]

前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、および前記第3の沈殿工程の全てがアルコールのスプレー添加を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、または前記第3の沈殿工程の少なくとも1つの前記p Hは前記アルコール添加後、p H調整溶液の添加により達成される、本発明1001または本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記第1の沈殿工程、前記第2の沈殿工程、および前記第3の沈殿工程の全ての前記p Hは前記アルコール添加後、p H調整溶液の添加により達成される、本発明1001～本発明1003の何れかの方法。

[本発明1005]

前記p H調整溶液の添加が前記p H調整溶液のスプレー添加を含む、本発明1003または本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記沈殿工程のp Hは、前記アルコール添加前および添加後、前記アルコール添加中および添加後、または前記アルコール添加前、添加中および添加後に調整される、本発明1003～本発明1005の何れかの方法。

[本発明1007]

少なくとも1つの沈殿工程のp Hは、前記p Hの連続的な調整により前記全沈殿工程で維持される、本発明1001～本発明1006の何れかの方法。

[本発明1008]

イオン交換クロマトグラフィー精製工程をさらに含む、本発明1001～本発明1007の何れかの方法。

[本発明1009]

陰イオン交換クロマトグラフィー精製工程と陽イオン交換クロマトグラフィー工程の両方を含む、本発明1008の方法。

[本発明1010]

ナノ濾過工程および/または限外濾過/透析濾過工程をさらに含む、本発明1001～本発明1009の何れかの方法。

[本発明1011]

工程 (f) にて得られた前記富化I g G組成物が、工程 (a) にて用いられた脱クリオ血漿画分で見られるI g G含有量の少なくとも85%を含む、本発明1001～本発明1010の何れかの方法。

[本発明1012]

工程 (f) にて得られた前記富化I g G組成物が、工程 (a) にて用いられた脱クリオ

10

20

30

40

50

血漿画分で見られる I g G 含有量の少なくとも90%を含む、本発明1011の方法。

[本発明1013]

最終 I g G 組成物における - グロブリン純度が少なくとも約95%である、本発明1001 ~ 本発明1012の何れかの方法。

[本発明1014]

最終 I g G 組成物における - グロブリン純度が少なくとも約98%である、本発明1013の方法。

[本発明1015]

最終 I g G 組成物における - グロブリン純度が少なくとも約99%である、本発明1013の方法。

[本発明1016]

(a) 脱クリオ血漿画分の前記 p H を約7.0に調整する工程と、

(b) 約 - 7 から約 - 9 の温度で、工程 (a) の前記脱クリオ血漿画分のエタノール濃度を約25% (体積 / 体積) に調整することにより、混合物を形成する工程と、

(c) 工程 (b) の前記混合物を液体と沈殿物に分離する工程と、

(d) 工程 (c) の前記沈殿物を、1000 L あたり300 m L から700 m L の氷酢酸で p H を調整したリン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液で再懸濁させることにより、懸濁液を形成する工程と、

(e) 微粉化した二酸化ケイ素 (S i O ₂) と工程 (d) の前記懸濁液を少なくとも約30分間混ぜる工程と、

(f) 加圧濾過器で前記懸濁液を濾過することにより濾過液を形成する工程と、

(g) 少なくとも加圧濾過器のデッドボリウムの3容量の、1000 L あたり50 m L から200 m L の氷酢酸で p H を調整した、リン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液を用いて、前記加圧濾過器を洗浄することにより、洗浄液を形成する工程と、

(h) 工程 (f) の前記濾過液と工程 (g) の前記洗浄液を混合することにより溶液を形成し、前記溶液を界面活性剤 (d e t e r g e n t) で処理する工程と、

(i) 工程 (h) の前記溶液の前記 p H を約7.0に調整し、終濃度が約25%になるようにエタノールを加えることにより、沈殿物を形成する工程と、

(j) 工程 (i) の混合物を液体と沈殿物に分離する工程と、

(k) 前記沈殿物を溶媒または界面活性剤を含む水溶液に溶解し、前記溶液を少なくとも60分間保持する工程と、

(l) 工程 (k) 後の前記溶液を陽イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、前記カラムに吸着したタンパク質を溶出液に溶出する工程と、

(m) 工程 (l) からの前記溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し流出液を生成する工程と、

(n) 工程 (m) からの前記流出液をナノフィルターに通しナノ濾過液を生成する工程と、

(o) 工程 (n) からの前記ナノ濾過液を限外濾過膜に通し限外濾過液を生成する工程と、

(p) 工程 (o) からの前記限外濾過液を透析濾過緩衝液に対して透析濾過し、約8% (重量 / 体積) から約12% (重量 / 体積) のタンパク質濃度を有する透析濾過液を生成することにより濃縮 I g G 組成物を得る工程と、
を含む、本発明1001の方法。

[本発明1017]

工程 (b) および (i) の少なくとも1つにおいて、エタノール濃度はエタノールを前記画分にスプレー法で導入することにより調製される、本発明1016の方法。

[本発明1018]

工程 (b) および (i) の少なくとも1つにおいて、エタノール添加後に p H を適切な p H に調整する、本発明1016または本発明1017の方法。

[本発明1019]

10

20

30

40

50

工程 (b) および (i) の少なくとも1つにおいて、p Hはp Hの連続的な調整により全沈殿反応で維持される、本発明1018の方法。

[本発明1020]

p Hの調整をすることができる溶液をスプレーすることにより、p Hが少なくとも1つの工程において調整される、本発明1016～本発明1019の何れかの方法。

[本発明1021]

氷酢酸をスプレーすることによりp Hが調整される、本発明1020の方法。

[本発明1022]

0.22 μ m以下のフィルターを通して前記透析濾過液を濾過する工程をさらに含む、本発明1016～本発明1021の何れかの方法。

10

[本発明1023]

前記血漿がヒト血漿である、本発明1016～本発明1022の何れかの方法。

[本発明1024]

前記脱クリオ血漿画分が、

(i) プール血漿供与物の混合物を約2 から約10 の温度に冷却する工程と、

(i i) 遠心分離により工程 (i) の前記混合物を液体と沈殿物に分離する工程と、

(i i i) 工程 (i i) で形成された前記液体上清に終濃度が約5% (体積 / 体積) から約10% (体積 / 体積) になるようにエタノールを混ぜることにより混合物を形成する工程と、

(i v) 工程 (i i i) で形成された前記混合物を約 - 4 から約0 に冷却する工程と

20

、
(v) 遠心分離により工程 (i v) の前記混合物を液体と沈殿物に分離し、上清を単離することにより、脱クリオ血漿画分を形成する工程と、

を含む方法により形成される、本発明1016～本発明1023の何れかの方法。

[本発明1025]

工程 (b) の前記混合物の温度が約 - 7 である、本発明1016～本発明1024の何れかの方法。

[本発明1026]

工程 (c) で形成された前記沈殿物は沈殿物1 k gあたり約12 Lから約18 Lの緩衝液で再懸濁される、本発明1016～本発明1025の何れかの方法。

30

[本発明1027]

前記沈殿物は沈殿物1 k gあたり約15 Lの緩衝液で再懸濁される、本発明1026の方法。

[本発明1028]

工程 (e) において前記懸濁液に加えられた二酸化ケイ素の量が、工程 (c) で形成された沈殿物1 gあたり約0.02 gから約0.06 gである、本発明1016～本発明1027の何れかの方法。

[本発明1029]

工程 (e) において前記懸濁液に加えられた二酸化ケイ素の量が、工程 (c) で形成された沈殿物1 gあたり約0.04 gである、本発明1028の方法。

[本発明1030]

40

工程 (f) における濾過の前に濾過助剤を前記混合物に加える、本発明1016～本発明1029の何れかの方法。

[本発明1031]

前記濾過助剤が珪藻土である、本発明1030の方法。

[本発明1032]

工程 (f) で形成された前記濾過液における - グロブリン純度が少なくとも約85%である、本発明1016～本発明1031の何れかの方法。

[本発明1033]

工程 (f) で形成された前記濾過液が全タンパク質1 gあたり約10 m g未満のフィブリノーゲンを含む、本発明1016～本発明1032の何れかの方法。

50

[本発明1034]

工程（f）で形成された前記濾過液が全タンパク質1gあたり約500 IU未満のPKA活性を含む、本発明1016～本発明1033の何れかの方法。

[本発明1035]

工程（h）で使用された前記界面活性剤が約0.1%（重量／体積）から約0.3%（重量／体積）のポリソルベート-80を含む、本発明1016～本発明1034の何れかの方法。

[本発明1036]

工程（k）で用いた前記水溶液がトリトン-X100、ポリソルベート-80、およびTNBPを含む、本発明1016～本発明1035の何れかの方法。

[本発明1037]

工程（k）において前記溶液が約18 から約25 の温度で保持される、本発明1016～本発明1036の何れかの方法。

[本発明1038]

工程（n）の前記ナノフィルターが約15nmから約72nmの平均ポアサイズを有する、本発明1016～本発明1037の何れかの方法。

[本発明1039]

前記ナノフィルターが約19nmから約35nmの平均ポアサイズを有する、本発明1038の方法。

[本発明1040]

前記ナノフィルターが約35nmの平均ポアサイズを有する、本発明1039の方法。

[本発明1041]

工程（o）の前記限外濾過膜が約100kDa以下の公称分画分子量（NMWCO）を有する、本発明1016～本発明1040の何れかの方法。

[本発明1042]

前記組成物の前記タンパク質濃度が約10%（重量／体積）である、本発明1016～本発明1041の何れかの方法。

[本発明1043]

工程（h）で形成された前記溶液が、工程（a）の前記脱クリオ血漿画分に存在するIgGを少なくとも約85%含む、本発明1016～本発明1042の何れかの方法。

[本発明1044]

工程（h）で形成された前記溶液が、工程（a）の前記脱クリオ血漿画分に存在するIgGを少なくとも約90%含む、本発明1043の方法。

[本発明1045]

先行する本発明のいずれかの方法により調製される水性IgG組成物。

[本発明1046]

組成物1Lあたり少なくとも約80gのタンパク質を含む、本発明1045の水性IgG組成物。

[本発明1047]

タンパク質の少なくとも95%がIgGである、本発明1045または本発明1046の水性IgG組成物。

[本発明1048]

前記タンパク質の少なくとも98%がIgGである、本発明1047の水性IgG組成物。

[本発明1049]

約35μg/mL未満のIgAを含む、本発明1045～本発明1048の何れかの水性IgG組成物。

[本発明1050]

本発明1001～本発明1044のいずれかの方法により調製される水性IgG組成物を含む、医薬組成物。

[本発明1051]

組成物1Lあたり約100gのタンパク質を含む、本発明1050の医薬組成物。

10

20

30

40

50

[本発明1052]

約200mMから約300mMの濃度でグリシンをさらに含む、本発明1050または本発明1051の医薬組成物。

[本発明1053]

前記組成物のpHが約4.6から約5.1である、本発明1050～本発明1052の何れかの医薬組成物。

[本発明1054]

前記組成物の容量オスモル濃度が約240mOsmol/kgから約300mOsmol/kgである、本発明1050～本発明1053の何れかの医薬組成物。

[本発明1055]

室温で少なくとも約9か月間安定である、本発明1050～本発明1054の何れかの医薬組成物。

[本発明1056]

約2 から約8 で少なくとも約36か月間安定である、本発明1050～本発明1055の何れかの医薬組成物。

[本発明1057]

静脈内投与用に製剤化される、本発明1050～本発明1056の何れかの医薬組成物。

[本発明1058]

本発明1050～本発明1057のいずれかの医薬組成物を投与することを含む、それを必要とするヒトの免疫不全、自己免疫疾患または急性感染症を治療する方法。

【図面の簡単な説明】【0024】

【図1】濾過後の濾過装置の洗浄に用いた緩衝液のデッドボリユームの関数として表される、フラクションII+IIIの濾過洗浄液中に存在するELISA()および比濁分析法()により測定されたIgG濃度と全タンパク質濃度()。

【図2】アエロジル(二酸化ケイ素)処理の有無において酢酸添加による、pH3.8～5.0の抽出および清澄化後の沈殿物G溶解画分における平均PKA活性。

【図3】アエロジル(二酸化ケイ素)処理の有無において酢酸添加による、pH3.8～5.0の抽出および清澄化後の沈殿物G溶解画分における平均フィブリノーゲン含有量。

【図4】アエロジル(二酸化ケイ素)処理の有無において酢酸添加による、pH3.8～5.0の抽出および清澄化後の沈殿物G溶解画分におけるアミド分解活性。

【図5】4 で2週間()または室温でさらに1週間インキュベートした後()のpH3.8～7.8にて抽出および清澄化した沈殿物G溶解画分におけるアミド分解活性。

【図6】pH3.8～7.8にて抽出および清澄化した沈殿物G溶解画分におけるPKA活性。

【図7】ヒュームドシリカ処理の有無による改変フラクションII+III濾過液の純度の相違。(A)濾過助剤のみで清澄化した改変フラクションII+III濾過液、および(B)ヒュームドシリカ処理後に清澄化した改変画分II+III濾過液の酢酸セルロース電気泳動のクロマトグラフ。

【図8】IgG大量製造における、沈殿用のアルコール添加後の6.9のフラクションII+III上清のpH変動。

【図9】改変フラクションII+III沈殿物の抽出用緩衝液における氷酢酸の量とpHの関係。

【図10】改変フラクションII+III懸濁液のフィルター後洗浄緩衝液における氷酢酸の量とpHの関係。

【発明を実施するための形態】【0025】

定義

本明細書で用いられる場合、「抗体」は、分析物(抗原)と特異的に結合しかつ認識する免疫グロブリン遺伝子に実質的にコードされるポリペプチド、または、それらの断片を

10

20

30

40

50

指す。認識される免疫グロブリン遺伝子として、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロンおよびミュー定常領域遺伝子、ならびに、ミリアド免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、カッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、それぞれ、I g G、I g M、I g A、I g D、およびI g Eの順で、免疫グロブリン型を定義する。

【 0 0 2 6 】

典型的な免疫グロブリン（抗体）構造ユニットは、2対のポリペプチド鎖で構成され、各々の対は、1つの「軽」鎖（約25 kD）と1つの「重」鎖（約50～70 kD）を有する。各々の鎖のN末端は、抗原認識に寄与する約100～110以上のアミノ酸の可変領域を定める。用語、可変軽鎖（V_L）および可変重鎖（V_H）は、それぞれ、これらの軽鎖および重鎖を指す。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書で用いられる場合、「限外濾過（UF）」という用語は、水圧が液体を半浸透性膜に押し付ける、様々な膜濾過方法を包含する。懸濁された高分子量の固体および溶質は保持されるが、水および低分子量の溶質は膜を通過する。この分離プロセスは、マクロ分子（10³～10⁶ Da）の溶液、特に、タンパク質溶液を精製し、濃縮するのに利用されることが多い。数多くの限外薄膜は、それらの膜が保持する分子の大きさに応じて、入手することができる。限外濾過は、典型的には、1 kDaと1000 kDaの間の膜ポアサイズおよび0.01と10 barの間の操作圧力を特徴とし、糖類および塩類のような小分子からタンパク質のようなコロイドを分離するのに特に有用である。

20

【 0 0 2 8 】

本明細書で用いられる場合、「透析濾過」という用語は、限外濾過と同じ膜を用いて実行され、接線流濾過である。透析濾過の間、緩衝液を再利用タンク内に導入するのに対し、濾過液はユニット操作から取り除く。生成物が残余物内にある（例えば、I g G）プロセスでは、透析濾過は、成分を生成物プールから濾過液内へ洗い出し、それにより、緩衝液を交換し、望ましくない種の濃度を低減させる。

【 0 0 2 9 】

本明細書で用いられる場合、「約」という用語は、特定値から正負10%の近似範囲を表す。例えば、語句「約20%」は、18～22%の範囲を含む。

【 0 0 3 0 】

30

本明細書で用いられる場合、「混合」という用語は、いずれかの形式の攪拌により溶液または懸濁液中に2つ以上の別個の化合物または物質を等しく配分する行為を説明する。この用語が本願に利用される場合、「混合」の結果として、溶液または懸濁液中で全ての成分を完全に均等に配分する必要はない。

【 0 0 3 1 】

本明細書で用いられる場合、「溶媒」という用語は、1つ以上の他の物質を溶解または分散することを可能にする、任意の液体物質を包含する。溶媒は、本質的に、水等の無機質である可能性があり、エタノール、アセトン、酢酸メチル、酢酸エチル、ヘキサン、石油エーテル等のような有機液体である可能性がある。溶媒は、「溶媒界面活性剤処理」という用語で用いられる場合、溶液中の脂質エンベロープウイルスを不活性にするのに利用される溶媒界面活性剤混合物の一部である、有機溶媒（例えば、リン酸トリ-N-ブチル）を表す。

40

【 0 0 3 2 】

本明細書で用いられる場合、「界面活性剤（detergent）」という用語は、本出願で、用語「界面活性剤（surfactant）」または「界面活性剤（surface acting agent）」と交換可能に利用される。界面活性剤は、典型的には、両媒性の、即ち、疎水基（「尾部」）と親水基（「頭部」）の両方を含む有機化合物であり、それらの官能基により、界面活性剤は、有機溶媒と水の両方に溶ける。界面活性剤は、その頭部が形式的に荷電基の存在により分類され得る。非イオン性界面活性剤は、その頭部に荷電基がないのに対し、イオン性界面活性剤は、その頭部が電荷を帯びている

50

。双性イオン界面活性剤は、2つの反対に帯電された基を有する頭部を含む。通常の界面活性剤の幾つかの実例として、（硫酸塩陰イオン、スルホン酸塩陰イオンまたはカルボン酸塩陰イオンに基づく）陰イオン性では、ペルフルオロオクタン酸塩（PFOAまたはPFO）、ペルフルオロオクタンスルホン酸塩（PFOS）、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、ラウリル硫酸アンモニウム、および他のアルキル硫酸塩、ラウリル硫酸ナトリウム（ラウリルエーテル硫酸ナトリウム、またはSLESとしても知られている）、アルキルベンゼンスルホン酸塩と、（第四級アンモニウム陽イオンに基づく）陽イオン性では、セチルトリメチルアンモニウム臭化物（CTAB）、別名、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、および他のアルキルトリメチルアンモニウム塩類、セチルピリジニウム塩化物（CPC）、ポリエトキシ化獣脂アミン（POEA）、塩化ベンザルコニウム（BAC）、塩化ベンゼトニウム（BZT）と、カプリル酸塩、カプリル酸、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸、ヘプタン酸、ナノ酸、デカン酸等を含む長鎖脂肪酸およびそれらの塩類と、双性イオン性（両性）では、ドデシルベタイン、ヤシ酸アミドプロピルベタイン、ココ両性グリシネートと、非イオン性では、アルキルポリ（エチレンオキシド）、アルキルフェノールポリ（エチレンオキシド）、ポリ（エチレンオキシド）とポリ（プロピレンオキシド）との共重合体（ポロキサマー類またはポロキサミン類として市場で知られている）、オクチルグルコシド、デシルマルトシド、脂肪アルコール（例えば、セチルアルコールおよびオレイルアルコール）、ココミドMEA、ココミドDEA、ポリソルベート類（ツイン20、ツイン80等）、トリトン界面活性剤、およびドデシルジメチルアミンオキシドを含むアルキルポリグルコシド類が挙げられる。

【0033】

本明細書で用いられる場合、「静脈注射IgG」または「IVIg」処置という用語は、一般に、IgG免疫グロブリンの組成物を患者に静脈内投与、皮下投与または筋肉内投与して、免疫不全、炎症、および自己免疫疾患等の数多くの症状を治療する治療方法を指す。IgG免疫グロブリンは、典型的には、プールされており、血漿から調製される。抗体全体または断片を利用することができる。IgG免疫グロブリンは、皮下投与のために高濃度（例えば、10%超過）に製剤化されるか、または筋肉内投与のために製剤化され得る。これは、特定の抗原（例えば、RhD因子、百日咳毒素、破傷風毒素、ボツリヌス毒素、狂犬病等）に対する平均タイターよりも高いタイターで調製される、特化されたIgG製剤に特に共通のことである。議論し易くするために、そのような皮下投与または筋肉内投与用に製剤化されるIgG組成物も、本願では、用語「IVIg」に含まれる。

【0034】

「治療上有効な量または投与量」または「十分な／有効な量または投与量」は、投与されて効果を作り出す投与量を意味する。正確な投与量は、治療目的に依存することになり、当業者により、公知の技術を利用して確認されるであろう（例えば、リバーマン、医薬適用法（第1～3巻、1992年）、ロイド、医薬調合の技術、科学技術（1999年）、ピッカー、投与量計算法（1999年）、および、レミングトン、調剤科学および実践、第20版（2003年、ジェンナロ、リピンコット、ウィリアムズ&ウィルキンス出版を参照のこと））。

【0035】

本願において用いられる場合、用語「スプレー」は、例えば、改変コーン分画法IまたはII+III沈殿工程などのアルコール沈殿工程の間に液体の物質をその細かい水滴または霧の形状で系に送達する手段を意味する。スプレーヘッドまたはノズルを有し、手で、または、自動で操作されて液体から微細な霧を発生させる容器（例えば、スプレーボトル）などのいかなる加圧装置によってもスプレーを達成することができる。典型的には、系内で液体の急速かつ均等な分配を確実にするために系を連続的に攪拌するかまたは混合しながらスプレーを実行する。

【0036】

本発明の詳細な説明

10

20

30

40

50

I. 概要

現代の医薬で通常実施されているように、濃縮された免疫グロブリン類（特に、I g G類）の無菌製剤が、3つの主要な種類に分類される病状：免疫不全、炎症および自己免疫疾患、および急性感染症の治療に用いられる。一般に用いられているI g G製品の1つである静脈注射用免疫グロブリン、すなわちI V I Gは、例えば、10%または約10%のI g G濃度で静脈内投与用に製剤化されている。濃縮免疫グロブリン類は、例えば、20%または約20%のI g G濃度で皮下投与用または筋肉内投与用に製剤化されることもできる。議論し易くするために、そのような皮下投与または筋肉内投与用に製剤化されたI g G組成物はまた、「I V I G」という言葉で本願に含まれる。

【0037】

ある態様では、本発明は、生成物の最終収率を上昇させるI V I G製造方法を提供し、さらに、同等の、または、より高い品質の、いくつかの場合ではさらに高い濃度のI V I G組成物を提供する。1つの実施形態では、本発明は、1つ以上の沈殿工程でI g G損失を低減させる改変コーン分画法を提供する。

【0038】

別の態様では、本発明は、本明細書において提供される改良された製造方法に従って調製されるI g G組成物を提供する。好都合なことに、これらの組成物は、本明細書において提供される方法により与えられた収率の向上のため、現在入手可能な市販品よりも製造費が少ない。さらに、これらの組成物は、商業ベースの方法を用いて製造された組成物と少なくとも同程度に純粋である。重要なことに、これらの組成物は、免疫不全、炎症および自己免疫疾患、および急性感染症のI V I G療法での使用に適切である。1つの実施形態では、I g G組成物は静脈内投与のために10%または約10%のI g Gである。別の実施形態では、I g G組成物は皮下または筋肉内投与のために20%または約20%である。

【0039】

別の態様では、本発明は、本明細書において提供される改良された製造方法論に従って調製されたI g G組成物の医薬組成物および製剤を提供する。ある実施形態では、これらの組成物および製剤は、現在市販されている他のI V I G組成物と比較して向上した特性を提供する。例えば、ある実施形態では、本明細書において提供される組成物および製剤は長期間安定である。

【0040】

さらに別の態様では、本発明は、本明細書において提供される改良された方法を用いて調製されたI g G組成物の投与を含む、免疫不全、炎症および自己免疫疾患、および急性感染症の治療方法を提供する。

【0041】

II. I V I G製造方法

一般に、任意の適切な出発原料、例えば、回収血漿または原料血漿から本発明による免疫グロブリン製剤を調製することができる。典型的な例では、健康な提供者から血液または血漿が採取される。通常、血液は、免疫グロブリン製剤が投与されるであろう対象と同じ動物種から採取される（典型的には"相同"免疫グロブリン類と称される）。免疫グロブリン類は、例えば、沈殿（アルコール分画法またはポリエチレングリコール分画法）、クロマトグラフィー法（イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、免疫アフィニティークロマトグラフィー等）、超遠心分離法および電気泳動調製法のような適切な方法によって血液から単離される（例えば、Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barund ern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967) ; 米国特許第5, 122, 373号および米国特許第5, 177, 194号を参照のこと ; これらの開示は、あらゆる目的のために、引用によりその全てがここに組み込まれる）。

【0042】

多くの場合では、当業者に周知のアルコール分画法および/またはイオン交換クロマト

10

20

30

40

50

グラフィー法およびアフィニティークロマトグラフィー法により作製された グロブリン含有産物から免疫グロブリン類が調製される。例えば、精製コーンフラクションⅡは免疫グロブリン類の単離の出発点として一般に用いられる。出発コーンフラクションⅡペーストは、典型的にはIgGの濃度が約95%であり、4つのIgGサブタイプからなる。異なるサブタイプは、それらが得られたプールされたヒト血漿中に見いだされるのとはほぼ同じ割合で、フラクションⅡ中に存在する。フラクションⅡは、投与可能な生成物への製剤の前にさらに精製される。例えば、フラクションⅡペーストを冷精製アルコール水性溶液に溶解し、沈殿および濾過によって不純物を除去することができる。最後の濾過に続いて、アルコールを除去するために免疫グロブリン懸濁液を（例えば、100,000ダルトン以下の公称分画分子量を有する限外濾過膜を用いて）透析または透析濾過することができる。所望のタンパク質濃度を得るために溶液を濃縮または希釈することができる。当業者に周知の技術により前記溶液をさらに精製することができる。

10

【0043】

さらに、免疫グロブリンの特定のアイソタイプまたはサブタイプを濃縮するために追加の調製工程を用いることができる。例えば、IgGまたは特定のIgGサブタイプの免疫グロブリン類の混合物を濃縮するためにプロテインA、プロテインGまたはプロテインHセファロースクロマトグラフィーを用いることができる。Harlow and Lane, Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)、Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)、および、米国特許第5,180,810号を全体として参照のこと。これらの開示は、あらゆる目的のために、引用によりその全てがここに組み込まれる。

20

【0044】

上記の方法と異なり、1つの態様では本発明は、脱クリオ出発原料を用いる濃縮IgG組成物の調製方法を提供する。一般に、本明細書において提供される方法は、現在市販されているIVI G製剤に見られる品質と少なくとも同じ品質を維持しつつ、優れたIgGの収率をもたらすために改変コーン・オンクレイ(Cohn-Oncley)アルコール分画工程とイオン交換クロマトグラフィーの両方を利用する。例えば、ある実施形態では、原料血漿出発物質に見られるIgG含有量の75%近くを含む最終バルクIgG組成物を産出する方法が提供される。これらの方法は、既存の最新式の精製方法よりも少なくとも10%~12%の増産を全IgG収量において意味する。例えば、GAMMAGARD(登録商標)LIQUIDの製造方法により、出発原料に見られるIgG含有量の約60%と65%の間の最終収量をもたらされると推定されている。したがって、本明細書において提供される方法により、既存のIgG精製技術に著しい改良がもたらされる。

30

【0045】

1つの実施形態では、本発明は、原料血漿出発物質に見られるIgG含有量の少なくとも70%を含む精製IgG組成物を提供する。別の実施形態では、原料血漿出発物質に見られるIgG含有量の少なくとも75%を含む精製IgG組成物を提供する。他の実施形態では、本明細書において提供される精製IgG組成物は、原料血漿出発物質に見られるIgG含有量の少なくとも約65%を含み、または、原料血漿出発物質に見られるIgG含有量の少なくとも66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%もしくはそれ以上を含むであろう。

40

【0046】

A. 改変アルコール沈殿/イオン交換クロマトグラフィー分画法

1つの態様では、本発明は、IVI G療法での使用に適切なIgG組成物の改良された製造方法を提供する。一般的に、これらの方法は、市販のIVI G製品の製造に用いられている現在の方法よりも高い収率を有し、そして、少なくともそれに比較し得る純度のIgG製剤を提供する。

【0047】

1つの特定の態様では、本発明は、血漿から濃縮されたIgG組成物、例えば、10%の濃度のIVI Gを調製する方法であって、少なくとも1つのアルコール沈殿工程および

50

少なくとも1つのイオン交換クロマトグラフィー工程の実施を含む方法を提供する。特に、改良された上流処理におけるいくつかの工程、例えば、低温での25%のエタノールの使用、スプレーによるエタノール添加、スプレーによるpH調整およびシリカ微粒子の使用は以前の処理と異なる。

【0048】

ある実施形態では、前記方法は、(a)第1沈殿工程において、約6.7と約7.3の間のpHで約6%と約10%の間の濃度のアルコールを用いて脱クリオ血漿画分を沈殿させてIgGが濃縮された上清を得る工程、(b)約6.7と約7.3の間のpHで約20%と約30%の間の濃度のアルコールを低温で用いて上清からIgGを沈殿させて第1の沈殿物を形成する工程、(c)工程(b)で形成された第1の沈殿物を再懸濁して懸濁液を形成する工程、(d)工程(c)で形成された懸濁液を界面活性剤で処理する工程、(e)約6.7と約7.3の間のpHで約20%と約30%の間の濃度のアルコールを用いて懸濁液からIgGを沈殿させて第2の沈殿物を形成する工程、(f)工程(e)で形成された第2の沈殿物を再懸濁して懸濁液を形成する工程、(g)工程(f)で形成された懸濁液を溶媒および/または界面活性剤で処理する工程、ならびに(h)少なくとも1回のイオン交換クロマトグラフィー分画を実行し、それによって濃縮されたIgGの組成物を調製する工程を含む。1つの実施形態では、前記方法は、工程(c)で形成された懸濁液を微粉化した二酸化ケイ素(SiO_2)で処理し、工程(d)の前に溶液を濾過することをさらに含む。

【0049】

1つの実施形態では、血漿から濃縮IgG組成物を調製するための方法であって、以下の工程を含む方法が提供される：(a)脱クリオ血漿画分のpHを約7.0に調整する工程、(b)約-5と約-9の間の温度で工程(a)の脱クリオ血漿画分のエタノール濃度を25%(体積/体積)または約25%(体積/体積)に調整し、それによって混合物を形成する工程であって、エタノール濃度をスプレーによって調整することができる工程、(c)工程(b)の混合物から液体と沈殿物を分離する工程、(d)1000Lの緩衝液あたり約400mLと約700mLの間の氷酢酸を用いてpHが調整されたリン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液で工程(c)の沈殿物を再懸濁し、それによって懸濁液を形成する工程、(e)細かく分割した(SiO_2)を工程(d)の懸濁液と少なくとも約30分間混合する工程、(f)加圧濾過機を用いて懸濁液を濾過し、それによって濾過液を形成する工程、(g)加圧濾過機のデッドボリュームの少なくとも3倍の、リン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液であって、1000Lの緩衝液あたり約150mLの氷酢酸を用いてpHが調整された緩衝液を用いて、加圧濾過機を洗浄し、それによって洗浄溶液を形成する工程、(h)工程(f)の濾過液を工程(g)の洗浄溶液と混合し、それによって溶液を形成し、そして、その溶液を界面活性剤で処理する工程、(i)工程(h)の溶液のpHを約7.0に調整し、そして、25%または約25%の終濃度にまでエタノールを添加し、それによって沈殿物を形成する工程であって、エタノール濃度および/またはpHはスプレーによって調整され得る工程、(j)工程(i)の混合物から液体と沈殿物を分離する工程、(k)溶媒または界面活性剤を含む水性溶液に沈殿物を溶解し、そして、その溶液を少なくとも60分間維持する工程、(l)工程(k)の後に溶液を陽イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、そして、カラムに吸着されたタンパク質を溶離液中に溶出する工程、(m)工程(l)からの溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに通して流出液(すなわち、通過画分)を精製する工程、(n)工程(m)からの流出液をナノフィルターに通してナノ濾過液を生成する工程、(o)工程(n)からのナノ濾過液を限外濾過膜に通して限外濾過液を生成する工程、ならびに(p)工程(o)からの限外濾過液を透析濾過緩衝液に対して透析濾過して約8%(重量/体積)と約22%(重量/体積)の間のタンパク質濃度を有する透析濾過液を生成し、それによって濃縮されたIgGの組成物を得る工程。1つの実施形態では、工程(b)の温度は-7または約-7である。1つの特定の実施形態では、工程(d)の懸濁緩衝液は約600mLの氷酢酸を用いて調整される。

【 0 0 5 0 】

ある実施形態では、透析濾過液は、約 8 % と約 1 2 % の間のタンパク質濃度、例えば、約 8 % または約 9 %、1 0 %、1 1 % または 1 2 % のタンパク質濃度を有するであろう。好ましい実施形態では、透析濾過液は 1 0 % または約 1 0 % のタンパク質濃度を有するであろう。別の好ましい実施形態では、透析濾過液は 1 1 % または約 1 1 % のタンパク質濃度を有するであろう。さらに別の好ましい実施形態では、透析濾過液は 1 2 % または約 1 2 % のタンパク質濃度を有するであろう。他の実施形態では、透析濾過液は約 1 3 % と約 1 7 % の間のタンパク質濃度、例えば、約 1 3 % または約 1 4 %、1 5 %、1 6 % または 1 7 % のタンパク質濃度を有するであろう。さらに他の実施形態では、透析濾過液は約 1 8 % と約 2 2 % の間のタンパク質濃度、例えば、約 1 8 % または約 1 9 %、2 0 %、2 1 % または 2 2 % のタンパク質濃度を有するであろう。好ましい実施形態では、透析濾過液は 2 0 % または約 2 0 % のタンパク質濃度を有するであろう。別の好ましい実施形態では、透析濾過液は 2 1 % または約 2 1 % のタンパク質濃度を有するであろう。さらに別の好ましい実施形態では、透析濾過液は 2 2 % または約 2 2 % のタンパク質濃度を有するであろう。

10

【 0 0 5 1 】

本発明のある実施形態では、本明細書において提供される方法は 2 つ以上の上記の分画処理工程に改良を含むことができる。例えば、実施形態は、第 1 沈殿工程、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程、改変フラクション I I + I I I 溶解工程および / または改変フラクション I I + I I I 懸濁液濾過工程に改良を含むことができる。

20

【 0 0 5 2 】

1 つの実施形態では、第 1 沈殿工程になされる改良はスプレーによるアルコール添加である。別の実施形態では、第 1 沈殿工程になされる改良はスプレーによる pH 調整剤の添加である。さらなる実施形態では、第 1 沈殿工程になされる改良はアルコール添加後の溶液の pH 調整である。関連する実施形態では、第 1 沈殿工程になされる改良はアルコール添加中の pH の維持である。別の関連する実施形態では、第 1 沈殿工程になされる改良は、溶液の連続的な pH 調整による沈殿インキュベーション時間中の pH の維持である。ある実施形態では、第 1 沈殿工程はこれらの改良のうちの 2 つ以上を実施することによって改良され得る。本工程で実現され得るさらなる改良は、第 1 沈殿工程 ~ 改変分画法 I について論じる下記の節から明らかとなるだろう。1 つ以上の上記の改良を実施することによって、第 1 沈殿工程の沈殿物画分で失われる I g G の量が減少し、および / または、沈殿工程中に不可逆的に変性する I g G の部分が減少する。

30

【 0 0 5 3 】

1 つの実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程になされる改良はスプレーによるアルコール添加である。別の実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程になされる改良はスプレーによる pH 調整剤の添加である。さらなる実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程になされる改良はアルコール添加後の溶液の pH 調整である。関連する実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程になされる改良はアルコール添加中の pH の維持である。別の関連する実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程になされる改良は溶液の連続的な pH 調整による沈殿インキュベーション時間中の pH の維持である。別の態様では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程は、2 5 % または約 2 5 % にアルコールの濃度を増加させることにより改良される。さらに別の実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程は、約 - 7 と - 9

40

の間にインキュベーション温度を下げることにより改良される。ある実施形態では、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程は、これらの改良の 2 つ以上を実施することによって改良され得る。本工程で実現され得るさらなる改良は、第 2 沈殿工程 ~ 改変分画法 I I + I I I について論じる下記の節から明らかとなるだろう。1 つ以上の上記の改良を実施することによって、改変フラクション I I + I I I 沈殿工程において失われる上清画分中の I g G の量がより少なくなり、および / または、沈殿工程中に不可逆的に変性する I g G の部分が減少する。

50

【 0 0 5 4 】

1つの実施形態では、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程になされる改良は、溶解緩衝液の氷酢酸含有量を約0.06%に増加することによって達成される。別の実施形態では、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程になされる改良は、溶液の連続的なpH調整により溶解インキュベーション中に溶液のpHを維持することによって達成される。別の実施形態では、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程になされる改良は、濾過の前に微粉化した二酸化ケイ素(SiO_2)をフラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液と混合することによって達成される。ある実施形態では、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程は、これらの改良の2つ以上を実施することによって改良され得る。本工程で実現され得るさらなる改良は、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程～改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿物の抽出について論じる下記の節から明らかとなるだろう。1つ以上の上記の改良を実施することによって、フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液中に回収されるIgGの量が増加し、および/または、フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液において不純物の量が減少する。

10

【 0 0 5 5 】

改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程になされる改良の例は、1000Lあたり150mLまたは約150mLの氷酢酸を含む、デッドボリュームの少なくとも約3.6倍の溶解緩衝液を用いてフィルターを後洗浄することにより実現される。本工程で実現され得るさらなる改良は、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程～改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液の前処理および濾過について論じる下記の節から明らかとなるだろう。1つ以上の上記の改良を実施することによって、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程中に失われるIgGの量が減少する。

20

【 0 0 5 6 】

1つの実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程と改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿工程に改良を含み得る。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程と改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程に改良を含み得る。

【 0 0 5 8 】

別の実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程と改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

30

【 0 0 5 9 】

別の実施形態では、前記方法は、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿工程と改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程に改良を含み得る。

【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、前記方法は、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿工程と改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、前記方法は、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程と改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

40

【 0 0 6 2 】

別の実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿工程および改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程に改良を含み得る。

【 0 0 6 3 】

別の実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿工程および改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

【 0 0 6 4 】

別の実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ溶解工程および改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

【 0 0 6 5 】

別の実施形態では、前記方法は、改変フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿工程、改変フラク

50

ションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ溶解工程および改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

【0066】

別の実施形態では、前記方法は、第1沈殿工程、改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿工程、改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ溶解工程および改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ懸濁液濾過工程に改良を含み得る。

【0067】

ある実施形態では、本明細書において提供されるⅠgG精製方法における一つの処理方法の改良は、他の方法であれば流動添加によって血漿画分に添加されるであろう1つ以上の溶液をスプレーで添加することを含む。例えば、ある実施形態では、処理方法の改良は、1つ以上のタンパク質種の沈殿を目的とする、血漿画分へのスプレーによるアルコール（例えば、エタノール）添加を含む。他の実施形態では、スプレーにより血漿画分に添加され得る溶液は、これらに限定されないが、pH調整溶液、溶媒溶液、界面活性剤溶液、希釈緩衝液、伝導度調整溶液などを含む。好ましい実施形態では、1つ以上のアルコール沈殿工程は血漿画分へのスプレーによるアルコール添加によって実行される。第2の好ましい実施形態では、1つ以上のpH調整工程は、血漿画分へのスプレーによるpH調整溶液の添加によって実行される。

10

【0068】

ある実施形態では、別の処理方法の改良はその他のどんな処理方法の改良とも組み合わせることができ、それは沈殿している血漿画分のpHを沈殿剤（例えば、アルコールまたはポリエチレングリコール）の添加の後に、および/または、添加と同時に調整することを含む。いくつかの実施形態では、沈殿インキュベーションまたは保持工程の全体を通じて、活発に沈殿している血漿画分のpHをpHの連続的なモニターと調整により維持する処理方法の改良が提供される。好ましい実施形態では、pHの調整はpH調整溶液のスプレー添加によって実行される。

20

【0069】

他の実施形態では、別の処理方法の改良はその他のどんな処理方法の改良とも組み合わせることができ、それは不純物を除去するための微粉化したシリカで処理する工程の使用を含む。

【0070】

30

1．脱クリオ血漿の調製

濃縮ⅠgG組成物の調製に用いられる出発原料は、一般的に、回収血漿（すなわち、体外で全血から分離された血漿）または原料血漿（すなわち、血漿交換法によって回収された血漿）のどちらかよりなる。典型的には、精製方法は、安全上および品質上の考慮すべき事項について既に評価されている前もって凍結されたプール血漿の解凍で始まる。典型的には、6℃以下の温度で解凍が実行される。低温での凍結血漿の解凍が完了した後、固形のクリオ沈殿物を液体の上清から分離するために、遠心分離が低温で（例えば、6℃）実行される。あるいは、分離工程は、遠心分離法よりはむしろ濾過によって実行することができる。その後、（新鮮な解凍血漿から遠心分離によって低温不溶性タンパク質が除去された後の「脱クリオ血漿」とも呼ばれる）液体の上清はその次の工程において処理される。この時点で、第ⅤⅠⅠⅠ因子インヒビターバイパス活性（FEIBA）、第ⅠⅩ因子複合体、第ⅤⅠⅠ因子濃縮物またはアンチトロンピンⅠⅠⅠ複合体の単離のために様々な追加の工程をとることができる。

40

【0071】

2．第1沈殿事象～改変分画法Ⅰ

この工程で、典型的には、脱クリオ血漿は約0±1℃に冷却され、そして、pHは約7.0と約7.5の間に調整され、好ましくは約7.1と約7.3の間に調整され、最も好ましくは約7.2に調整される。1つの実施形態では、脱クリオ血漿のpHは7.2または約7.2のpHに調整される。次に血漿を攪拌しつつ8%（体積/体積）または約8%（体積/体積）の目的のエタノール濃度まで前もって冷却されたエタノールを添加する。

50

同時に、温度を約 - 4 と約 0 の間の温度にまでさらに低下させる。好ましい実施形態では、 γ_2 - マクログロブリン、 γ_1A - および γ_1C - グロブリン、フィブリノーゲンおよび第 V I I I 因子などの夾雑物を沈殿させるために温度を - 2 または約 - 2 まで低下させる。典型的には、前記沈殿事象は、より短い、または、より長い保持時間を用いることもできるけれども、少なくとも約 1 時間の保持時間を含むであろう。その後、理想的には脱クリオ血漿に存在する I g G 含有量を完全に含む上清（上清 I）が遠心分離法、濾過法または他の適切な方法によってさらに収集される。

【 0 0 7 2 】

本発明は、いくつかの実施形態では、脱クリオ血漿のための第 1 の分画工程として用いられる従来の方法 (Cohn et al., 上記、Oncley et al., 上記) と比較して、上清 I 画分における I g G の収率を向上することになる方法を提供する。1 つの実施形態では、I g G の収率の向上はスプレーによるアルコール添加により達成される。別の実施形態では、I g G の収率の向上はスプレーによる pH 調整剤添加により達成される。さらに別の実施形態では、I g G の収率の向上はアルコール添加後に溶液の pH を調整することによって達成される。関連する実施形態では、I g G の収率の向上はアルコール添加中に溶液の pH を調整することによって達成される。

10

【 0 0 7 3 】

1 つの特定の態様では、前記改良は、第 1 沈殿工程の沈殿物画分において失われる I g G の量が減少する方法に関連する。例えば、ある実施形態では、コーン法 6 のプロトコルの第 1 沈殿工程で失われる I g G の量と比較して、前記の第 1 沈殿工程の沈殿物画分において失われる I g G の量が減少する。

20

【 0 0 7 4 】

ある実施形態では、処理方法の改良は、沈殿用アルコールの添加後に、約 7 . 0 と約 7 . 5 の間に溶液の pH を調整することによって実現される。他の実施形態では、沈殿用アルコールの添加後に、約 7 . 1 と約 7 . 3 の間に溶液の pH を調整する。さらに他の実施形態では、沈殿用アルコールの添加後に、約 7 . 0 または約 7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4 または 7 . 5 に溶液の pH を調整する。特定の実施形態では、沈殿用アルコールの添加後に、約 7 . 2 に溶液の pH を調整する。したがって、ある実施形態では、沈殿用アルコールの添加後ではなく添加前に溶液の pH を調整する類似の沈殿工程と比較して、第 1 沈殿工程の沈殿物画分において失われる I g G の量が減少する。1 つの実施形態では、沈殿保持またはインキュベーション時間の間に溶液の pH を連続的に調整することによって、所望の pH に pH が維持される。1 つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

30

【 0 0 7 5 】

他のある実施形態では、処理方法の改良は、流動添加よりはむしろスプレーによる沈殿用アルコールおよび / または pH 調整用溶液の添加によって実現される。したがって、ある実施形態では、アルコールおよび / または pH 調整用溶液が流動添加によって導入される類似の沈殿工程と比較して、第 1 沈殿工程の沈殿物画分において失われる I g G の量が減少する。1 つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

【 0 0 7 6 】

さらに他のある実施形態では、前記改良は、約 7 . 0 と約 7 . 5 の間に溶液の pH を調整することによって実現される。好ましい実施形態では、溶液の pH を約 7 . 1 および約 7 . 3 の間に調整する。他の実施形態では、沈殿用アルコールの添加の後に、流動添加よりはむしろスプレーによって沈殿用アルコールおよび / または pH 調整用溶液を添加することにより、溶液の pH を 7 . 0、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4 もしくは 7 . 5 または約 7 . 0、7 . 1、7 . 2、7 . 3、7 . 4 もしくは 7 . 5 に調整する。特定の実施形態では、沈殿用アルコール添加の後に、流動添加よりはむしろスプレーによって沈殿用アルコールおよび / または pH 調整用溶液を添加することにより、溶液の pH を 7 . 2 または約 7 . 2 に調整する。1 つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

40

【 0 0 7 7 】

50

3. 第2沈殿事象～改変分画法ⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ

さらに分画のⅠg G含量および純度を高めるために、改変コーン・オンクレイフラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ分画法である第2沈殿工程に上清Ⅰをかける。一般的に、溶液のpHを約6.6と約6.8の間のpHに調整する。好ましい実施形態では、溶液のpHを6.7または約6.7に調整する。次に、攪拌しながら約20%と約25%（体積/体積）の間の終濃度までアルコール、好ましくはエタノールを溶液に添加して画分中のⅠg Gを沈殿させる。好ましい実施形態では、25%（体積/体積）または約25%（体積/体積）の終濃度までアルコールを添加して画分中のⅠg Gを沈殿させる。一般的に、 γ -リボプロテイン、 γ -アンチトリプシン、Gc-グロブリン類、 α_1 -グリコプロテイン、ハプトグロブリン、セルロプラスミン、トランスフェリン、ヘモペキシン、クリスマス因子画分、チロキシン結合グロブリン、コリンエステラーゼ、ヒペルテンシノゲンおよびアルブミンなどの夾雑物はこれらの条件では沈殿しないであろう。

10

【0078】

アルコール添加の前に、または、アルコール添加と同時に、約-7と約-9の間の温度まで溶液をさらに冷却する。好ましい実施形態では、-7または約-7の温度まで溶液を冷却する。アルコール添加の完了の後に、溶液のpHを直ちに約6.8と約7.0の間に調整する。好ましい実施形態では、溶液のpHを6.9または約6.9に調整する。典型的には、前記沈殿事象は、より短い、または、より長い保持時間を用いることもできるけれども、少なくとも約10時間の保持時間を含むであろう。その後、理想的には脱クリオ血漿中に存在するⅠg G含有量の少なくとも約85%、好ましくは少なくとも約90%、さらに好ましくは少なくとも約95%を含有する沈殿物（改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ）を遠心分離法、濾過法または他の適切な方法によって上清から分離し、回収する。本発明は、いくつかの実施形態では、脱クリオ血漿のための第2の分画工程として用いられる従来の方法(Cohn et al., 上記; Oncley et al., 上記)と比較して、改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿物におけるⅠg Gの収率を向上することになる方法を提供する。関連する実施形態では、本発明は、改変ⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ上清におけるⅠg Gの損失を低減することになる方法を提供する。

20

【0079】

本発明は、いくつかの実施形態では、脱クリオ血漿のための第2の分画工程として使用される従来の方法(Cohn et al., 上記; Oncley et al., 上記)と比較して、改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿物におけるⅠg Gの収率を向上することになる方法を提供する。1つの実施形態では、前記改良はスプレーによるアルコール添加により実現される。別の実施形態では、前記改良はスプレーによるpH調整剤添加により実現される。別の実施形態では、前記改良はアルコール添加後に溶液のpHを調整することによって実現される。関連する実施形態では、前記改良はアルコール添加中に溶液のpHを調整することによって実現される。別の実施形態では、前記改良は約25%（体積/体積）までアルコール（例えば、エタノール）の濃度を増加することにより実現される。別の実施形態では、前記改良は沈殿工程の温度を約-7と-9の間の温度まで低下させることにより実現される。好ましい実施形態では、前記改良は約25%（体積/体積）までアルコール（例えば、エタノール）の濃度を増加し、そして、温度を約-7と-9の間の温度まで低下させることにより実現される。それに対し、沈殿物中の夾雑物のレベルを低減するために、コーンらとオンクレイらの両方が-5で沈殿を実行し、そして、オンクレイらは20%のアルコールを使用する。好都合なことに、本明細書において提供される方法は、最終産物中に高レベルの夾雑物が存在することなく最大のⅠg G収率を可能にする。

30

40

【0080】

沈殿用アルコールの添加の前に溶液のpHを約6.9のpHに調整するとき、部分的にはタンパク質の沈殿のために溶液のpHが6.9から約7.4と約7.7の間に変わることが明らかになっている（図8を参照のこと）。溶液のpHが6.9から離れるので、Ⅰg Gの沈殿はあまり順調でなくなり、ある夾雑物の沈殿がより順調になる。好都合なことに、発明者らは、沈殿用アルコールの添加の後に溶液のpHを調整することによってフラ

50

クションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿物中により高いパーセンテージのⅠgGが回収されることを発見している。

【0081】

したがって、1つの態様では、前記改良は改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿工程の上清中において失われるⅠgGの量が減少する方法に関連する。言い換えれば、フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿物中に出発ⅠgGのパーセンテージが増加して存在する。ある実施形態では、処理方法の改良は、沈殿用アルコールの添加直後に、または、添加中に約6.7と約7.1の間に溶液のpHを調整することによって実現される。別の実施形態では、処理方法の改良は、沈殿インキュベーション期間中、溶液のpHを約6.7と約7.1の間に絶えず維持することにより実現される。他の実施形態では、溶液のpHは、沈殿用アルコールの添加直後に、もしくは、添加中に約6.8と約7.0の間に調整される、または、沈殿用アルコールの添加直後に、もしくは、添加中に約6.7、6.8、6.9、7.0もしくは7.1のpHに調整される。特定の実施形態では、溶液のpHを、沈殿用アルコールの添加直後に、または、添加中に約6.9に調整する。ある実施形態では、溶液のpHは、沈殿インキュベーション期間中、約6.8から約7.0の間に絶えず維持される、または、沈殿インキュベーション期間中、約6.9のpHに絶えず維持される。したがって、ある実施形態では、沈殿用アルコールの添加の後ではなく前にpHが調整される類似の沈殿工程と比較して、または、溶液のpHが沈殿インキュベーション期間の全体にわたって維持されない類似の沈殿工程と比較して、第2沈殿工程における上清画分において失われるⅠgGの量が減少する。1つの実施形態では、溶液のpHを連続的に調整することにより沈殿保持またはインキュベーション時間の間に所望のpHにpHが維持される。1つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

【0082】

別の実施形態では、処理方法の改良は、流動添加よりはむしろスプレーによって沈殿用アルコールおよび/またはpH調整用溶液を添加することによって実現される。したがって、ある実施形態では、アルコールおよび/またはpH調整用溶液が流動添加によって導入される類似の沈殿工程と比較して、第2沈殿工程の上清画分において失われるⅠgGの量が減少する。1つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

【0083】

別の実施形態では、処理方法の改良は、約-7と約-9の間の温度で沈殿工程を実行することにより実現される。1つの実施形態では、前記沈殿工程は-7または約-7で実行される。別の実施形態では、前記沈殿工程は-8または約-8で実行される。別の実施形態では、前記沈殿工程は-9または約-9で実行される。ある実施形態では、前記沈殿工程のアルコール濃度は約23%と約27%の間である。好ましい実施形態では、前記アルコール濃度は約24%と約26%の間である。別の好ましい実施形態では、前記アルコール濃度は25%または約25%である。他の実施形態では、前記アルコール濃度は23%、24%、25%、26%もしくは27%、または、約23%、24%、25%、26%もしくは27%であり得る。特定の実施形態では、第2沈殿工程は25%または約25%のアルコール濃度を用いて-7または約-7の温度で実行される。1つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

【0084】

第2の沈殿のアルコール濃度を、オンクレイら、上記、で用いられる20%から25%まで増加して、そして、インキュベーション温度を、コーン-オンクレイ法において用いられる-5から-7または約-7まで低下させることの効果は、改変フラクションⅠⅠ＋ⅠⅠⅠ沈殿物のⅠgG含有量の5%~6%の増加である。

【0085】

別の実施形態では、処理方法の改良は、沈殿用アルコールの添加直後に、または、添加中に溶液のpHを約6.7と約7.1の間に、好ましくは6.9または約6.9に調整し、沈殿インキュベーション期間中、連続的にpHを調整することによって溶液のpHを約6.7と約7.1の間のpHに、好ましくは6.9または約6.9に維持し、ならびに、

流動添加よりはむしろスプレーによって沈殿用アルコールおよび／またはpH調整用溶液を添加することにより実現される。別の特定の実施形態では、処理方法の改良は、沈殿工程を約-7と約-9の間の温度で、好ましくは-7または約-7の温度で実行し、そして約23%と約27%の間のアルコール濃度、好ましくは25%または約25%のアルコール濃度を用いてI g Gを沈殿させることによって実現される。さらに別の特定の実施形態では、処理方法の改良は上記の改変フラクションII + III改良の全てを組み込むことにより実現される。好ましい実施形態では、処理方法の改良は-7または約-7の温度でスプレーにより添加された25%または約25%のエタノールを用いてI g Gを沈殿し、次に沈殿用アルコールの添加後に溶液のpHを6.9または約6.9に調整することにより実現される。さらに別の好ましい実施形態では、溶液のpHは、沈殿インキュベーションまたは保持時間の全体で6.9または約6.9に維持される。

10

【0086】

4. 改変フラクションII + III沈殿物の抽出

改変フラクションII + III沈殿物のI g G内容物を可溶化するために、冷抽出緩衝液を用いて分画法II + III沈殿物を1部の沈殿物対15部の抽出緩衝液という典型的な比率で再懸濁する。その他の適切な再懸濁比率、例えば、約1:8から約1:30までの、または、約1:10から約1:20までの、または、約1:12から約1:18までの、または、約1:13から約1:17までの、または約1:14から約1:16までの比率が用いられ得る。ある実施形態では、再懸濁比率は、約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またはそれ以上であり得る。

20

【0087】

改変II + III沈殿物の抽出に適切な溶液は、一般的に約4.0と約5.5の間のpHを有するであろう。ある実施形態では、前記溶液は約4.5と約5.0の間のpHを有し、他の実施形態では、前記抽出溶液は約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または5.5のpHを有するであろう。好ましい実施形態では、抽出緩衝液のpHは4.5または約4.5であろう。別の好ましい実施形態では、抽出緩衝液のpHは4.7または約4.7であろう。別の好ましい実施形態では、抽出緩衝液のpHは4.9または約4.9であろう。一般的に、例えば、酢酸塩、クエン酸塩、1塩基リン酸塩、2塩基リン酸塩、およびこれらの混合物等から選択される緩衝化剤を用いることでこれらのpHの必要性和合致することができる。適切な緩衝液の濃度は、典型的には、約5 mMから約100 mMまでの範囲にあり、または、約10 mMから約50 mMまでの範囲にあり、または、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100 mMの濃度の緩衝化剤である。

30

【0088】

抽出緩衝液は、好ましくは、約0.5 mS・cm⁻¹から約2.0 mS・cm⁻¹までの電気伝導度を有するであろう。例えば、ある実施形態では、抽出緩衝液の電気伝導度は約0.5 mS・cm⁻¹または約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または約2.0 mS・cm⁻¹であろう。当業者は、適切な電気伝導度を有する抽出緩衝液の作成法がわかるであろう。

40

【0089】

1つの特定の実施形態では、抽出緩衝液の例は、pH 4.5 ± 0.2または約4.5 ± 0.2および0.7 ~ 0.9 mS / cmまたは約0.7 ~ 0.9 mS / cmの電気伝導度で5 mMまたは約5 mMのリン酸1ナトリウムおよび5 mMまたは約5 mMの酢酸塩を含むことができる。

【0090】

一般的に、約0と約10の間、または、約2と約8の間の温度で抽出を実行す

50

る。ある実施形態では、約 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 で抽出を実行することができる。特定の実施形態では、約 2 と約 10 の間の温度で抽出を実行する。典型的には、懸濁液を絶えず攪拌しつつ、約 60 分と約 300 分の間または約 120 分と 240 分の間または約 150 分と 210 分の間の時間、抽出処理が進行するであろう。ある実施形態では、約 60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、または約 300 分の間、抽出処理が進行するであろう。好ましい実施形態では、少なくとも 160 分間、絶えず攪拌しつつ抽出処理が進行するであろう。

【0091】

5 mM リン酸 1 ナトリウム、5 mM 酢酸塩および 0.051% ~ 0.06% 氷酢酸（体積 / 体積）を含有する抽出緩衝液を使用すると、最終 IgG 組成物の収率が、最終産物の純度を危うくすることなく、かなり増加することができることが明らかになっている。図 9 に酢酸の量と抽出緩衝液の pH の相関関係が示されている。好ましい実施形態では、 4.5 ± 0.2 または約 4.5 ± 0.2 の pH で 1 : 15 または約 1 : 15 のペーストの緩衝液に対する比率を用いてフラクション II + III 沈殿物を抽出する。

【0092】

好都合なことに、5 mM リン酸 1 ナトリウム、5 mM 酢酸塩および 0.051% 氷酢酸（体積 / 体積）を含有する抽出緩衝液を用いる現在の GAMMAGARD（登録商標）LIQUID（Baxter Healthcare）の製造方法と比較して、0.06%（体積 / 体積）または約 0.06%（体積 / 体積）に氷酢酸の含有量を増やすことにより、最終 IgG 組成物の収率がかなり増加することができることが明らかになっている。本発明は、いくつかの実施形態では、第 2 沈殿工程で形成された沈殿物の抽出のために以前に採用された方法（GAMMAGARD（登録商標）LIQUID）と比較して、改変フラクション II + III 懸濁液における IgG 収率を向上することになる方法を提供する。

【0093】

1 つの態様では、前記改良は、改変フラクション II + III 沈殿物の非可溶化画分において失われる IgG の量が減少する方法に関連する。1 つの実施形態では、処理方法の改良は、5 mM リン酸 1 ナトリウム、5 mM 酢酸塩および 0.06% 氷酢酸（体積 / 体積）を含有する溶液を用いて 1 : 15（沈殿物対緩衝液）の比率で改変フラクション II + III 沈殿物を抽出することにより実現される。別の実施形態では、前記改良は、抽出処理の期間中、溶液の pH を維持することにより実現される。1 つの実施形態では、抽出処理の期間中、約 4.1 と約 4.9 間に溶液の pH を維持する。好ましい実施形態では、抽出処理の期間中、約 4.2 と約 4.8 の間に溶液の pH を維持する。より好ましい実施形態では、抽出処理の期間中、約 4.3 と約 4.7 の間に溶液の pH を維持する。別の好ましい実施形態では、抽出処理の期間中、約 4.4 と約 4.6 の間に溶液の pH を維持する。さらに別の好ましい実施形態では、抽出処理の期間中、4.5 または約 4.5 に溶液の pH を維持する。

【0094】

別の態様では、前記改良は、フラクション II + III 溶解工程においてフラクション II + III 沈殿物から可溶化する IgG の量が増加する方法に関連する。1 つの実施形態では、処理方法の改良は、1000 L あたり 600 mL の氷酢酸を含む溶解緩衝液中にフラクション II + III 沈殿物を可溶化することによって実現される。別の実施形態では、前記改良は、フラクション II + III 沈殿物中の IgG を可溶化した後に不純物を減少させる方法に関連する。1 つの実施形態では、処理方法の改良は、少なくとも約 30 分間、微粉化した二酸化ケイ素（ SiO_2 ）をフラクション II + III 懸濁液と混合することにより実現される。

【0095】

5. 改変フラクション II + III 懸濁液の前処理および濾過

改変フラクション II + III 沈殿物の非可溶化画分（すなわち、改変フラクション II

10

20

30

40

50

I + I I I フィルターケーキ)を除去するために、典型的には深層濾過を用いて懸濁液を濾過する。本明細書において提供される方法に用いることができる深層フィルターには、金属深層フィルター、ガラス深層フィルター、セラミック深層フィルター、(珪藻土などの)有機深層フィルターなどが含まれる。適切なフィルターの例には、C u n o 5 0 S A フィルター、C u n o 9 0 S A フィルターおよびC u n o V R 0 6 フィルター(C u n o)が含まれるがこれらに限定されない。あるいは、濾過よりはむしろ遠心分離によって分離工程を実行することができる。

【0096】

上記の製造方法の改良は精製方法の初期の工程におけるI g Gの損失を最小化するけれども、P K A 活性、アミド分解活性およびフィブリノーゲン内容物を含む重要な不純物は、例えば、I I + I I I ペーストがp H 4 . 5 または 4 . 6 で抽出されるとき、約 4 . 9 ~ 5 . 0 の p H で抽出が行われるときと比較してずっと多い(実施例 2 ~ 5 を参照のこと)。

10

【0097】

本明細書において提供される方法において抽出される不純物に対処するために、濾過/遠心分離の前に前処理工程を加えることによりI g G 組成物の純度が非常に高くなるのが今では明らかになっている。1つの実施形態では、この前処理工程には、微粉化した二酸化ケイ素粒子(例えば、ヒュームドシリカ、アエロジル(登録商標))の添加とその後の懸濁液が絶え間なく混合される40分~80分のインキュベーション期間が含まれる。ある実施形態では、インキュベーション期間は約50分と約70分の間、または、約30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80分またはそれ以上であろう。一般的に、約0 と約10 の間、または、約2 と約8 の間の温度で処理が行われるであろう。ある実施形態では、約0、1、2、3、4、5、6、7、8、9 または10 で処理を行うことができる。特定の実施形態では、約2 と約10 の間の温度で処理を行う。

20

【0098】

ヒュームドシリカでの処理の効果は実施例17に見られる結果によって例示される。この実施例では、フラクシオンI I + I I I 沈殿物を懸濁し、そして、2つの試料に分け、そのうちの1つを濾過の前に濾過助剤のみで清澄化し(図7A)、そして、そのうちの1つを濾過助剤の添加と濾過の前にヒュームドシリカで処理する(図7B)。クロマトグラフと定量化データに見ることができるよう、ヒュームドシリカで前処理された濾過液試料は濾過助剤で処理されただけの試料よりもずっと高いI g Gの純度を有した(68.8%対55.7%;それぞれ、表17と表18を比較のこと)。

30

【0099】

ある実施形態では、I I + I I I ペーストに対して約20 g / k g と約100 g / k g の間の濃度でヒュームドシリカを添加する(すなわち、1:15の比率で抽出される改変フラクシオンI I + I I I 沈殿物には、I I + I I I 懸濁液に対して約20 g / 16 k g から約100 g / 16 k g までの濃度で、または、約0.125%(重量/重量)~約0.625%(重量/重量)の終濃度でヒュームドシリカが加えられるであろう。)。ある実施形態では、I I + I I I ペーストに対して約20 g / k g の濃度で、または、約25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100 g / k g の濃度でヒュームドシリカを添加することができる。1つの特定の実施形態では、改変フラクシオンI I + I I I 懸濁液に対して約40 g / 16 k g I I + I I I の終濃度でヒュームドシリカ(例えば、アエロジル380またはその同等物)を添加する。約2 ~ 8 で少なくとも50~70分間混合を行う。

40

【0100】

ある実施形態では、深層濾過を促進するために二酸化ケイ素での処理の後に濾過助剤、例えば、C e l p u r e C 3 0 0 (C e l p u r e) またはH y f l o - S u p p e r - C e l (W o r l d M i n e r a l s) が加えられるであろう。I I + I I I ペーストに対して約0.1 k g / k g から約0.07 k g / k g までの終濃度で、または、約0

50

・ $2 \text{ kg} / \text{kg}$ から約 $0.06 \text{ kg} / \text{kg}$ までの終濃度で、または、約 $0.3 \text{ kg} / \text{kg}$ から約 $0.05 \text{ kg} / \text{kg}$ までの終濃度で濾過助剤を添加することができる。ある実施形態では、II + IIIペーストに対して約 $0.1 \text{ kg} / \text{kg}$ の終濃度で、または、約 0.2 、 0.3 、 0.4 、 0.5 、 0.6 、または $0.7 \text{ kg} / \text{kg}$ の終濃度で濾過助剤が添加されるであろう。

【0101】

GAMMAGARD（登録商標）LIQUIDの製造方法の濾過工程中にかなりの画分のIgGが失われているところであった。加圧濾過機の構成部とラインをパージするためにデッドボリュームの1.8倍の懸濁液緩衝液を用いる現在の濾過後洗浄方法は、この工程でIgGの回収率を最大にするには不十分であることが明らかになった。驚くことに、
10
改変フラクションII + III清澄化懸濁液中の全IgGを効率よく回収するためにデッドボリュームの少なくとも3.0倍、好ましくはデッドボリュームの3.6倍の懸濁液緩衝液が必要であることが明らかになった（実施例12および図1を参照のこと）。ある実施形態では、任意の適切な懸濁液緩衝液で加圧濾過機を洗浄することができる。特定の実施形態では、洗浄緩衝液は、例えば、5 mMリン酸1ナトリウム、5 mM酢酸塩および0.015%氷酢酸（体積/体積）を含むであろう。

【0102】

1つの態様では、前記改良は、フラクションII + III懸濁液濾過工程中に失われるIgGの量が減少する方法に関連する。1つの実施形態では、処理方法の改良は、デッド
20
ボリュームの少なくとも約3.6倍の、1000 Lあたり150 mLの氷酢酸を含む溶解緩衝液を用いてフィルターを後洗浄することによって実現される。図10に氷酢酸の量と後洗浄緩衝液中のpHとの間の関係が示される。1つの実施形態では、後洗浄抽出緩衝液のpHは約4.6と約5.3の間である。好ましい実施形態では、後洗浄緩衝液のpHは約4.7と約5.2の間である。別の好ましい実施形態では、後洗浄緩衝液のpHは約4.8と約5.1の間である。さらに別の好ましい実施形態では、後洗浄緩衝液のpHは約4.9と約5.0の間である。

【0103】

本発明は、いくつかの実施形態では、第2沈殿工程から形成された懸濁液の清澄化のために以前に採用された方法と比較して（GAMMAGARD（登録商標）LIQUID）、清澄化されたフラクションII + III懸濁液におけるIgGの収率と純度を向上する
30
ことになる方法を提供する。1つの態様では、前記改良は、改変フラクションII + IIIフィルターケーキにおいて失われるIgGの量が減少する方法に関連する。他の態様では、前記改良は、清澄化されたフラクションII + III懸濁液において見られる不純物の量が減少する方法に関連する。

【0104】

1つの実施形態では、処理方法の改良は、改変フラクションII + III懸濁液の濾過または遠心清澄化の前にヒュームドシリカ処理を挿入することにより実現される。ある実施形態では、ヒュームドシリカ処理は、II + IIIペーストに対して約 $0.01 \text{ kg} / \text{kg}$ から約 $0.07 \text{ kg} / \text{kg}$ まで、または、約 $0.02 \text{ kg} / \text{kg}$ から約 $0.06 \text{ kg} / \text{kg}$ まで、または、約 $0.03 \text{ kg} / \text{kg}$ から約 $0.05 \text{ kg} / \text{kg}$ までの添加、また
40
は、約 0.02 、 0.03 、 0.04 、 0.05 、 0.06 または $0.07 \text{ kg} / \text{kg}$ の添加を含むであろう。そして、その混合物は、約2と約8の間の温度で約50分と約70分の間の時間、または、約30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80分またはそれ以上の間保温されるであろう。別の実施形態では、処理方法の改良は、残存するフィブリノーゲン、アミド分解活性および/またはプレカリクレインアクチベーター活性のレベルを低減したフュームドシリカ処理の挿入によって実現される。

【0105】

別の実施形態では、処理方法の改良は、改変フラクションII + III懸濁液濾過工程の完了の後に深層フィルターのデッドボリュームの約3倍と約5倍の間の体積でそのフィルターを洗浄することによって実現される。ある実施形態では、フィルターのデッドボリ
50

ュームの約 3.5 倍と約 4.5 倍の間の体積、または、少なくとも約 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 倍の体積でフィルターが洗浄されるであろう。特定の実施形態では、デッドボリュームの少なくとも約 3.6 倍の懸濁液緩衝液を用いて加圧濾過機が洗浄されるであろう。

【0106】

6. 界面活性剤処理

改変フラクション II + III 濾過液からその他の夾雑物を除去するために、試料を次に界面活性剤処理にかける。血漿由来画分の界面活性剤処理の方法は当技術分野において周知である。一般的に、本明細書において提供される方法と同時に任意の標準的な非イオン性界面活性剤処理を用いることができる。例えば、界面活性剤処理のプロトコルの例が以下に提供される。

【0107】

簡単に述べると、改変フラクション II + III 濾過液に攪拌しながらポリソルベート - 80 を約 0.2 % (重量 / 体積) の終濃度で添加し、試料を約 2 ~ 8 の間の温度で少なくとも 30 分間保温する。次にクエン酸ナトリウム無水物を約 8 g / L の終濃度で溶液に混合し、そして、約 2 ~ 8 の間の温度で絶えず攪拌しながら、試料をさらに 30 分間保温する。

【0108】

ある実施形態では、任意の適切な非イオン性界面活性剤を用いることができる。適切な非イオン性界面活性剤の例には、オクチルグルコシド、ジギトニン、C12E8、ルプロール、トリトン X - 100、ノニデット P - 40、ツイーン - 20 (すなわち、ポリソルベート - 20)、ツイーン - 80 (すなわち、ポリソルベート - 80)、アルキルポリ (エチレンオキシド)、ブリジ界面活性剤、アルキルフェノールポリ (エチレンオキシド)、ポロキサマー、オクチルグルコシド、デシルマルトシドなどが含まれるがこれらに限定されない。

【0109】

1 つの実施形態では、処理方法の改良は、流動添加よりはむしろスプレーによって洗浄性試薬 (例えば、ポリソルベート - 80 およびクエン酸ナトリウム無水物) を添加することにより実現される。他の実施形態では、添加物が急速に分布することを確実にするために試料を混合している間に改変フラクション II + III 濾過液に固形の洗浄性試薬を添加することができる。ある実施形態では、流動添加のように局所的な過度の集中が起こらないように、濾過液の非局在化された表面領域に固形試薬を散布することによって添加することが好ましい。

【0110】

7. 第 3 沈殿事象 ~ 沈殿 G

アルブミンおよびトランスフェリンなどの少量の残留部分を除去するために、25 % のアルコール濃度で第 3 の沈殿を実行する。簡単に述べると、適切な pH 調整溶液 (例えば、1 M 水酸化ナトリウムまたは 1 M 酢酸) を用いて界面活性剤で処理された II + III 濾過液の pH を約 6.8 と 7.2 の間、好ましくは約 6.9 と約 7.1 の間、最も好ましくは約 7.0 に調整する。次に、溶液に冷アルコールを約 25 % (体積 / 体積) の終濃度まで添加し、そして、攪拌しつつ混合物を約 -6 ~ -10 の間の温度で少なくとも 1 時間保温して第 3 の沈殿物 (すなわち、沈殿物 G) を形成する。1 つの実施形態では、混合物を少なくとも 2 時間、または、少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 時間またはそれ以上の時間保温する。好ましい実施形態では、混合物を少なくとも 2 時間保温する。より好ましい実施形態では、混合物を少なくとも 4 時間保温する。さらにより好ましい実施形態では、混合物を少なくとも 8 時間保温する。

【0111】

1つの態様では、処理方法の改良は、第3沈殿工程の上清画分において失われるIgGの量が減少する方法に関連する。ある実施形態では、処理方法の改良は、沈殿用アルコールの添加直後に、または、添加中に約6.8と約7.2の間に溶液のpHを調整することによって実現される。別の実施形態では、処理方法の改良は、沈殿インキュベーション期間中、溶液のpHを約6.8と約7.2の間に絶えず維持することによって実現される。他の実施形態では、沈殿用アルコールの添加直後に、もしくは、添加中に約6.9と約7.1の間に溶液のpHを調整する、または、沈殿用アルコールの添加直後に、もしくは、添加中に約6.8、6.9、7.0、7.1もしくは7.2のpHに溶液のpHを調整する。特定の実施形態では、沈殿用アルコールの添加直後に、もしくは、添加中に約7.0に溶液のpHを調整する。ある実施形態では、沈殿インキュベーション期間中、約6.9~約7.1の間に溶液のpHを絶えず維持する、または、沈殿インキュベーション期間中、約7.0のpHに溶液のpHを絶えず維持する。したがって、ある実施形態では、沈殿用アルコールの添加の後ではなく前にpHが調整される類似の沈殿工程、または、溶液のpHが沈殿インキュベーション工程の全体にわたって維持されない類似の沈殿工程と比較して、第3沈殿工程の上清画分において失われるIgGの量が減少する。1つの実施形態では、沈殿保持またはインキュベーション時間の間に溶液のpHを連続的に調整することにより所望のpHにpHを維持する。1つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

10

【0112】

別の実施形態では、処理方法の改良は、流動添加よりはむしろスプレーによって沈殿用アルコールおよび/またはpH調整用溶液を添加することにより実現される。したがって、ある実施形態では、流動添加によってアルコールおよび/またはpH調整用溶液が導入される類似の沈殿工程と比較して、第3沈殿工程の上清画分中において失われるIgGの量が減少する。1つの実施形態では、アルコールはエタノールである。

20

【0113】

8. 沈殿物G (PptG) の懸濁および濾過

沈殿物GのIgG内容物を可溶化するために、冷抽出緩衝液を用いてPptGを再懸濁する。簡単に述べると、AU₂₈₀₋₃₂₀値が約40~95に達するように約0と約8の間の温度で沈殿物Gを1~3.5の注射用水(WFI)に溶解する。次に、少なくとも2時間攪拌される溶液の最終pHを5.2±0.2または約5.2±0.2に調整する。1つの実施形態では、1M酢酸を用いてこのpH調整を実行する。IgGの溶解度を上昇させるために、懸濁液の電気伝導度を約2.5mS/cmと約6.0mS/cmの間の伝導度に上昇させる。1つの実施形態では、塩化ナトリウムを添加して電気伝導度を上昇させる。次に、溶解しなかったどんな粒子をも除去するために、約0.1μmと約0.4μmの間の公称ポアサイズを有する適切な深層フィルターを用いて懸濁PptG溶液を濾過する。1つの実施形態では、深層フィルターの公称ポアサイズは、清澄化濾過液を得るために、約0.2μmである(例えば、CunoVR06フィルターまたは同等物)。別の実施形態では、懸濁PptG溶液を遠心分離して清澄化上清を回収する。約2.5mS/cmと約6.0mS/cmの間の電気伝導度を有する塩化ナトリウム溶液を用いてフィルターの後洗浄を実行する。典型的には、沈殿物Gの抽出に適切な溶液はWFIおよび低電気泳動度緩衝液を含む。1つの実施形態では、低電気泳動度緩衝液は約10mS/cm未満の電気伝導度を有する。好ましい実施形態では、低電気泳動度緩衝液は約9、8、7、6、5、4、3、2、または1mS/cm未満の電気伝導度を有する。好ましい実施形態では、低電気泳動度緩衝液は約6mS/cm未満の電気伝導度を有する。別の好ましい実施形態では、低電気泳動度緩衝液は約4mS/cm未満の電気伝導度を有する。別の好ましい実施形態では、低電気泳動度緩衝液は約2mS/cm未満の電気伝導度を有する。

30

40

【0114】

9. 溶媒界面活性剤処理

血漿由来産物中に存在し得る、様々なウイルス性夾雑物を不活化するために、次に清澄

50

化 P p t G 濾過液を溶媒界面活性剤 (S / D) 処理にかける。血漿由来画分の界面活性剤処理の方法は、当技術分野において周知である (検討用に、Pelletier JP et al., Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42を参照のこと)。一般的に、本明細書において提供される方法と同時に任意の標準的な S / D 処理を用いることができる。例えば、S / D 処理のプロトコルの例が以下に提供される。

【 0 1 1 5 】

簡単に述べると、トリトン X - 1 0 0 , ツイーン - 2 0 およびリン酸トリ (n - ブチル) (T N B P) を清澄化 P p t G 濾過液に、それぞれ、約 1 . 0 %、0 . 3 % および 0 . 3 % の終濃度で添加する。次に、混合物を約 1 8 と約 2 5 の間の温度で少なくとも約 1 時間攪拌する。

10

【 0 1 1 6 】

1 つの実施形態では、処理方法の改良は、流動添加よりはむしろスプレーによって S / D 試薬 (例えば、トリトン X - 1 0 0、ツイーン - 2 0 および T N B P) を添加することにより実現される。他の実施形態では、S / D 成分の急速な分布を確実にするために混合されている清澄化 P p t G 濾過液に固形の界面活性剤試薬を添加することができる。ある実施形態では、流動添加のように局所的な過度の集中が起こらないように、濾過液の非局在化された表面領域に固形試薬を散布することによって添加することが好ましい。

【 0 1 1 7 】

1 0 . イオン交換クロマトグラフィー

I g G を S / D 処理した P p t G 濾過液からさらに精製し、そして、濃縮するために、陽イオン交換および/または陰イオン交換クロマトグラフィーを用いることができる。イオン交換クロマトグラフィーを用いる I g G の精製方法および濃縮方法は当技術分野において周知である。例えば、米国特許第 5 , 8 8 6 , 1 5 4 号は、(約 3 . 8 と 4 . 5 の間の) 低 pH でフラクション I I + I I I 沈殿物を抽出し、次にカプリル酸を用いて I g G を沈殿し、そして最後に 2 回の陰イオン交換クロマトグラフィー工程を実施する方法について記載している。米国特許第 W O 6 , 0 6 9 , 2 3 6 号は、アルコール沈殿に全く依らないクロマトグラフィーによる I g G 精製スキームについて記載している。国際公開第 W O 2 0 0 5 / 0 7 3 2 5 2 号は、フラクション I I + I I I 沈殿物の抽出、カプリル酸処理、P E G 処理および 1 回の陰イオン交換クロマトグラフィー工程を含む I g G 精製方法について記載している。米国特許第 7 , 1 8 6 , 4 1 0 号は、フラクション I + I I + I I I 沈殿物またはフラクション I I 沈殿物のどちらかの抽出とそれに続くアルカリ性の pH で実行される 1 回の陰イオン交換工程を含む I g G 精製方法について記載している。米国特許第 7 , 5 5 3 , 9 3 8 号は、フラクション I + I I + I I I 沈殿物またはフラクション I I + I I I 沈殿物のどちらかの抽出、カプリル酸処理および 1 回か 2 回のどちらかの陰イオン交換クロマトグラフィー工程を含む方法について記載している。米国特許第 6 , 0 9 3 , 3 2 4 号は、約 6 . 0 と約 6 . 6 の間の pH で操作されるマクロポラス陰イオン交換樹脂の使用を含む精製方法について記載している。米国特許第 6 , 8 3 5 , 3 7 9 号は、アルコール分画なしで陽イオン交換クロマトグラフィーに依る精製方法について記載している。上記の出版物の開示をこれにより、全ての目的のためにその全体を参照して組み込む。

20

30

40

【 0 1 1 8 】

本発明の方法の 1 つの実施形態では、S / D 処理した P p t G 濾過液を陽イオン交換クロマトグラフィーと陰イオン交換クロマトグラフィーの両方にかけることができる。例えば、1 つの実施形態では、S / D 処理した P p t G 濾過液を、溶液中の I g G を結合する陽イオン交換カラムに通す。次に、吸着された I g G から S / D 試薬を洗い流すことができ、その後約 8 . 0 と 9 . 0 の間の pH を有する高 pH 溶出緩衝液を用いてカラムから I g G が溶出される。この方法で、調製物から S / D 試薬を除去するために、I g G 含有溶液を濃縮するために、または、両方のために陽イオン交換クロマトグラフィー工程を用いることができる。ある実施形態では、pH 溶出緩衝液は、約 8 . 2 と約 8 . 8 の間の pH、または、約 8 . 4 と約 8 . 6 の間の pH、または、約 8 . 0、8 . 1、8 . 2、8 .

50

3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9または9.0のpHを有することができる。好ましい実施形態では、溶出緩衝液のpHは約8.5±0.1である。

【0119】

ある実施形態では、陽イオン交換カラムからの溶離液をより低いpH、例えば、約5.5と約6.5の間のpHに調整し、そして、溶液の電気伝導度が減少するように適切な緩衝液で希釈することができる。ある実施形態では、陽イオン交換溶離液のpHを約5.7と約6.3の間のpHまたは約5.9と約6.1間のpHまたは約5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4または6.5のpHに調整することができる。好ましい実施形態では、溶離液のpHを約6.0±0.1のpHに調整する。次に、調製物中に見られるいくつかの夾雑物を結合する陰イオン交換カラムに溶離液を負荷する。カラムへの負荷と洗浄の間にIgG画分を含むカラムの通過画分を回収する。ある実施形態では、本発明のイオン交換クロマトグラフィー工程をカラムモード、バッチモードまたはその2つの組合せで実行することができる。

10

【0120】

ある実施形態では、処理方法の改良は、流動添加よりはむしろスプレーによってpH調整用溶液を添加することにより実現される。

【0121】

11. ナノ濾過および限外/透析濾過

本明細書において提供されるIgG組成物のウイルス負荷をさらに低減させるために、適切なナノ濾過装置を用いて陰イオン交換カラム溶出液をナノ濾過することができる。ある実施形態では、ナノ濾過装置は約15nmと約200nmの間の平均ポアサイズを有するであろう。この使用法に適切なナノフィルターの例には、DVD、DV50、DV20（ポール）、Viresolve NFP、Viresolve NFR（ミリポア）、プラノバ15N、20N、35Nおよび75N（プラノバ）が含まれるがこれらに限定されない。特定の実施形態では、ナノフィルターは、約15nmと約72nmの間、または、約19nmと約35nmの間、または、約15nm、19nm、35nmまたは72nmの平均ポアサイズを有することができる。好ましい実施形態では、ナノフィルターは、アサヒプラノバ35Nフィルターまたはその同等物のように約35nmの平均ポアサイズを有するであろう。

20

【0122】

所望により、ナノ濾過液をさらに濃縮するために限外濾過/透析濾過を実行することができる。1つの実施形態では、特別に計画された後洗浄と共にオープンチャンネル膜を使用し、そして、製造プロセスの終わり近くでの製剤化によって、収率と保存安定性に影響することなく、結果生じるIgG組成物のタンパク質濃度が最新式のIVI（例えば、GAMMAGARD（登録商標）LIQUID）と比較して約2倍（200mg/mL）になる。市販の限外濾過膜の大半では、大幅なタンパク質の損失なくIgGの濃度を200mg/mLにすることはできない。これらの膜は早期に閉塞されるであろう。したがって、十分な後洗浄は達成するのが困難である。したがって、オープンチャンネル膜構造を用いなければならない。オープンチャンネル膜でも、タンパク質を著しく損失することなく（2%未満の損失）要求される濃度を得るためには特別に計画された後洗浄方法を用いなければならない。さらにずっと驚くべきことは、200mg/mLもの高いタンパク質濃度が低pH保存工程のウイルス不活化能力に影響を与えない事実である。

30

40

【0123】

ナノ濾過の次に、濾過液は限外濾過/透析濾過によってさらに濃縮され得る。1つの実施形態では、限外濾過によってナノ濾過液を約2%と約10%（重量/体積）の間のタンパク質濃度まで濃縮することができる。ある実施形態では、オープンチャンネルスクリーンを含むカセット中で限外濾過を実行し、そして、限外濾過膜は、約100kDa未満または約90、80、70、60、50、40、30kDa未満またはそれ以下の公称分子量（NMWCO）を有する。好ましい実施形態では、限外濾過膜は50kDa以下のNMWCOを有する。

50

【 0 1 2 4 】

限外濾過工程が完了したら、静脈内または筋肉内投与に適切な溶液に対する透析濾過によって濃縮物をさらに濃縮することができる。ある実施形態では、透析濾過溶液は安定化剤および/または緩衝化剤を含むことができる。好ましい実施形態では、安定化剤および緩衝化剤は適切な濃度のグリシン、例えば、約 0.20 M と約 0.30 M の間の、または、約 0.22 M と約 0.28 M の間の、または、約 0.24 M と約 0.26 mM の間の、または約 2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9 または 3.0 の濃度のグリシンである。好ましい実施形態では、透析濾過緩衝液は 0.25 M または約 0.25 M の濃度のグリシンを含む。

【 0 1 2 5 】

典型的には、最小交換体積は元の濃縮物の体積の少なくとも約 3 倍、または、元の濃縮物の体積の少なくとも約 4、5、6、7、8、9 倍またはそれ以上である。約 5 % と約 25 % (重量 / 体積) の間の、または、約 6 % と約 18 % (重量 / 体積) の間の、または、約 7 % と約 16 % (重量 / 体積) の間の、または、約 8 % と約 14 % (重量 / 体積) の間の、または、約 9 % と約 12 % の間の最終タンパク質濃度に、または、約 5 % または 6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 %、20 %、21 %、22 %、23 %、24 %、25 % またはそれ以上の終濃度に I g G 溶液を濃縮することができる。1 つの実施形態では、後洗浄画分を濃縮溶液に加えることなく少なくとも約 23 % の最終タンパク質濃度が達成される。別の実施形態では、後洗浄画分を濃縮溶液に加えることなく少なくとも約 24 % の最終タンパク質濃度が達成される。後洗浄画分を濃縮溶液に加えることなく少なくとも約 25 % の最終タンパク質濃度が達成される。典型的には、濃縮処理の終わりに溶液の pH は約 4.6 ~ 5.1 の間であらう。

【 0 1 2 6 】

例示的な実施形態では、限外濾過の前に I g G 組成物の pH は約 4.5 に調整される。限外濾過によって 5 ± 2 % (重量 / 体積) のタンパク質濃度に溶液を濃縮する。限外濾過膜は 50,000 ダルトン以下の公称分画分子量 (NMWC0) を有する (ミリポアペリコンポリエーテルスルホン膜)。濃縮物を 10 倍の体積の pH 4.5 \pm 0.2 の 0.25 M グリシン溶液に対して透析濾過する。限外濾過 ~ 透析濾過の操作を通して、約 2 ~ 約 8 の間の温度に溶液を維持する。透析濾過の後に、少なくとも 11 % (重量 / 体積) のタンパク質濃度に溶液が濃縮される。

【 0 1 2 7 】

12. 製剤化

透析濾過工程が完了したら、透析濾過緩衝液を用いて溶液のタンパク質濃度を約 5 % と約 20 % (重量 / 体積) の間、または、約 6 % と約 18 % (重量 / 体積) の間、または、約 7 % と約 16 % (重量 / 体積) の間、または、約 8 % と約 14 % (重量 / 体積) の間、または、約 9 % と約 12 % の間の終濃度に、または、約 5 % または 6 %、7 %、8 %、9 %、10 %、11 %、12 %、13 %、14 %、15 %、16 %、17 %、18 %、19 % または 20 % の終濃度に調整する。好ましい実施形態では、溶液の最終タンパク質濃度は約 9 % と約 11 % の間、より好ましくは約 10 % である。

【 0 1 2 8 】

約 0.22 μ m 以下の、例えば、約 0.2 μ m の絶対ポアサイズを有する膜フィルターに通して濾過することによって、製剤化されたバルク溶液をさらに無菌化する。次に、試験のために試料をとっておきつつ、適切な密封用の最終容器に溶液を無菌的に分配する。

【 0 1 2 9 】

1 つの実施形態では、透析濾過緩衝液を用いて I g G 組成物を約 10.2 \pm 0.2 % (重量 / 体積) の濃度にさらに調整する。必要に応じて、pH を約 4.4 ~ 約 4.9 に調整する。最後に、溶液を濾過滅菌し、そして、30 または約 30 で 3 週間保温する。

【 0 1 3 0 】

13. アルコール添加

好都合なことに、血漿から I g G を分画するために、流動添加よりはむしろスプレーによるアルコールの添加が I g G 収量の損失の減少をもたらすことが明らかになっている。理論に縛られるものではないが、血漿画分への流動添加中に、流体の進入位置でのアルコールの一時的で局所的な過度の集中が、上清中に I g G が残っているであろう工程の間での I g G のタンパク質変性および不可逆的な損失および / または沈殿に至る可能性がある。さらに、少なくとも 100 L のプールされた血漿の分画を含む工業スケールの精製のように、大容量のアルコールが添加される必要があるとき、これらの効果は増幅される可能性がある。

【 0 1 3 1 】

スプレーによるアルコール添加の効果は、流動添加 (1 および 2) またはスプレー添加 (3 および 4) のどちらかにより 8 % エタノールを導入して脱クリオ血漿試料を沈殿する実施例 14 で例示される。表 14 に見ることができるように、スプレーによって試料にエタノールを添加すると脱クリオ血漿中に存在する 100 % 近くの I g G が上清中に回収され、一方、流動添加によりアルコールを添加すると 4 ~ 5 % の I g G が失われる。これにより、この工程だけで約 0 . 20 g / L と 0 . 25 g / L の間の I g G 喪失という結果になる。2007 年の製造レベルで言えば、これは約 530 万グラム (5 , 300 キログラム) の I g G の損失ということを意味する。現在の I V I G 市場価格を前提とすると、グラムあたり \$ 50 と \$ 100 の間の範囲であるが、この工程での 4 ~ 5 % の損失は年に 5 億ドルまでの世界的な経済的損失を意味する。

【 0 1 3 2 】

したがって、本明細書において提供される方法の 1 つの態様では、アルコールのスプレー添加によって 1 つ以上の沈殿工程を実行する。ある実施形態では、いかなる加圧装置、例えば、スプレーヘッドまたはノズルを有し、そして手動でまたは自動で操作されて液体から微細な霧を発生させる容器 (例えば、スプレーボトル) でも使用することによってスプレー添加を実行することができる。ある実施形態では、系内で液体の急速かつ均等な分配を確実にするために、系を連続的に攪拌するかまたは混合しながら、スプレー添加を実行する。

【 0 1 3 3 】

14 . pH の調整

血漿画分のタンパク質沈殿特性は、血漿タンパク質が沈殿させられている溶液の pH に大きく依存する。この事実は、それぞれ 1946 年および 1949 年にコーン法とオンクレイ法が導入されて以来、血漿タンパク質を分画する科学者に利用されてきた。伝統的には、目的の構成成分の最高の回収率を促進するために、アルコール添加の前に血漿画分の pH が調整される。好都合なことに、アルコール添加直後またはアルコール添加と同時に溶液の pH を調整することによって、より確定的なかつ再現性のある沈殿がもたらされることが今では明らかになっている。血漿画分へのエタノール添加が、一般には溶液の pH を上昇させることによって、溶液の pH に変動をもたらすことが明らかになった。したがって、アルコール添加後ではなく添加前に血漿画分の pH を所定の pH に調整することによって、最適ではない pH で沈殿反応が起こるのである。

【 0 1 3 4 】

同様に、血漿画分からのタンパク質の沈殿は、静電的環境をもたらし、そしてそれによって溶液の pH を変化させるであろう。したがって、沈殿事象を進めさせておくと、目的のタンパク質種の最大の回収率を可能にする所定の pH 値から溶液の pH が離れ始めるであろう。タンパク質の大きな分画が沈殿されつつある沈殿事象、高アルコール含量が用いられる沈殿事象、および、長いインキュベーション期間を必要とする沈殿事象にこれは特に当てはまる。

【 0 1 3 5 】

血漿画分の pH 調整の効果は、実施例 16 に見られる結果によって例示される。この実施例では、アルコールのスプレー添加の後に上清 I 画分の 2 つの試料から I g G を沈殿した。両方の試料の pH は、アルコール添加の前に 6 . 7 に調整され、アルコール添加の後

であるが10時間の沈殿インキュベーション工程の前に6.9に再調整された。第1の試料(基準試料)では10時間のインキュベーション中にpHを調整しないが、一方、試料2(連続調整試料)では10時間の沈殿インキュベーション中にpH6.9にpHを絶えず調整した。表16に見ることができるよう、試料から改変フラクションII+III沈殿物を除去した後に、第1の上清は1Lの血漿あたり0.2gのIgGを含み、一方、沈殿インキュベーション中にpHが一定に保持された第2試料は1Lの血漿あたり0.13gだけのIgGを含んだ。第2試料での1Lの血漿あたり0.07gのIgGという減少した損失は、2007年の製造レベルで言えば、約190万グラム(1,900キログラム)のIgGの損失を意味する。現在のIVI G市場価格を前提とすると、グラムあたり\$50と\$100の間の範囲であるが、この工程での1.5%の損失は年に2億ドルまでの世界的な経済的損失を意味する。

10

【0136】

したがって、本明細書において提供される方法の1つの態様では、アルコール添加の直後に血漿画分のpHを調整する。関連する実施形態では、アルコール添加の前後、または、アルコール添加中および添加後、または、アルコール添加前、添加中および添加後にpHを調整することができる。関連する実施形態では、1つ以上のアルコール沈殿事象またはインキュベーションの間に溶液のpHを連続的に調整する。ある実施形態では、系内のpH調整剤の急速かつ均等な分配を確実にするために系を連続的に攪拌するかまたは混合しながら溶液のpHを連続的に調整する、または、維持する。

20

【0137】

流動アルコール添加の場合と同様に、大容量のpH調整剤の流動添加が一時的で局所的なpHの変化を引き起こす可能性があり、望まないタンパク質変性または沈殿という結果になることが今では明らかになっている。したがって、本明細書において提供される方法の1つの実施形態では、1つ以上の血漿分画工程にスプレー添加によってpH調整剤を導入することができる。本明細書において提供される方法の別の実施形態では、血漿画分または沈殿工程のpHはpH調整剤のスプレー添加によって調整されることができる。ある実施形態では、いかなる加圧装置、例えば、スプレーヘッドまたはノズルを有し、そして手動でまたは自動で操作されて液体から微細な霧を発生させる容器(例えば、スプレーボトル)をも使用することによってスプレー添加を実行することができる。ある実施形態では、系内で液体の急速かつ均等な分配を確実にするために系を連続的に攪拌するかまたは混合しながらスプレー添加を実行する。

30

【0138】

III. 濃縮IgG組成物

ある自己免疫症状の治療について抗体全体を含むIVI G組成物が記述されている。(例えば、米国特許公開第US2002/0114802号、第US2003/0099635号および第US2002/0098182号を参照のこと。)これらの引用文献において開示されるIVI G組成物はポリクローナル抗体を含む。

【0139】

1. 水性IgG組成物

1つの態様では、本発明は本明細書において提供される方法によって調製された水性IgG組成物に関連する。一般に、本明細書において記載される新しい方法で調製されたIgG組成物は、高いIgG含量および純度を有するであろう。例えば、本明細書において提供されるIgG組成物は、少なくとも約3%(重量/体積)のタンパク質濃度および約90%より高い純度のIgG内容物を有する。これらの高純度のIgG組成物は、治療的投与、例えば、IVI G療法、に好適である。1つの実施形態では、IgG濃度は約10%であり、静脈内投与に用いられる。別の実施形態では、濃度は約20%であり、皮下または筋肉内投与に用いられる。

40

【0140】

1つの実施形態では、本発明は、以下の各工程を含む方法によって調製された水性IgG組成物を含む:(a)第1の沈殿工程において、約6.7と約7.3との間のpHで、

50

約 6 % と約 10 % との間のアルコールを用いて脱クリオ血漿分画を沈殿させて、I g G が富化された上清を得る工程、(b) 約 6 . 7 と約 7 . 3 との間の pH で、約 20 % と約 30 % との間のアルコールを用いて上清から I g G を沈殿させて、第 1 の沈殿を形成する工程、(c) 工程 (b) で形成された第 1 の沈殿を再懸濁し懸濁液を形成する工程、(d) 工程 (c) で形成された懸濁液を界面活性剤で処理する工程、(e) 約 6 . 7 と約 7 . 3 との間の pH で、約 20 % と約 30 % との間のアルコールを用いて懸濁液から I g G を沈殿させて、第 2 の沈殿を形成する工程、(f) 工程 (e) で形成された第 2 の沈殿を再懸濁し、懸濁液を形成する工程、(g) 工程 (f) で形成された懸濁液を溶媒および / または界面活性剤で処理する工程、および (h) 少なくとも 1 つのイオン交換クロマトグラフィー分画法を実施し、それによって濃縮された I g G 組成物を調製する工程。

10

【 0 1 4 1 】

特定の実施形態では、以下の各工程を含む方法によって調製された I g G 組成物が提供される：(a) 脱クリオ血漿分画の pH を約 7 . 0 に調整する工程、(b) 約 - 5 と約 - 9 との間の温度で、工程 (a) の脱クリオ血漿分画のエタノール濃度を約 25 % (体積 / 体積) に調整し、それによって混合物を形成する工程、(c) 工程 (b) の混合物から液体と沈殿とを分離する工程、(d) 工程 (c) の沈殿を、リン酸塩と酢酸塩とを含む緩衝液に再懸濁し、ここで緩衝液の pH は緩衝液 1000 L あたり 600 mL の氷酢酸を用いて調整され、それによって懸濁液を形成する工程、(e) 微粉化した二酸化ケイ素 (S i O ₂) を工程 (d) の懸濁液と少なくとも約 30 分間混合する工程、(f) 懸濁液を加圧濾過機を用いて濾過し、それによって濾過液を形成する工程、(g) 加圧濾過機を、加圧濾過機デッドボリウムの少なくとも 3 倍量の、リン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液を用いて洗浄し、ここで緩衝液の pH は緩衝液 1000 L あたり 150 mL の氷酢酸を用いて調整されており、それによって洗浄液を形成する工程、(h) 工程 (f) の濾過液を工程 (g) の洗浄液と合わせ、それによって溶液を形成し、そしてその溶液を界面活性剤を用いて処理する工程、(i) 工程 (h) の溶液の pH を約 7 . 0 に調整し、そしてエタノールを最終濃度約 25 % で添加し、それによって沈殿を形成する工程、(j) 工程 (i) の混合物から液体と沈殿とを分離する工程、(k) 沈殿を、溶媒または界面活性剤を含む水性溶液に溶解し、溶液を少なくとも 60 分間保持する工程、(l) 工程 (k) の後の溶液を陽イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、そしてカラムに吸着されたタンパク質を溶離液中に溶出する工程、(m) 工程 (l) の溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに通して溶出液を生成する工程、(n) 工程 (m) の溶出液をナノフィルターに通してナノ濾過液を生成する工程、(o) 工程 (n) のナノ濾過液を限外濾過膜に通して限外濾過液を生成する工程、および (p) 工程 (o) の限外濾過液を透析濾過緩衝液に対して透析濾過して、約 8 % (重量 / 体積) と約 12 % (重量 / 体積) との間のタンパク質濃度の透析濾過液を生成し、それによって濃縮された I g G 組成物を得る工程。

20

30

【 0 1 4 2 】

ある実施形態では、水性 I g G 組成物は、上記の 2 つまたはそれ以上の分画処理工程における改善を含む、本明細書において提供される方法を用いて調製される。例えば、ある実施形態では、改善は、第 1 の沈殿工程、改変されたフラクション I I + I I I 沈殿工程、改変されたフラクション I I + I I I 溶解工程、および / または改変されたフラクション I I + I I I 懸濁液濾過工程、に見いだされ得る。

40

【 0 1 4 3 】

1 つの実施形態では、水性 I g G 組成物は、本明細書において記載される精製方法によって提供され、ここで、その方法は、他の方法では流動添加によって血漿分画に導入されるであろうが、1 つ以上の溶液のスプレー添加を含む。例えば、ある実施形態では、方法は、スプレーによる血漿分画へのアルコール (例えば、エタノール) 添加を含むであろう。他の実施形態では、スプレーによって血漿分画に添加され得る溶液は、これに限定されるものではないが、pH 調整溶液、溶媒溶液、界面活性剤溶液、希釈緩衝液、伝導度調整溶液など、を含む。好ましい実施形態では、1 つ以上のアルコール沈殿工程が、血漿分画へのスプレーによるアルコール添加によって実施される。第 2 の好ましい実施形態では、

50

1つまたは複数のpH調整工程が、血漿分画へのスプレーによるpH調整溶液添加によって実施される。

【0144】

ある実施形態では、水性IgG組成物は、本明細書において記載される精製方法によって提供され、ここで、その方法は、沈殿剤（例えば、アルコールまたはポリエチレングリコール）添加の後または添加と同時に、沈殿させられる血漿分画のpHを調整することを含む。いくつかの実施形態では、プロセス改善がもたらされ、そこでは能動的に沈殿させられる血漿分画のpHが、pHの継続的監視および調整によって、沈殿インキュベーションまたは保持工程全体にわたって維持される。好ましい実施形態では、pHの調整は、pH調整溶液のスプレー添加によって実施される。

10

【0145】

1つの実施形態では、本発明は、約30g/Lと約250g/Lとの間の濃度のタンパク質を含む水性IgG組成物を提供する。ある実施形態では、IgG組成物のタンパク質濃度は、約50g/Lと約200g/Lとの間、または約70g/Lと約150g/Lとの間、または約90g/Lと約120g/Lとの間、またはこれらの範囲を含むあらゆる好適な濃度、例えば約30g/L、または約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、またはより高い、である。好ましい実施形態では、水性IgG組成物は、10%または約10%の濃度であろう。特に好ましい実施形態では、組成物は10.2±0.2%（重量/体積）の濃度であろう。他の好ましい実施形態では、水性IgG組成物は、20%または約20%の濃度であろう。

20

【0146】

本明細書において提供される方法は、非常に高いレベルの純度を有するIgG組成物の調製を可能にさせる。1つの実施形態では、本明細書において提供される組成物中の全タンパク質の少なくとも約95%がIgGであろう。他の実施形態では、タンパク質の少なくとも約96%がIgGであり、または組成物中の全タンパク質の少なくとも約97%、98%、99%、99.5%、またはより高い、がIgGであろう。好ましい実施形態では、組成物中の全タンパク質の少なくとも97%がIgGであろう。別の好ましい実施形態では、組成物中の全タンパク質の少なくとも98%がIgGであろう。別の好ましい実施形態では、組成物中の全タンパク質の少なくとも99%がIgGであろう。

30

【0147】

同様に、本明細書において提供される方法は、非常に低いレベルの混入物を含むIgG組成物の調製を可能にさせる。例えば、表19は、本明細書において提供される改良された方法によって調製された3つのIgGバルク溶液の純度試験結果を提供する。ある実施形態では、約140mg/Lより少ないIgAを含むIgG組成物が提供される。他の実施形態では、IgG組成物は、約60mg/Lより少ないIgA、好ましくは約40mg/Lより少ないIgA、最も好ましくは約30mg/Lより少ないIgAを含むであろう。

40

【0148】

別の実施形態では、約50mg/Lより少ないIgMを含むIgG組成物が提供される。他の実施形態では、IgG組成物は、約25mg/Lより少ないIgM、好ましくは約10mg/Lより少ないIgM、より好ましくは約5mg/Lより少ないIgM、より好ましくは約4mg/Lより少ないIgM、より好ましくは約3mg/Lより少ないIgM、最も好ましくは約2.5mg/Lより少ないIgMを含むであろう。

50

【0149】

別の実施形態では、毎分約100 PL-1 nmol/mLより少ないアミド分解活性を含むIgG組成物が提供される。他の実施形態では、IgG組成物は毎分約50 PL-1 nmol/mLより少ないアミド分解活性、好ましくは毎分約25 PL-1 nmol/mLより少ないアミド分解活性、より好ましくは毎分約20 PL-1 nmol/mLより少ないアミド分解活性、より好ましくは毎分約15 PL-1 nmol/mLより少ないアミド分解活性、最も好ましくは毎分約10 PL-1 nmol/mLより少ないアミド分解活性を含むであろう。

【0150】

別の実施形態では、約20 mg/Lより少ないフィブリノーゲンを含むIgG組成物が提供される。他の実施形態では、IgG組成物は約10 mg/Lより少ないフィブリノーゲン、好ましくは約5 mg/Lより少ないフィブリノーゲン、より好ましくは約2.5 mg/Lより少ないフィブリノーゲン、より好ましくは約1 mg/Lより少ないフィブリノーゲン、より好ましくは約0.5 mg/Lより少ないフィブリノーゲン、最も好ましくは約0.25 mg/Lより少ないフィブリノーゲン、を含むであろう。

【0151】

さらに別の実施形態では、主としてIgG単量体/二量体からなるIgG組成物が提供される。1つの実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%のIgGが単量体または二量体であるIgG組成物が提供される。好ましい実施形態では、少なくとも97%のIgGが単量体または二量体であるIgG組成物が提供される。より好ましい実施形態では、少なくとも99%のIgGが単量体または二量体である。より好ましい実施形態では、少なくとも99.5%のIgGが単量体または二量体である。より好ましい実施形態では、少なくとも99.7%のIgGが単量体または二量体である。

【0152】

2. 医薬組成物

別の態様では、本発明は、本明細書において提供される方法によって調製された、精製されたIgGを含む医薬組成物および製剤を提供する。一般的に、本明細書において記載される新しい方法によって調製されたIgG医薬組成物および製剤は、高いIgG含量および純度を有するであろう。例えば、本明細書において提供されるIgG医薬組成物および製剤は、少なくとも約7%（重量/体積）のタンパク質濃度および約95%より高い純度のIgG含量を有する。これらの高純度IgG医薬組成物および製剤は、治療的投与、例えば、IVI療法のために適している。好ましい実施形態では、医薬IgG組成物は、静脈内投与（例えば、IVI療法）のために製剤化される。

【0153】

1つの実施形態では、本明細書において提供される医薬組成物は、本明細書において提供される方法を用いて単離された水性IgG組成物を製剤化することによって調製される。一般的に、製剤化された組成物は、少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、最も好ましくは少なくとも3つのウイルス不活化または除去工程を受ける。本明細書において提供される方法で使用され得るウイルス不活化または除去工程の非限定的な例は、溶媒界面活性剤処理(Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 and Kreil et al., Transfusion 2003 (43):1023-1028, いずれも、あらゆる目的のために、引用によりその全てが明示的に本明細書に組み入れられるものとする)、ナノ濾過(Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56)230-236 and Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, いずれも、あらゆる目的のために、引用によりその全てが明示的に本明細書に組み入れられるものとする)、および高温下での低pHインキュベーション(Kemp et al., Transfusion 1991 (31)423-427 and Louie et al., Biologicals 1994 (22):13-19)を含む。

【0154】

ある実施形態では、約 80 g / L I g G と約 120 g / L I g G との間の I g G 含量を有する医薬製剤が提供される。一般的には、これらの I V I G 製剤は、本明細書において記載される方法を使用して、血漿から I g G 組成物を単離すること、組成物を濃縮すること、および静脈内投与に適した溶液中に濃縮された組成物を製剤化することによって調製される。I g G 組成物は、当業者に知られている適切な方法を使用して濃縮され得る。1つの実施形態では、組成物は、限外濾過法 / 透析濾過法によって濃縮される。いくつかの実施形態では、組成物を濃縮するために使用される限外濾過装置は、約 100 kDa より小さいまたは約 90、80、70、60、50、40、30 より小さい、またはより小さい kDa の公称分画分子量 (NMWC O) を有する限外濾過膜を用いるであろう。好ましい実施形態では、限外濾過膜は 50 kDa 以下の NMWC O を有する。緩衝液交換は、当業者に知られている適切な方法によって達成され得る。特定の実施形態では、緩衝液交換は、透析濾過によって達成される。

10

【0155】

1つの特定の実施形態では、I g G の医薬組成物が提供され、ここで、I g G 組成物は、以下の各工程を含む方法を使用して血漿から精製される：(a) 第1の沈殿工程において、約 6.7 と約 7.3 との間の pH で、約 6% と約 10% との間のアルコールを用いて脱クリオ血漿分画を沈殿させて、I g G が富化された上清を得る工程、(b) 約 6.7 と約 7.3 との間の pH で、約 20% と約 30% との間のアルコールを用いて上清から I g G を沈殿させて、第1の沈殿を形成する工程、(c) 工程 (b) で形成された第1の沈殿を再懸濁して、懸濁液を形成する工程、(d) 工程 (c) で形成された懸濁液を界面活性剤で処理する工程、(e) 約 6.7 と約 7.3 との間の pH で、約 20% と約 30% との間のアルコールを用いて懸濁液から I g G を沈殿させて、第2の沈殿を形成する工程、(f) 工程 (e) で形成された第2の沈殿を再懸濁して、懸濁液を形成する工程、(g) 工程 (f) で形成された懸濁液を溶媒および / または界面活性剤で処理する工程、(h) 少なくとも1つのイオン交換クロマトグラフィー分画法を実施する工程；(i) 溶媒界面活性剤処理を実施する工程；および (j) 組成物をナノ濾過法にかけ、それによって I g G 組成物を調製する工程。

20

【0156】

特定の実施形態では、I g G の医薬組成物が提供され、ここで I g G 組成物は、以下の各工程を含む方法を用いて血漿から精製される：(a) 脱クリオ血漿分画の pH を約 7.0 に調整する工程、(b) 工程 (a) の脱クリオ血漿分画のエタノール濃度を、約 -5 と約 -9 との間の温度で、約 25% (体積 / 体積) に調整し、それによって混合物を形成する工程、(c) 工程 (b) の混合物から液体と沈殿とを分離する工程、(d) 工程 (c) の沈殿を、リン酸塩と酢酸塩とを含む緩衝液を用いて再懸濁し、ここで緩衝液の pH は緩衝液 1000 L あたり 600 mL の氷酢酸を用いて調整する、それによって懸濁液を形成する工程、(e) 微粉化した二酸化ケイ素 (SiO₂) を工程 (d) の懸濁液と、少なくとも約 30 分間混合する工程、(f) 懸濁液を加圧濾過機によって濾過し、それによって濾過液を形成する工程、(g) 加圧濾過機を、加圧濾過機デッドボリュームの少なくとも 3 倍量の、リン酸塩および酢酸塩を含む緩衝液を用いて洗浄し、ここで緩衝液の pH は緩衝液 1000 L あたり 150 mL の氷酢酸を用いて調整されており、それによって洗浄液を形成する工程、(h) 工程 (f) の濾過液を工程 (g) の洗浄液と合わせ、それによって溶液を形成し、そしてその溶液を界面活性剤を用いて処理する工程、(i) 工程 (h) の溶液の pH を約 7.0 に調整し、そしてエタノールを最終濃度約 25% で添加し、それによって沈殿を形成する工程、(j) 工程 (i) の混合物から液体と沈殿とを分離する工程、(k) 沈殿を、溶媒または界面活性剤を含む水性溶液に溶解し、溶液を少なくとも 60 分間保持する工程、(l) 工程 (k) の後の溶液を陽イオン交換クロマトグラフィーカラムに通し、そしてカラムに吸着されたタンパク質を溶離液中に溶出する工程、(m) 工程 (l) の溶出液を陰イオン交換クロマトグラフィーカラムに通して溶出液を生成する工程、(n) 工程 (m) の溶出液をナノフィルターに通してナノ濾過液を生成する工程、(o) 工程 (n) のナノ濾過液を限外濾過膜に通して限外濾過液を生成する工程、およ

30

40

50

び(p)工程(o)の限外濾過液を透析濾過緩衝液に対して透析濾過して、約8%(重量/体積)と約12%(重量/体積)との間のタンパク質濃度の透析濾過液を生成し、それによって濃縮されたIgGの組成物を得る工程。

【0157】

ある実施形態では、IgGの医薬組成物が提供される、ここでIgG組成物は、上記の2またはそれ以上の分画処理工程における改善を含む、本明細書において提供される方法を用いて調製される。例えば、ある実施形態では、改善は、第1の沈殿工程、改変されたフラクションII+III沈殿工程、改変されたフラクションII+III溶解工程、および/または改変されたフラクションII+III懸濁液濾過工程、に見いだされ得る。

【0158】

ある実施形態では、IgGの医薬組成物が提供される、ここでIgG組成物は本明細書において記載される精製方法を用いて調製され、その方法は、他の方法では流動添加によって血漿分画に導入されるであろうが、1つ以上の溶液のスプレー添加を含む。例えば、ある実施形態では、方法は、スプレーによる血漿分画へのアルコール(例えば、エタノール)添加を含むであろう。他の実施形態では、スプレーによって血漿分画に添加され得る溶液は、これに限定されるものではないが、pH調整溶液、溶媒溶液、界面活性剤溶液、希釈緩衝液、伝導度調整溶液など、を含む。好ましい実施形態では、1つ以上のアルコール沈殿工程が、血漿分画へのスプレーによるアルコール添加によって実施される。第2の好ましい実施形態では、1または複数のpH調整工程が、血漿分画へのスプレーによるpH調整溶液添加によって実施される。

【0159】

ある実施形態では、IgGの医薬組成物が提供される、ここで、IgG組成物は本明細書において記載される精製方法によって調製され、その方法は、沈殿剤(例えば、アルコールまたはポリエチレングリコール)添加の後または添加と同時の、沈殿させられる血漿分画のpHの調整を含む。いくつかの実施形態では、プロセス改善がもたらされ、そこでは能動的に沈殿させられる血漿分画のpHが、pHの継続的監視および調整によって、沈殿インキュベーションまたは保持工程全体にわたって維持される。好ましい実施形態では、pHの調整は、pH調整溶液のスプレー添加によって実施される。

【0160】

1つの実施形態では、本発明は、約70g/Lと約130g/Lとの間の濃度のタンパク質を含むIgGの医薬組成物を提供する。ある実施形態では、IgG組成物のタンパク質濃度は約80g/Lと約120g/Lとの間、好ましくは約90g/Lと約110g/Lとの間、最も好ましくは約100g/L、またはこれらの範囲中のあらゆる適切な濃度、例えば約70g/L、75g/L、80g/L、85g/L、90g/L、95g/L、100g/L、105g/L、110g/L、115g/L、120g/L、125g/L、または130g/Lである。好ましい実施形態では、タンパク質濃度が100g/Lまたは約100g/Lの医薬組成物が提供される。特に好ましい実施形態では、医薬組成物は、102g/Lまたは約102g/Lのタンパク質濃度を有するであろう。

【0161】

別の実施形態では、本発明は、約170g/Lと約230g/Lとの間の濃度のタンパク質を含むIgG医薬組成物を提供する。ある実施形態では、IgG組成物のタンパク質濃度は約180g/Lと約220g/Lとの間、好ましくは約190g/Lと約210g/Lとの間、最も好ましくは約200g/L、またはこれらの範囲中のあらゆる適切な濃度、例えば約170g/L、175g/L、180g/L、185g/L、190g/L、195g/L、200g/L、205g/L、210g/L、215g/L、220g/L、225g/L、または230g/Lである。好ましい実施形態では、200g/Lまたは約200g/Lのタンパク質濃度を有する医薬組成物が提供される。

【0162】

本明細書において提供される方法は、非常に高いレベルの純度を有するIgG医薬組成物の調製を可能にさせる。例えば、1つの実施形態では、本明細書において提供される組

10

20

30

40

50

成物中の全タンパク質の少なくとも約 95% が I g G であろう。他の実施形態では、タンパク質の少なくとも約 96% が I g G であり、または組成物中の全タンパク質の少なくとも約 97%、98%、99%、99.5%、またはより高い、が I g G であろう。好ましい実施形態では、組成物中の全タンパク質の少なくとも約 97% が I g G であろう。別の好ましい実施形態では、組成物中の全タンパク質の少なくとも約 98% が I g G であろう。別の好ましい実施形態では、組成物中の全タンパク質の少なくとも約 99% が I g G であろう。

【0163】

同様に、本明細書において提供される方法は、非常に低いレベルの混入物を含む I g G 医薬組成物の調製を可能にさせる。例えば、ある実施形態では、約 100 mg / L より少ない I g A を含む I g G 組成物が提供される。他の実施形態では、I g G 組成物は、約 50 mg / L より少ない I g A、好ましくは約 35 mg / L より少ない I g A、最も好ましくは約 20 mg / L より少ない I g A を含むであろう。

10

【0164】

本明細書において提供される医薬組成物は、典型的には、静脈内、皮下、および / または筋肉内投与に適した 1 つ以上の緩衝剤または pH 安定剤を含むであろう。本明細書において提供される I g G 組成物の製剤化に適した緩衝剤の非限定的な例は、適切な pH に調整されたグリシン、クエン酸塩、リン酸塩、酢酸塩、グルタミン酸塩、酒石酸塩、安息香酸塩、乳酸塩、ヒスチジンまたはその他のアミノ酸、グルコン酸塩、リンゴ酸塩、コハク酸塩、ギ酸塩、プロピオン酸塩、炭酸塩、またはこれらの任意の組み合わせ、を含む。一般的に、緩衝剤は、製剤中で長期間にわたって適切な pH に維持するのに十分であろう。好ましい実施形態では、緩衝剤はグリシンである。

20

【0165】

いくつかの実施形態では、製剤中の緩衝剤の濃度は、約 100 mM と約 400 mM との間、好ましくは約 150 mM と約 350 mM との間、より好ましくは約 200 mM と約 300 mM との間、最も好ましくは約 250 mM である。特に好ましい実施形態では、I V I G 組成物は約 200 mM と約 300 mM との間のグリシン、最も好ましくは、約 250 mM のグリシンを含むであろう。

【0166】

ある実施形態では、製剤の pH は約 4.1 と約 5.6 との間、好ましくは約 4.4 と約 5.3 との間、最も好ましくは約 4.6 と約 5.1 との間であろう。特定の実施形態では、製剤の pH は約 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、または 5.6 であり得る。好ましい実施形態では、製剤の pH は約 4.6 と約 5.1 との間であろう。

30

【0167】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される医薬組成物は、任意でさらに組成物の浸透圧を調節するための薬剤を含んでもよい。浸透圧調節剤の非限定的な例は、マンニトール、ソルビトール、グリセロール、ショ糖、ブドウ糖、デキストロース、レブロース、果糖、乳糖、ポリエチレングリコール類、リン酸塩類、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、グルコノグルコヘプトン酸カルシウム、ジメチルスルホンなど、を含む。

40

【0168】

典型的には、本明細書において提供される製剤は、生理的な浸透圧と同程度の浸透圧、約 285 から 295 mOsmol / kg を有するであろう (Lacy et al., Drug Information Handbook - Lexi-Comp 1999:1254)。ある実施形態では、製剤の浸透圧は約 200 mOsmol / kg と約 350 mOsmol / kg との間、好ましくは約 240 と約 300 mOsmol / kg との間であろう。特定の実施形態では、製剤の浸透圧は約 200 mOsmol / kg、または 210 mOsmol / kg、220 mOsmol / kg、230 mOsmol / kg、240 mOsmol / kg、245 mOsmol / kg、250 mOsmol / kg、255 mOsmol / kg、260 mOsmol / kg、265 mOsmol / kg、

50

mol/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、または350mOsmol/kgであろう。

【0169】

本明細書において提供されるIgG製剤は、通常液体形態で長期間安定である。ある実施形態では、製剤は、室温で少なくとも約3か月間、または室温で少なくとも約4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24か月間安定である。製剤はまた、冷蔵状態（典型的には約2と約8との間）で通常6または少なくとも約18ヶ月間、または冷蔵状態で少なくとも約21、24、27、30、33、36、39、42、または45か月間安定であろう。

10

【0170】

IV. 治療方法

現代の医薬で通常実施されているように、濃縮された免疫グロブリン類（特にIgG類）の滅菌製剤は、3つの主要な種類に分類される疾患：免疫不全、炎症性および自己免疫疾患、ならびに急性感染症の治療に用いられる。これらのIgG製剤は、多発性硬化症（特に再発寛解型多発性硬化症またはRRMS）、アルツハイマー病、およびパーキンソン病の治療にもまた有用である。本発明の精製されたIgG製剤はこれらの目的の他に、治療的に認められているIgG製剤のその他の用途のためにも適している。

20

【0171】

FDAはIVIgの使用を、同種異系骨髄移植、慢性リンパ性白血病、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、小児HIV、原発性免疫不全症、川崎病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIDP）、および高抗体レシピエントまたはABO型不適合ドナーにおける腎臓移植を含む様々な適応症について認可している。ある実施形態では、本明細書において提供されるIVIg組成物はこれらの疾患および状態の治療または管理のために有用である。

【0172】

さらにまた、IVIgの承認適応症外使用が、様々な適応症、例えば、慢性疲労症候群、クロストリジウム・ディフィシル大腸炎、皮膚筋炎および多発性筋炎、グレーブス眼症、ギラン・バレー症候群、筋ジストロフィー、封入体筋炎、ランバート-イートン症候群、エリテマトーデス、多巣性運動ニューロパシー、多発性硬化症（MS）、重症筋無力症、新生児同種免疫性血小板減少症、パルボウイルスB19感染症、天疱瘡、輸血後紫斑病、腎移植拒絶反応、自然流産/流産、全身硬直症候群、眼球クロオスミオクロオス、危篤状態の成人患者における重症敗血症および敗血症性ショック、中毒性表皮壊死症、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、X連鎖無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、の治療または管理のために、一般的に患者に提供されている。ある実施形態では、本明細書において提供されるIVIg組成物は、これらの疾患および状態の治療または管理のために有用である。

30

40

【0173】

最後に、原発性免疫不全症、RRMS、アルツハイマー病、およびパーキンソン病を含む疾患の治療または管理のための、IVIgの試験的な使用が提案されている（米国特許出願公開第2009/0148463号、ここで、あらゆる目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるものとする）。ある実施形態では、本明細書において提供されるIVIg組成物は原発性免疫不全症、RRMS、アルツハイマー病、またはパーキンソン病の治療または管理のために有用である。連日投与を含むある実施形態では、患者に投与すべき有効量は、年齢、体重、疾患の重症度、投与経路（例えば、静脈内、対、皮下）および治療に対する反応性の個人差を考慮して医師により決定され得る。ある実施形態では、本発明の免疫グロブリン製剤は、対象者に対して1日あたり約5mg/kgから約200

50

0 mg / kg 投与し得る。追加の実施形態では、免疫グロブリン製剤は、少なくとも約 10 mg / kg、少なくとも 15 mg / kg、少なくとも 20 mg / kg、少なくとも 25 mg / kg、少なくとも 30 mg / kg、または少なくとも 50 mg / kg の量を投与し得る。追加の実施形態では、免疫グロブリン製剤は、対象者に対して、1 日あたり最大で約 100 mg / kg まで、約 150 mg / kg まで、約 200 mg / kg まで、約 250 mg / kg まで、約 300 mg / kg まで、約 400 mg / kg までの用量で投与し得る。他の実施形態では、免疫グロブリン製剤の用量は、より多くまたは少なくでき得る。さらに、免疫グロブリン製剤は、1 日あたり 1 つ以上の用量で投与し得る。I g G 製剤で治療される疾患に精通した臨床医は、この分野で知られている基準に従って、患者のための適切な用量を決定し得る。

10

【0174】

本発明に従って、一連の治療を完了するために必要な時間は、医師により決定することができ、1 日ほどの短期間から 1 か月を超える期間であり得る。ある実施形態では、一連の治療は 1 から 6 か月間であり得る。

【0175】

有効量の I V I G 製剤は、静脈内的な手段で患者に投与される。「有効量」という語は、対象者の疾患または状態の改善または修正をもたらす I V I G 製剤の量を意味する。対象者に投与されるべき有効量は、年齢、体重、治療される疾患または状態、疾患の重症度および治療に対する反応性の個人差を考慮して医師により決定され得る。ある実施形態では、I V I G 製剤は、投与あたり約 5 mg / kg から約 2000 mg / kg の用量で対象者に投与し得る。ある実施形態では、用量は、少なくとも約 5 mg / kg、または少なくとも約 10 mg / kg、または少なくとも約 20 mg / kg、30 mg / kg、40 mg / kg、50 mg / kg、60 mg / kg、70 mg / kg、80 mg / kg、90 mg / kg、100 mg / kg、125 mg / kg、150 mg / kg、175 mg / kg、200 mg / kg、250 mg / kg、300 mg / kg、350 mg / kg、400 mg / kg、450 mg / kg、500 mg / kg、550 mg / kg、600 mg / kg、650 mg / kg、700 mg / kg、750 mg / kg、800 mg / kg、850 mg / kg、900 mg / kg、950 mg / kg、1000 mg / kg、1100 mg / kg、1200 mg / kg、1300 mg / kg、1400 mg / kg、1500 mg / kg、1600 mg / kg、1700 mg / kg、1800 mg / kg、1900 mg / kg、または少なくとも約 2000 mg / kg であり得る。

20

30

【0176】

I V I G 治療の投与量および頻度は、他の要因の中で、治療される疾患または状態および患者の疾患または状態の重症度に依存するであろう。一般に、原発性免疫不全症のためには、約 100 mg / kg と約 400 mg / kg 体重との間の用量が、およそ 3 から 4 週間ごとに投与されるであろう。神経系および自己免疫性疾患のためには、最大で 2 g / kg 体重が、3 から 6 か月間、1 か月あたり 5 日の期間にわたって実施される。これには、一般的に約 100 mg / kg と約 400 mg / kg 体重との間の、3 から 4 週間ごとに約 1 回の投与を含む維持療法が追加される。一般に、患者は、およそ 14 から 35 日ごとに、またはおよそ 21 から 28 日ごとに約 1 回の用量または治療を受けるであろう。治療の頻度は、他の要因の中で、治療される疾患または状態および患者の疾患または状態の重症度に依存するであろう。

40

【0177】

好ましい実施形態では、その治療が必要なヒトにおける免疫不全、自己免疫疾患、または急性感染症を治療する方法が提供され、その方法は本発明の I V I G 医薬組成物の投与を含む。関連する実施形態では、本発明は、免疫不全、自己免疫疾患、または急性感染症の治療に必要なヒトの治療のための、本明細書において提供される方法に従って製造された I V I G 組成物を提供する。

【0178】

ある実施形態では、免疫不全、自己免疫疾患、または急性感染症は、同種異系骨髄移植

50

、慢性リンパ性白血病、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、小児HIV、原発性免疫不全症、川崎病、慢性炎症性脱髄性多発神経炎（CIP）、高抗体レシピエントまたはABO型不適合ドナーにおける腎臓移植、慢性疲労症候群、クロストリジウム・ディフィシル大腸炎、皮膚筋炎および多発性筋炎、グレーブス眼症、ギラン・バレー症候群、筋ジストロフィー、封入体筋炎、ランバート-イートン症候群、エリテマトーデス、多巣性運動ニューロパシー、多発性硬化症（MS）、重症筋無力症、新生児同種免疫性血小板減少症、パルボウイルスB19感染症、天疱瘡、輸血後紫斑病、腎移植拒絶反応、自然流産/流産、全身硬直症候群、眼球クロオスミオクロオス、危篤状態の成人患者における重症敗血症および敗血症性ショック、中毒性表皮壊死症、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫、X連鎖無ガンマグロブリン血症、低ガンマグロブリン血症、原発性免疫不全症、RRMS、アルツハイマー病、およびパーキンソン病、から選択される。

10

【実施例】

【0179】

以下の実施例は、限定ではなく例示として提供するものである。本質的に同様の結果を得るために変更または改変することができる種々の非重要なパラメータは、当業者であれば容易に認識するだろう。

【0180】

実施例 1

本実施例は、濾過の前にアエロジルで処理することにより、多量のフィブリノーゲン、アミド分解活性、プレカリクレイン活性、およびリボタンパク質が抽出改変フラクション

20

【0181】

現在のところ、ヒュームドシリカ（アエロジル380）は、フィブリノーゲン、アミド分解活性、プレカリクレイン活性、およびリボタンパク質の吸着に使用されている。より詳細にアエロジルの効果を調べるため、濾過の前に様々な量のアエロジルで6種の改変フラクションII+III懸濁液を処理した。簡単に言うと、改変II+IIIペーストを再懸濁させるために5mM酢酸ナトリウム/5mMリン酸二水素ナトリウム緩衝液pH4.5を含む溶解緩衝液を使用した。ここに説明するように、II+IIIペースト1gあたり溶解緩衝液15gの割合で調合した。ペースト添加後、pH制御環境下（pH IPC限界：4.9~5.3）、2~8で1時間、懸濁液を撈拌した。我々は、この懸濁液のpHが通常約pH5.1にシフトすることを発見したため、さらなるpH調整は不要であるとした。少なくとも120分間の追加の抽出を行った後、II+IIIペースト1gあたり0~100mgのアエロジル380を容器に加え、懸濁液を1時間インキュベートした。Cuno50SAフィルターを用いた深層濾過の前に珪藻土を加えた。濾過後、フィルターを8g L⁻¹クエン酸塩および0.2%ポリソルベート80（pH5.0）を含む抽出緩衝液で洗浄し、その洗浄液を濾過液に加えた。その後、混合した濾過液と洗浄液をポリソルベート80で処理して、例えばリボタンパク質等の疎水性不純物を可溶化し、-8~-10で25%エタノール（pH7）によりIgGを沈殿させた。その結果得られたppt IgG沈殿物はほぼ白色であり、より高いIgG純度を持っていた。その後、沈殿物を純水でppt IgG沈殿物2gあたり純水7gの割合で溶解した。

30

40

【0182】

IgG溶液はCuno濾過工程後にIgG回収および不純物を分析した。具体的には、アミド分解活性（PL-1）、PKA活性、およびフィブリノーゲンのレベルを測定した（表3）。表3に示すように、明らかに、II+IIIペースト1gあたり40~60mgのアエロジル380を使用した抽出手順では、濾過液中のフィブリノーゲンのレベルにおける著しい減少とともに、アミド分解およびPKA活性の著しく減少した許容レベルのIgGを回収できた。アエロジル処理なしで行う抽出と比較すると、II+IIIペースト1gあたり40mgのアエロジル380を添加することにより、同様のIgG回収（73%）を保ちつつも、PKA活性およびフィブリノーゲン含有量はほぼ90%の減少、アミド分解活性は60%の減少となった。

50

【 0 1 8 3 】

(表1) I I + I I I C u n o 濾過工程におけるアエロジル 3 8 0 の量の効果 (G A M M A G A R D (登録商標) L I Q U I D での抽出条件)

アエロジル	IgG	IgG	PL-1	PKA	フィブリノーゲン
mg g ⁻¹ II+III ペースト	g L ⁻¹ 血漿	回収	μmol min ⁻¹ g ⁻¹ タンパク質(Ppt G)	IU g ⁻¹ タンパク質 (Ppt G)	mg g ⁻¹ タンパク質 (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 %	検出限界 未満	37	0.0
100	4.3	65 %	検出限界 未満	16	0.0

10

【 0 1 8 4 】

実施例 2

本実施例は、濾過の前にアエロジルで処理することにより、多量のフィブリノーゲンが抽出された改変フラクシオン I I + I I I ペースト懸濁液から除去できることを明らかにする。本実験の目的の 1 つは、I g G の著しい減少を負うことなく効率良くフィブリノー

20

【 0 1 8 5 】

ここで提供される方法により調合した改変 I I + I I I ペーストを 5 m M 酢酸ナトリウム / 5 m M リン酸一ナトリウム緩衝液 p H 4 . 5 で溶かした。溶解比は、I I + I I I ペースト 1 k g あたり 1 5 k g の緩衝液とした。緩衝液に加える酢酸の量は 6 0 分間撹拌した後の p H が 4 . 9 になるように設定した。懸濁液を十分に均質化するために、表 2 に示すようにそれぞれ異なる量のアエロジル 3 8 0 がすでに入った 1 0 0 m l ビーカーのそれぞれに 5 0 m l ずつ 6 つに分ける前に、懸濁液を 2 0 時間まで、2 ~ 8 で撹拌した。その後、処理と分析の前に、I I + I I I 懸濁溶液をアエロジル存在下で 8 0 分間撹拌した。撹拌後、全てのサンプルを 3 0 分間、4 、 5 0 m l ファルコンチューブ内、4 6 0 0 R P M で、H e r a e u s C r y o f u g e 8 5 0 0 i により遠心分離した。

30

【 0 1 8 6 】

本実験において、I I + I I I 懸濁液に見られる高濃度の I g G 測定は、E L I S A テストに比べてより正確な値が得られることから選択された比濁分析テストを用いた。非特異的濁りによる刺激を最小限にするため、テスト前に 0 . 4 5 μ m フィルターでサンプルを濾過した。I g M、I g A およびフィブリノーゲンに対し、E L I S A テストは懸濁液中のそれら不純物が低濃度であることが好ましかった。本実験の結果は以下の表 2 に示す。

【 0 1 8 7 】

実施例 1 で述べたように、フィブリノーゲンの除去および I g G の減少に関するアエロジル処理の効果をより特徴づけるため、アエロジル濃度を改変 I I + I I I ペースト 1 g あたり 0 m g ~ 4 0 m g の間で設定した。表 2 に示す結果は、大容量のアエロジルがこの画分におけるフィブリノーゲンを減少させることを裏付ける。とりわけ、I I + I I I ペースト 1 g あたり 4 0 m g 使用すると、濾過ケーキ中の I g G 回収が 1 0 % しか減少しなかった一方で、フィブリノーゲンがほぼ 9 0 % 減少した。

40

【 0 1 8 8 】

(表 2) 遠心分離後に I I + I I I を 5 m M N a A c / 5 m M N a H ₂ P O ₄ p H 4 . 5 により I I + I I I 1 k g + 緩衝液 1 5 k g の溶解比で抽出した後の溶解条件の変化による結果

		上清中の値													
溶解条件				タンパク質(ビュレット法)			IgM ELISA		IgG比濁分析法		IgA ELISA		フィブリノーゲンELISA		
条件		追加撹拌時間 (分)	pH	電気伝導率 (mS cm ⁻¹)	(g L ⁻¹)	(g)	(g L ⁻¹ 血漿)	μg mL ⁻¹	(g L ⁻¹ 血漿)	Mg mL ⁻¹	(g L ⁻¹ 血漿)	μg mL ⁻¹	(g L ⁻¹ 血漿)	μg mL ⁻¹	(g L ⁻¹ 血漿)
ブランク80分	mg g ⁻¹ II+III ペースト	80	5.0	1.5	13.76	0.69	8.5	476	0.29	7.19	4.44	993	0.61	400	0.25
アエロジル 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
アエロジル 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
アエロジル 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
アエロジル 30		80	5.0	1.5	12.49	0.62	7.7	468	0.29	6.77	4.18	944	0.58	95	0.06
アエロジル 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

【0189】

実施例 3

本実施例は、弊害をもたらす不純物レベルを制限しつつ、改変フラクションⅡⅡ+ⅡⅡⅡペーストからのIgGの高効率抽出を可能にする適切な条件を明らかにする。具体的に言うと、ⅡⅡ+ⅡⅡⅡ溶解緩衝液に使用される酢酸濃度および濾過前の抽出溶液のアエロジル処理を含むパラメータを調べた。

【0190】

ⅡⅡ+ⅡⅡⅡペーストは、表1に示すように、5 mM酢酸ナトリウム、5 mMリン酸二水素ナトリウムおよび様々な量の濃縮酢酸で180分間、2 ~ 8 で抽出した。続いて、表1に示すようにアエロジル380を添加した。1時間の撹拌後、珪藻土の存在下、Cuno 50SAによる濾過により懸濁液を清澄化した。表1に記載のように、フィルターの後洗浄は、濾過前の懸濁液の40%の容量を使用して、酢酸の量が異なることを除いて抽出用と同じ緩衝液を用いて行った。25%エチルアルコール、8 g L⁻¹クエン酸ナトリウムおよび0.2%ツイーン80 (pH 7)の存在下、-8 で沈殿物Gを沈殿させ、8時間の待機時間の後に、30分間、-10、4600 RPMで、ステンレスピーカーの中で、Heraeus Cryofuge 8500iにより遠心分離した。沈殿物は純水中で1:2の割合で溶解した。

【0191】

(表3) 抽出緩衝液のpH調整の酢酸量と、IgG収率、Ppt Gの純度および濾過ケーキ中のIgGの減少への清澄化におけるアエロジル量の影響

	アエロジル (mg g ⁻¹ II+III)	0	20	40	40
溶解緩衝液	酢酸 (g L ⁻¹)	0.40	0.40	0.40	0.51
	pH	4.52	4.52	4.52	4.46
II+III 抽出	pH	5.00	5.00	5.00	4.94
	伝導率 (mS cm ⁻¹)	1.340	1.340	1.340	1.344
前/後洗浄 緩衝液	酢酸 (g L ⁻¹)	0.12	0.12	0.12	0.12
	pH	5.02	5.02	5.02	5.02
濾過 II+III	CAE アルブミン (%)	11.9	12.5	12.3	10.7
	CAE α/β-グロブリン	25.5	22.9	18.9	17.2
	CAE 変性タンパク質	3.2	0.0	0.0	0.0
	CAE (% γ-グロブリン)	59.4	64.6	68.8	72.1
	pH	5.00	5.03	5.04	4.92
IgG損失 濾過ケーキ	(g L ⁻¹ 血漿)	0.09	0.20	0.56	0.29
PptG 溶解	CAE アルブミン (%)	0.3	0.5	0.3	0.3
	CAE α/β-グロブリン	16.2	14.3	12.5	13.0
	CAE 変性タンパク質	0.0	0.0	0.0	0.0
	CAE (% γ-グロブリン)	83.5	85.2	87.2	86.7
	フィブリノーゲン (mg L ⁻¹ 血漿)	129	32	<4	4
	PKA (IU mg ⁻¹ タンパク質)	126	60	9	10
	PL-1 (μmol mL ⁻¹ g ⁻¹)	0.9	0.6	0.5	0.6
PptG上清	pH	7.20	7.35	7.30	6.96
IgG損失 上清PptG	(g L ⁻¹ 血漿)	0.14	0.13	0.11	0.09

【 0 1 9 2 】

表 1 から分かるように、II + III ペースト懸濁液にアエロジルを添加すると、PptG 画分における γ-グロブリン純度に著しい影響がある。アエロジル無しでは γ-グロブリン純度は 83.5 % にとどまるが、II + III ペースト 1 g あたり 40 mg のアエロジルを II + III ペースト懸濁液に添加すると、γ-グロブリン純度は 87.2 % に上昇する。アエロジル処理がフィブリノーゲン、PKA およびアミド分解活性の著しい減少を導くことから明らかである。アエロジルへの不純物吸着の欠点の 1 つは、アエロジルの量が増えるにつれ濾過ケーキ中の IgG 減少が増す点である。しかしながら、表 1 に示すように、抽出緩衝液において酢酸の濃度が高いことが、濾過ケーキ中の IgG 減少におけるアエロジルの効果、さらには減少した上清 PptG 画分中の IgG 減少と部分的に釣り合いをとる。表 1 から分かるように、溶解緩衝液中の酢酸濃度がペースト 1 L あたり 400 μL から 510 μL に増加すると、濾過ケーキ中の IgG 減少の量がほぼ 50 % まで減少する。有利なことに、酢酸濃度が高いことは PptG 画分における γ-グロブリン純度に影響を及ぼさない (ペースト 1 L あたり 400 μL で 87.2 % 純度に対し、ペースト 1 L あたり 510 μL で 86.7 % 純度)。さらに、pKa 値が 4.75 付近である酢酸の高い緩衝能により (Merck)、異なる酢酸量により生じた pH の差は無視できることを結果が示している。これは、より精度のよい大規模製造のためには、酢酸を重量で加えるべきであることを示唆する。したがって、CAE により測定された γ-グロブリン含有量に示されるように、調べた範囲においては、純度に対しアエロジルの影響が酢酸の影響よりもはるかに高い。

【 0 1 9 3 】

実施例 4

実施例 3 での結果は、濾過ケーキ中の IgG 減少量が抽出緩衝液の pH 調整のために所定のアエロジル濃度で使用された酢酸の量に強く依存することを示している。この効果をさらに特徴づけるため、改変 II + III ペーストを約 120 分間純水中で抽出し均質な懸濁液を得、4 つのパートに分けた。これらのパートは 1 M 酢酸でそれぞれ pH 3.8、4.2、4.6、5.0 に調整され、その後さらに 120 分間の第 2 の抽出時間を続けた。その後、II + III ペースト 1 g あたり 40 mg のアエロジル 380 でアエロジル処理を行った。1 時間の攪拌後、珪藻土の存在下、Cuno 50 SA による濾過により懸濁液を清澄化した。pH を上述のように調整した抽出緩衝液を用いた濾過の前に、100

%容量の懸濁液でフィルターの後洗浄を行った。濾過液は、 8 g L^{-1} クエン酸ナトリウムおよび $\text{pH } 7.0$ に調整された 0.2% ツイーン 80 で処理し、 25% アルコール、 -8°C で IgG を沈殿させた。Ppt G 沈殿物は、Heraeus Cryofuge 8500iにおいて、 4600 RPM 、 30 分間、 -10°C でステンレスピーカーを用い遠心分離することにより回収した。その後、沈殿物を純水で Ppt G 沈殿物 2 g あたり純水 7 g の割合で溶解した。その後、関連の画分に IgG 回収、PKA 活性、フィブリノーゲン含有量およびアミド分解活性の分析を行い、回収の pH 依存性を求めた (表 4)。

【0194】

(表 4) アエロジル処理での抽出および清澄化によるフィブリノーゲン、PKA およびアミド分解活性の pH 依存性の除去

pH 抽出および 清澄化 酢酸	pH調整後の 酢酸濃度 (mM)	濾過 ケーキ中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	PptG上清中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	IgG損失Σ (g L^{-1} 血漿)	沈殿物 G		
					PKA (IU mg^{-1})	フィブリノーゲン (mg L^{-1} 血漿)	PL-1 ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ 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
5.0	5	0.14	0.09	0.23	3	10	<0.2

【0195】

表 4 は、アエロジルを用いた PKA、アミド分解活性 (PL-1)、およびフィブリノーゲンの除去が、清澄化の間低い pH では効果が少ないことを示している。ここで得られた結果から、Ppt G 画分において効率的な IgG 回収を維持しつつも、PKA、アミド分解活性 (PL-1) およびフィブリノーゲンの効果的な除去に対し最も効果的な pH が約 $\text{pH } 5$ であることが分かる。濾過ケーキ中の IgG 減少が最小化される一方で、高濃度の酢酸は Ppt G 上清における著しい IgG 減少につながる (75 mM 酢酸の存在下で 0.85 g L^{-1})。

【0196】

実施例 5

実施例 4 で分かった結果におけるアエロジル処理の依存性を求めるため、実験を繰り返したが、アエロジル処理工程を省略した。簡単に言うと、II + III ペーストを約 120 分間純水中で抽出し均質な懸濁液を得、4つのパートに分けた。これらのパートは 1 M 酢酸でそれぞれ $\text{pH } 3.8$ 、 4.2 、 4.6 、 5.0 に調整され、その後さらに 120 分間の第 2 の抽出時間を続けた。その後、珪藻土の存在下、Cuno 50SA による濾過により懸濁液を清澄化した。pH を上述のように調整した抽出緩衝液を用いた濾過の前に、 100% 容量の懸濁液でフィルターの後洗浄を行った。濾過液は、 8 g L^{-1} クエン酸ナトリウムおよび $\text{pH } 7.0$ に調整された 0.2% ツイーン 80 で処理し、 25% アルコール、 -8°C で IgG を沈殿させた。Ppt G 沈殿物は、Heraeus Cryofuge 8500iにおいて、 4600 RPM 、 30 分間、 -10°C でステンレスピーカーを用い遠心分離することにより回収した。その後、沈殿物を純水で Ppt G 沈殿物 2 g あたり純水 7 g の割合で溶解した。その後、関連の画分に IgG 回収、PKA 活性、フィブリノーゲン含有量およびアミド分解活性の分析を行い、回収の pH 依存性を求めた (表 5)。

【0197】

(表 5) アエロジル処理なしでの抽出および清澄化によるフィブリノーゲン、PKA およびアミド分解活性の pH 依存性の除去

pH 抽出および 清澄化 酢酸	pH調整後の 酢酸濃度 (mM)	濾過 ケーキ中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	PptG上清中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	IgG損失 Σ (g L^{-1} 血漿)	沈殿物 G		
					PKA (IU mg^{-1})	フィブリノーゲン (mg L^{-1} 血漿)	PL-1 ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ 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

10

【0198】

実施例4で見られた結果と一致して、抽出および溶解緩衝液のpHが5.0に上昇しても、濾過ケーキ中のIgG減少は少ししか上昇しなかった。しかしながら、この減少はPpt G上清におけるIgG減少の大きな減少を補って余りあるものである。

【0199】

実施例4と実施例5の結果を比較すると、アエロジル処理が、II + IIIペーストがpH 5.0ではなく、より低いpH (3.8、4.2および4.6) で抽出される時の溶解Ppt G画分に見られる残留PKA活性の量を減少させることが分かる(図2)。反対に、アエロジル処理は、II + IIIペーストがより高いpHで抽出される時の溶解Ppt G画分のフィブリノーゲン含有量を著しく減少させる(図3: pH 4.6および5.0とpH 3.8および4.2を比較のこと)。アエロジル処理は、溶解Ppt G画分に見られる残留アミド分解活性のレベルに影響しないと思われる(図4)。特に、pH 3.8、4.2および4.6と比較して、II + IIIペーストがpH 5.0で抽出される時に溶解Ppt G画分中の3種の混入物質全てのレベルが著しく減少する。

20

【0200】

実施例6

上記実施例に見られるように、濾過ケーキおよびPpt G上清におけるIgG減少はII + IIIペーストがpH 4.5から4.6付近で抽出されるときに最小化する。しかしながら、前の実施例においても明らかなように、PKA活性、アミド分解活性およびフィブリノーゲン含有量を含む重篤な不純物がII + IIIペーストがpH 4.9から5.0付近にて抽出されるときと比較して、pH 4.5から4.6にて抽出されるときの方が非常に多い。それに基づき、II + IIIペーストがpH 4.5で抽出されるときに見られる非常に高い不純物レベルを、濾過ケーキおよびPpt G上清におけるIgG減少のレベルを低く維持しつつ、混入物質を吸着するのに用いるアエロジルの量を増やすことで相殺できるかどうかを確認するために本実施例を行った。

30

【0201】

この線に沿って、改変II + IIIペーストの抽出は以前と同じように、pH 4.5の抽出緩衝液を用いて行った。その後、II + IIIペースト1gあたり200mgまでアエロジル380の量を増やして添加し、懸濁液を1時間攪拌した。サンプルのさらなる処理は上記のとおり行った。

40

【0202】

表6に見られるように、フィブリノーゲンおよびPKA活性の除去は大量のアエロジルによる清澄化によって著しく改善する。アエロジルへの結合による濾過ケーキ中のIgG減少は大量のアエロジルを用いると増加するが、この影響はPpt G上清におけるIgG減少が減ることによっていくぶん相殺される。しかしながら、重要なのは、II + IIIペーストがpH 4.5で抽出されたときには大量のアエロジルでもアミド分解活性が減少しないことである。そのうえ、グロブリン純度は大量のアエロジルにて改善される

50

が、全ての場合において P p t G における $> 86\%$ という規格限界をまだ下回っている。おそらく抽出および清澄化における低い pH が理由であろう。

【 0 2 0 3 】

(表 6) 表 6 は pH 4 . 5 の抽出および清澄化におけるアエロジル濃度の変化の結果を提示する

1gのII+III あたりの アエロジル量 mg	濾過 ケーキ中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	PptG上清中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	IgG損失 Σ (g L^{-1} 血漿)	沈殿物 G			
				PKA (IU mg^{-1})	フィブリノーゲン (mg L^{-1} 血漿)	PL-1 ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ g^{-1})	CAE (% γ- グロブリン)
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	検出限界 未滿	10	4.5	84.1

【 0 2 0 4 】

実施例 7

本実施例では、II + III ペースト再懸濁および清澄化に続く不純物の除去における抽出緩衝液の pH の影響について明らかにする。

【 0 2 0 5 】

改変 II + III ペーストの低い pH での抽出は II + III ペースト 1 g あたり 15 g の緩衝液の比率を用いて pH 4 . 2 で行った。その後懸濁液を 3 つのパートに分け、3 M トリスを用いてそれぞれ pH 4 . 5、4 . 7、5 . 0 に調整した。その後、各溶液をさらに 2 つのパートに分け、4 または 25 で 1 時間インキュベートした。Cuno 50 (90) SA による濾過をそれぞれの清澄化緩衝液と同じ pH を持つ 10 mM 酢酸ナトリウム後洗浄緩衝液を用いて行った。濾過液は 8 g L^{-1} クエン酸塩および 0 . 2 % ツイーン 80 で処理し、それから Ig G を 25 % エチルアルコール添加により - 10 で少なくとも 8 時間沈殿させた。沈殿物は前述のように遠心分離によって回収し、2 倍量の純水に溶解した。結果として得られた懸濁液を Cuno VR 06 濾過装置を用いて濾過し、約 1.3 mS cm^{-1} の伝導率を有する最終液となった。

【 0 2 0 6 】

様々な条件を評価するために Ig G、Ig A、Ig M、トランスフェリン、フィブリノーゲン、およびその他の不純物のレベルについて確認した。II + III ペースト懸濁液の清澄化の pH 依存性について示した分析結果を表 7 に示す。pH 4 . 5 から 5 . 0 の範囲内では、Ig A および Ig M、トランスフェリン、およびフィブリノーゲン量は広範囲での変化はしなかったが、低 pH の緩衝液を用いた場合には、他の不要なタンパク質が高いレベルで存在する。これらの他の不純物は pH 5 では全タンパク質の 1 % 未滿だが、pH 4 . 5 では 10 % と算出された。Ig G 含有量は pH 5 . 0 で最も高くなる一方、4 ~ 25 における Ig G 含有量と不純物レベルの温度依存性はごくわずかである。

【 0 2 0 7 】

(表 7) 表 7 は、II + III ペーストの再懸濁後の 1 時間のインキュベーションおよびそれに続く添加剤なしの低 pH 抽出後の濾過の間における II + III の溶解から VR 06 濾過までの不純物の減少を pH および温度を変化させることにより比較する

インキュベーションおよび両方の濾過工程のpH	インキュベーションおよび第1濾過工程の温度	工程	タンパク質の%					
			IgG比濁分析法	IgA ELISA	IgM ELISA	トランスフェリン ELISA	フィブリノーゲン ELISA	算出した他の不純物
4.5	4°C	II+III 溶解	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 90 濾過	51.7	8.5	4.0	1.6	2.5	31.7
		Ppt G 溶解	64.4	8.3	4.4	0.1	2.8	20.0
		VR06 濾過	71.8	9.5	5.1	0.1	3.0	10.6
	25°C	II+III 溶解	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 90 濾過	52.3	8.0	4.2	1.6	2.6	31.3
		Ppt G 溶解	64.5	7.4	4.8	0.1	3.8	19.4
		VR06 濾過	72.5	9.1	5.0	0.1	3.3	9.9
4.7	4°C	II+III 溶解	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50 濾過	49.4	8.2	3.7	1.6	2.5	34.6
		Ppt G 溶解	68.8	9.5	5.0	0.1	3.5	13.2
		VR06 濾過	76.5	9.8	5.4	0.1	3.5	4.7
	25°C	II+III 溶解	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 濾過	49.6	8.6	3.7	1.5	3.1	33.6
		Ppt G 溶解	66.9	8.8	4.9	0.1	4.1	15.2
		VR06 濾過	75.8	10.2	5.3	0.1	4.3	4.3
5.0	4°C	II+III 溶解	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50 濾過	52.5	9.3	3.4	1.7	2.1	31.0
		Ppt G 溶解	76.9	10.1	4.9	0.1	3.0	5.0
		VR06 濾過	83.6	10.6	4.5	0.1	3.0	0.0
	25°C	II+III 溶解	55.0	7.9	3.6	1.3	3.0	29.3
		Cuno 50 濾過	53.4	8.9	3.4	1.8	2.6	30.0
		Ppt G 溶解	76.6	10.3	4.8	0.1	3.9	4.3
		VR06 濾過	79.9	10.9	4.7	0.1	3.6	0.8

【 0 2 0 8 】

表 8 から分かるように、溶解 P p t G 画分および V R 0 6 濾過のさらなる分析は、p H 4 . 5 の緩衝液を I I + I I I 清澄化および I I + I I I 濾過処理工程に用いることにより、凝集体および低分子量成分のレベルが上昇することを示している。これらの工程は 4 よりも 2 5 で行くと、この効果がより高められる。反対に、サンプルをより高い p H (p H 5 . 0) で処理すると、p H 4 . 5 での処理に比べ、得られる P p t G 懸濁液および濾過液は ~ 3 5 0 k D a の物質を高いレベルで (二量体 I g G または I g A) を含む (表 8) 。さらに、より低い p H で処理すると、p H 5 . 0 での処理に比べ、より高いアミド分解活性レベルとなった。

【 0 2 0 9 】

(表 8) 溶解した沈殿物 G の P K A およびアミド分解活性、V R 0 6 濾過における分子サイズ分布における I I + I I I ペースト懸濁液のインキュベーションおよび濾過の間の p H および温度の影響

インキュベーションおよび両方の濾過工程の pH	インキュベーションおよび第1濾過工程の温度	Ppt G 溶解				VR06 濾過			
		PKA 活性		アミド分解活性 (PL-1)		分子サイズ分布 (%)			
pH	温度 °C	IU mL ⁻¹	IU g ⁻¹	nmol mL ⁻¹ .min ⁻¹	nmol min ⁻¹ .g ⁻¹	>450 kDa	~350 kDa	~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

【 0 2 1 0 】

実施例 8

表 7 および 8 に示された結果は、I I + I I I 沈殿物の再懸濁は冷蔵温度 (2 ~ 8) で行う必要があること、またアミド分解活性を有する成分と同様に、高 (> 4 5 0 k D a) および低 (> 7 0 k D a) 分子量成分の溶解を最小限に抑えるために p H を p H 5 . 0 に保つ必要があることを示している。I I + I I I ペースト懸濁後の効果的な清澄化は、P p t G の下流工程のクロマトグラフィーにおける不純物の負荷を減少させるため、I V I G 最終容器の仕様書に再現性良く適合する鍵となる。この成果をより有効にするため、改変 I I + I I I ペーストは上記のように溶解、処理し、改変 I I + I I I ペーストを p H 4 . 2 で溶解し、その後 p H 4 . 5、4 . 7、5 . 0 に調整した。表 9 に示すように、I I + I I I ペーストの懸濁および清澄化において、p H 4 . 5 よりも p H 5 . 0 の方が I g M はより効率良く除去される。この実験において、I g G 収率は p H 5 . 0 と 4 . 5 ではよく似た結果となった。

【 0 2 1 1 】

(表 9) I I + I I I ペースト再懸濁、濾過、および P p t G 沈殿の種々の工程における I g G、I g A、I g M、トランスフェリン、およびフィブリノーゲンの収率

			収率%					
インキュベーション および両方の 濾過工程のpH	インキュベーション および第1 濾過工程の温度	工程	全 タンパク質	IgG 比濁分析法/ ELISA ¹	IgA ELISA	IgM ELISA	トランスフェリン ELISA	フィブリノーゲン ELISA
4.5	4°C	II+III 溶解	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50 濾過	100.2	92.9	100.2	97.8	118.7	86.3
		Cuno 90 濾過	97.0	91.1	105.3	108.6	123.2	80.1
		Ppt G 上清	33.5	4.4	-	-	-	-
		Ppt G 溶解	71.7	83.9	75.6	89.6	5.0	66.5
		VR06 濾過	65.3	85.2	78.8	93.1	5.2	64.8
	25°C	II+III 溶解	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50 濾過	101.0	92.3	100.9	104.4	113.2	96.7
		Cuno 90 濾過	97.2	92.4	98.9	113.4	123.9	84.6
		Ppt G 上清	33.8	5.1	-	-	-	-
		Ppt G 溶解	72.9	85.5	68.8	97.5	4.7	89.9
		VR06 濾過	68.3	90.0	78.9	95.9	5.5	75.0
4.7	4°C	II+III 溶解	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50 濾過	93.5	83.9	98.0	98.0	115.9	75.3
		Ppt G 上清	27.5	2.7	-	-	-	-
		Ppt G 溶解	64.8	81.1	78.2	90.2	4.5	73.9
		VR06 濾過	60.5	84.1	75.0	92.1	5.1	70.2
	25°C	II+III 溶解	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50 濾過	94.7	85.3	103.1	98.5	113.8	95.8
		Ppt G 上清	28.5	4.1	-	-	-	-
		Ppt G 溶解	65.3	79.5	73.1	90.9	5.0	87.0
		VR06 濾過	61.9	85.3	80.7	93.0	5.3	86.9
5.0	4°C	II+III 溶解	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50 濾過	86.1	82.3	101.5	81.5	117.5	59.8
		Ppt G 上清	26.0	4.1	-	-	-	-
		Ppt G 溶解	58.1	81.2	74.8	79.3	4.5	57.0
		VR06 濾過	54.0	82.1	72.5	67.8	4.7	52.5
	25°C	II+III 溶解	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
		Cuno 50 濾過	88.0	85.4	99.7	83.2	124.1	75.4
		Ppt G 上清	23.4	1.5	-	-	-	-
		Ppt G 溶解	60.5	84.2	79.0	81.6	4.5	78.2
		VR06 濾過	59.0	85.7	82.0	77.6	4.5	69.0

【 0 2 1 2 】

実施例 9

I I + I I I ペースト抽出工程における p H の最適条件を求めるため、濾過液中のタン

パク質分解活性を最小限に抑える目的で、抽出および濾過におけるpHをpH3.8~7.8の広い範囲にわたって変化を持たせた。この目的のため、改変II+IIIペーストを1+8の比率で低いpHで抽出した。短時間撹拌した後、均一化した分散液を得るため、懸濁液を8つのパートに分け、pHを酢酸またはトリス緩衝液を用いてそれぞれpH3.8、4.2、4.6、5.0、6.6、7.0、7.4、7.8に調整し、追加で120分間抽出した。その後、pHを5.1に調整し、清澄化を50mLのファルコンチューブ内での遠心分離により行った。Ppt G沈殿は標準条件下で行った。図5および6に示されるように、アミド分解活性およびPKAはPpt G溶解画分中で測定した。

【0213】

図5の4で保管したサンプルにおいて見られるように、II+IIIペーストがpH5.0で抽出される時にアミド分解活性は最小限に抑えられる。さらに強調したい点は、Ppt G溶解画分を室温で1週間保管した後、アミド分解活性が上昇したことから、サンプルは長時間高温（室温）で保存するべきではないということである。同様に、図6から分かるように、II+IIIペーストがpH5.0以上で抽出される時にPKA活性は最小限に抑えられる。

【0214】

実施例10

本実施例では、抽出および清澄化においてIgG収率減少のpH依存性を評価する。簡単に言うと、II+IIIペースト1gあたり15gの純水の比率で110gの改変II+IIIペーストを再懸濁させ、続いて120分間の抽出を行った。その後サンプルを4つのパートに分け、pHを酢酸でそれぞれpH3.8、4.2、4.6、5.0に調整した。4つの同一性を確保するために、4つのパートに分ける前にもとのpHで前抽出を行い、上述のpHに調整し、さらに追加で1時間抽出を行った。その後、サンプルをそれぞれの抽出およびPpt G沈殿に用いたものと同じpHでCuno50SA濾過により清澄化した。Cuno濾過の後、全てのパートを同じように処理した、つまり、全てのパートをpH7.0の標準的な沈殿物Gの沈殿処理をした。そのような実験の2つの結果は以下の表10および11に要約される。

【0215】

(表10) 濾過液中のタンパク質およびIgG回収、および再溶解沈殿物G'sのMSDおよびCAEの結果

			38/1				41				
			pH抽出 および 清澄化	3.8	4.2	4.6	5.0	3.8	4.2	4.6	5,0
			pH調整後の 酢酸濃度	75	25	10	5	75	25	10	5
濾過液			タンパク質 回収 (%)	100.3	99.6	92.8	76.0	106.4	107.5	99.7	81,0
			IgG回収 (%)	87.6	89.8	90.3	86.0	96.2	97.3	95.1	88,3
沈殿物G	MSD (%面積)	>450kDa	19.2	20.5	14.8	13.2	22.5	22.8	20.7	16,8	
		~350kDa	8.7	7.6	10.5	11.7	5.2	5.0	7.7	9,4	
		~160kDa	69.5	69.2	72.9	74.2	66.0	65.6	67.5	72,0	
		<70kDa	2.7	2.7	1.8	1.0	6.2	5.6	4.1	1,9	
	CAE (% γ-グロブリン)		67,4	68.3	78.1	86.7	68.3	69.8	77.5	85.1	

【0216】

(表11) 抽出および清澄化におけるIgG減少、および再溶解沈殿物Gにおけるタンパク質分解活性およびフィブリノーゲン

pH 抽出および 清澄化酢酸	pH調整後の 酢酸濃度 (mM)	濾過 ケーキ中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	PptG 上清中の IgG損失 (g L^{-1} 血漿)	IgG損失 Σ (g L^{-1} 血漿)	沈殿物G		
					PKA (IU mg^{-1})	フィブリノーゲン (mg L^{-1} 血漿)	PL-1 ($\mu\text{mol mL}^{-1}$ 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

10

【0217】

上記のデータは低いpHでの抽出によるタンパク分解酵素の活性化に関する図5および6に示した結果を裏付けている。まとめると、そのデータは低pH抽出が全てのタンパク質の溶解性が増加することによってIgG減少がより少なくなることをもたらすということを示している。さらに、表11に見られるIgG減少は、より低いpHをもたらし高濃度の酢酸により、濾過ケーキ中のIgG減少はより低くなるが、沈殿物G上清においてはIgG減少はより高くなるということを示唆している。この現象は低いpHでの抽出後の沈殿工程における高濃度の酢酸によって説明できるかもしれない。

20

【0218】

実施例11

適切なII+III抽出条件を確認するために、酢酸でpH4.3に調整した純水で低いpHでの抽出を行い、濾過前にpH4.9に再調整する手順と、抽出緩衝液1000Lあたり600gの酢酸を用い、溶解液のpHが4.8~4.9となる5mM酢酸ナトリウム/5mMリン酸二水素ナトリウムによる抽出を比較した。この実験はパイロットスケールで行われ、3.8~5kgの改変II+IIIペーストを用いて開始した。全ての実験はII+IIIペースト1kgあたり40gのアエロジルを用いたアエロジル処理を含めた。清澄化には、Cuno50SAフィルターシートを備えたフィルター枠30cm*30cmのストラスパー加圧濾過器を用いた。後洗浄は、緩衝液1000Lあたり150gの酢酸を用いた5mM酢酸ナトリウム/5mMリン酸二水素ナトリウムを用い、加圧濾過器の4デッドボリュウム容量で行った。沈殿物Gの遠心分離はCepa（登録商標）Z61H遠心分離機を用いて17000RPM（ローター直径10.5cm）、1時間あたり40Lの流量で行った。3回実施されたその試験の結果は表12に示される。

30

【0219】

（表12）pH4.3での低いpHでの抽出およびアエロジル処理前にpH4.9にシフトしたものと抽出緩衝液1000Lあたり氷酢酸600gを用いた改良されたGAMMAGARD（登録商標）LIQUIDによる抽出との比較

実験	単位	P00809NG2	P00909NG2	P01509NG2	P02209NG2	P02509NG2	P02609NG2
方法		低pH抽出			抽出緩衝液1000Lあたり600gのHAc		
II+IIIペースト	ロット#	VNEGJ039	VNGBJ022	VNGBJ216	VNGBJ216	VNGBJ022	VNEGJ039
	kg	5.00	5.00	4.97	4.96	4.96	3.86
PEQ	L	106.65	118.70	123.32	123.31	117.65	82.35

II+III抽出

タンパク質	g	1316	1310	1364	1336	1347	1022
タンパク質収率 (ビウレット法)	g L ⁻¹	12.3	11.0	11.1	10.8	11.5	12.4
IgG 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	6.09	5.89	6.25	5.50	6.06	6.38
IgA 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	1.06	0.96	0.98	1.00	1.01	1.10
IgM 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	0.40	0.40	0.47	0.40	0.43	0.48

濾過液

タンパク質	g	957	1007	1038	955	928	731
タンパク質収率 (ビウレット法)	g L ⁻¹	9.0	8.5	8.4	7.7	11.5	12.4
IgG 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	5.7	5.62	5.45	5.02	6.06	6.38
IgA 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	1.03	0.88	0.96	0.90	1.01	1.10
IgM 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	0.32	0.39	0.37	0.27	0.43	0.48

濾過ケーキ抽出

IgG 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	-	-	-	0.07	0.07	0.07
----------------	-------------------	---	---	---	------	------	------

Ppt G上清

タンパク質	g	196	130	188	187	168	109
タンパク質収率 (ビウレット法)	g L ⁻¹	1.8	1.1	1.5	1.5	1.4	1.3
IgG 収率 (ELISA)	g L ⁻¹	0.05	0.02	0.03	0.05	0.03	0.04

【 0 2 2 0 】

表 1 2 に見られるように、両抽出手順では同様の I g G 回収であった。p H 5 . 0 での I I + I I I ペーストの抽出によって様々な不純物が最小化された実施例 3 から 1 0 の結果を考えると、表 1 2 に与えられた結果は、抽出緩衝液 1 0 0 0 L あたり 6 0 0 g の氷酢酸を用いた p H 4 . 8 ~ 4 . 9 での抽出が低 p H での抽出とその後の p H 4 . 8 ~ 5 . 0

【 0 2 2 1 】

実施例 1 2

製造の間、加圧濾過器の枠や、タンクへおよびタンクから結合している導管はかなりの空隙ボリュームを持っており、後洗浄が開始される前には懸濁液または濾過液でまだ満たされている。後洗浄が終了すると、この空隙ボリュームは加圧濾過器内に残ったままになる。標準手順は加圧濾過器の 1 と 2 デッドボリュームの間で洗浄することによって、この空隙ボリュームを占有する。標準的なフィルターの後洗浄が全 I g G の効率的な回収に効果があるかどうか確認するために、大規模製造の I g G 精製における様々な量の洗浄緩衝液を用いた実験を行った。図 1 に、残存する I g G および全タンパク質のレベルについて、後洗浄容量（デッドまたは空隙ボリュームとして測定された）の依存性を示す。

【 0 2 2 2 】

特に、図 1 に見られるように、加圧濾過器のデッドボリュームの約 2 倍量を用いた濾過後洗浄は I g G 回収がかなり減少する結果となり、洗浄液 1 L あたり 1 . 5 g の I g G を含んでいる。驚くべきことに、I g G の効率的な回収には、加圧濾過器のデッドボリュームの 3 . 6 倍量の後洗浄緩衝液が必要となる（図 1 に矢印で表示した）。加圧濾過器のデッドボリュームの 3 . 6 倍量を超えるさらなる後洗浄は得策ではなく、追加の I g G 回収なしの濾過液の希釈につながる。

【 0 2 2 3 】

実施例 1 3

10

20

30

40

50

II + III 沈殿工程の間、アルコール濃度は20から25%に上げられ、温度は-5から-7に下げられた。II + III ペーストを溶解する際、以前は510 mL 氷酢酸 / 1000 L 緩衝液の比で用いたのに対し、II + III ペースト再懸濁緩衝液のpHを調整するために少なくとも1000 L 容量あたり600 mL の氷酢酸を使用した。その抽出比は酢酸緩衝液を用いて1 + 15であった。清澄化には、II + III ペースト1 gあたり0.04 ~ 0.06 g のアエロジル（通常この範囲で一番低い、例えば0.04 g）が添加された。後洗浄には、加圧濾過器のデッドボリユームの約4倍量（4×）の後洗浄緩衝液を用いた。例えば、ある特定の試験ではデッドボリユームの4.3倍量が用いられた一方、別の試験ではデッドボリユームの3.6倍量が用いられた。4倍またはそれ以上のデッドボリユームでの後洗浄は以前に使用されていた1.8倍量のデッドボリユームから増やされた。その緩衝液は1000 L 緩衝液あたり150 mL の氷酢酸を用いて調整され、以前の120 mL 氷酢酸 / 1000 L 緩衝液から増加している。これらの変化は8%のIgG収率向上および少なくとも純度86%のグロブリンをもたらした。0.1 M リン酸ナトリウム + 150 mM 塩化ナトリウム（pH 7.4、伝導率25.5 mS / cm）抽出時には、濾過ケーキ抽出物中に極低量のIgGが見られた。

【0224】

実施例14

A. 分画Iの最適化：スプレー法対変量的（fluent-wise）添加によるエタノール添加；エタノール添加後のpH 7.0または7.5へのpHの調整

表13は現在使用している製造方法によるIgG収率を示しており、後述する実験における比較の参考を提供する。15 ~ 20%のIgGがコーンプールから濾過液にかけて失われる。II + III 上清において、血漿1 Lあたり約0.4 gのIgGが失われる。

【0225】

（表13）

画分	IgG 収率 (2009)					
	g/L 血漿			コーンプールの%		
	LA B1 (原料)	ウィーン (原料)	LA B5 (回収)	L.A. (原料)	ウィーン (原料)	L.A. (回収)
コーンプール	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	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 沈殿物 (算出)	5.77	5.87	7.12	93.4	93.8	95.1
II+III 濾過液	4.93 (4.21-5.57)	5.19 (4.11-5.48)	6.43 (6.11-7.02)	80	83	86

* LA B5 回収血漿コーンプール：saline chaseによる低IgG濃度、平均LA B1 回収血漿コーンプール：8.52 g / L.

【0226】

方法

14リットルのバケツ中、24 ~ 27で6 ~ 7時間、コーンプールをとかした。その後、材料を2 ~ 8で一晩混ぜ合わせた。プールをその後4つのパートに分けた（それぞれ800 g）。

- 1：変量的エタノール添加、続いて7.0にpH調整
 2：変量的エタノール添加、続いて7.5にpH調整
 3：スプレー法によるエタノール添加、続いて7.0にpH調整
 4：スプレー法によるエタノール添加、続いて7.5にpH調整

【0227】

まず、全てのパートを0℃に冷却した。その後、8%エタノールをパート1およびパート2に変量的に加え、パート3およびパート4にスプレーヘッドを用いてスプレー法により加えた。いずれの方法においてもエタノールはほぼ同じ速度で加えた。エタノール添加中、クライオスタートを-5℃に調整し、75mlのエタノールをそれぞれのパートにかき混ぜながら加えた。pHを1M酢酸により7.0または7.5に調整した。その後、溶液を1時間インキュベートした。インキュベーション後、溶液をビーカー遠心分離機で遠心分離した(4600rpm、30分間、-2℃)。

【0228】

結果

IgG収率を比濁分析法で測定し、その結果を表14に示す。従来のエタノール添加では0.2~0.25g/L血漿が失われた一方で、改良された方法(エタノールスプレー法)では、分画I上清においてほぼ100%のIgG収率が得られた。これらの結果は、製造において、改良された方法がIgG収率を0.2g/L血漿まで上昇させることを示している。

【0229】

(表14)

サンプル	重量 (g)	IgG 比濁分析法 (3回の平均)				
		mg/ml	g	%	純度 (%)	g/L 血漿
脱クリオ 血漿	800	5.72	4.57	100.00	12.2	5.72
上清 1	856	5.10	4.37	95.57	12.6	5.46
上清 2	853	5.16	4.41	96.36	12.7	5.51
上清 3	853	5.36	4.58	100.14	13.1	5.72
上清 4	848	5.33	4.52	98.90	13.0	5.65

【0230】

B.パイロットスケール：分画I(スプレー法対変量的；エタノール添加後7.4にpH調整)および分画II+III(エタノール添加前6.7にpH調整、エタノール添加後6.9に再調整)

【0231】

実施例15

方法

2℃でかき混ぜながら、2.8kgの血漿をといた。フラクションI：8%エタノールを加え、5M酢酸を用いてpHを7.4に調整した。かき混ぜながら、懸濁液を-2℃の温度まで冷却した。スプレーの条件はスプレーヘッドを用いることで得られた。いずれの方法においても、エタノールおよび5M酢酸の添加はほぼ同じ速度で行った。1時間のインキュベーション後、溶液を-4℃の温度でCEPA遠心分離機を用いて遠心分離した。

。

【 0 2 3 2 】

フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ：pH 4 緩衝液を用いて pH を 6 . 7 に調整し、従来行っていたように (1) スプレー法または (2) 変量的に 2 5 % エタノールを添加した。その後、pH を 6 . 9 に再調整した。 - 7 で 1 0 時間インキュベーションを行った。

【 0 2 3 3 】

結果

2 5 % エタノールを用いたフラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠでの I g G 減少を比濁分析法で測定し、その結果を表 1 5 に示す。I g G 測定にはある程度の変動があるため、最適な方法での平均値を取り上げた。

【 0 2 3 4 】

(表 1 5)

	IgG 損失画分Ⅰ	画分Ⅱ+Ⅲ上清, 25%エタノール の添加	濾過液中のIgG
実験	1 L 血漿あたりのg	1 L 血漿あたりのg	コーンプールの%
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	0.29	0.06	91.16
参考(エタノール 添加変量的に)	0.29	0.10	87.38

【 0 2 3 5 】

フラクションⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿物に至るまで、1 L の血漿あたり 0 . 3 5 g の I g G し
か失わなかった。変量的 2 5 % エタノール添加と比べて、スプレー法を用いた分画ⅠⅠ +
ⅠⅠⅠにおいて 1 L の血漿あたり 0 . 0 4 g の I g G の収率増加が得られ、現在製造に使
用している変量的 2 0 % エタノール添加と比べて、1 L の血漿あたり 0 . 3 g の I g G の
収率増加が得られた (0 . 4 から 0 . 0 6 g / L の範囲から平均化) 。濾過液中の I g G
収率は参考に比べて著しく高く、ⅠⅠ + ⅠⅠⅠ沈殿における変量的 2 0 % エタノール添加
での製造において現在得られている 8 0 ~ 8 6 % をはるかに超えている。

【 0 2 3 6 】

C . 分画ⅠⅠ + ⅠⅠⅠ (2 0 % エタノール) : 分画ⅠⅠ + ⅠⅠⅠ全体にわたって初期の p
H を維持

【 0 2 3 7 】

実施例 1 6

方法

1 7 ~ 2 0 で 2 7 時間かき混ぜながら、5 0 L の血漿をとかした。分画Ⅰは上のセク
ションで述べたように最適な工程として行った。上清Ⅰは以下の 2 つのパートに分けた。
(1) 最悪な pH 調整：インキュベーション期間ではなくエタノール添加前後の pH 調整
(2) 最適な pH 調整：エタノール添加前後の pH 調整およびさらに待機時間における p
H 再調整。待機時間中は溶液を絶えず攪拌した。

【 0 2 3 8 】

Ⅰの上清の pH は、どちらのパートにおいても、エタノール添加前に pH 4 緩衝液を用
い 6 . 7 に調整した。エタノールはスプレー法で添加し、エタノール添加後に pH を 6 .

9 に再調整した。

【 0 2 3 9 】

パート (1) において、最悪の事態を想定することなく pH 調整を行った。エタノール添加後に、溶液の pH を直接調整し、インキュベーション期間は調整しなかった。パート (2) において、pH を 10 時間のインキュベーション期間に一定値 6 . 8 ~ 7 . 0 となるように再調整した。

【 0 2 4 0 】

結果

I g G を再び比濁分析法で測定し、その結果を表 1 6 に示す。待機時間中に約 6 . 9 の一定値へ pH を一定に再調整することにより、大規模製造における平均である 0 . 4 g / L 血漿と比較して、血漿 1 L あたり 0 . 1 3 g の I g G しか失われなかった。参考 (スプレー法は用いず、待機時間中絶えず攪拌) と比べて、血漿 1 L あたり 0 . 0 7 g の I g G の収率増加を得た。現在使用されている従来法 (1 L 血漿あたり 0 . 3 8 g の I g G 減少、表 1 3) と比べて、血漿 1 L あたり約 0 . 2 0 g から約 0 . 3 0 g への I g G の収率増加を得た。

【 0 2 4 1 】

(表 1 6)

	サンプル	量	比濁分析法で測定した IgG	
		kg	収率 (%)	g/L 血漿
プール	血漿	45.20	100.00	4.90
画分 I	上清 I	68.66	102.61	5.03
最適 pH 調整	上清 II+III	53.09	0.26	0.13
参考	上清 II+III	52.69	0.41	0.20

【 0 2 4 2 】

結論

I I + I I I 上清における I g G 減少は、製造バッチにおける 0 . 4 g I g G / L 血漿の現在のレベルから 20 % エタノールによる沈殿での 0 . 1 3 g / L 血漿のレベルへ、およびエタノールをスプレー法で添加し沈殿の間 pH が持続して 6 . 9 ± 0 . 1 に維持されている場合、25 % エタノールによる沈殿での 0 . 0 8 g / L 血漿未満のレベルへ減少する。

【 0 2 4 3 】

沈殿 I で、スプレー法による pH 調整前のエタノール添加は分画 I 上清中における 0 . 1 から 0 . 2 g / L 血漿の I g G 収率増加をもたらす。

【 0 2 4 4 】

考察

I g G は全ての実験で比濁分析法にて測定し、少なくとも - / + 5 . 0 % の分散を有する (ネフェロメーター製造業者によって示された、ジーマンス A G) 。それゆえ、製造において改良された方法で得られる実際の収率増加は、実施例中に示したものよりわずかに低い、または高いものとなるだろう。

【 0 2 4 5 】

新しく改良された方法による収率増加のさらなる裏づけとして、沈殿物 I g G 重量を、製造における同じ血漿ソースから得られた平均の沈殿物 I g G 重量と比較した。製造において現在用いる方法により、1000 L の U S ソースコーンプールあたり 18 k g の沈殿

物 I g G が得られたのに対し、パイロットスケール研究（上述のセクション B）では、20.8 kg の沈殿物 I g G が得られた（20 % エタノールおよび分画 I I + I I I の最適化された pH 調整、全ての緩衝液とエタノールのスプレー法による添加）。これが 1000 L のコーンプールあたり 2 kg 以上の沈殿物 I g G の増加となる。

【0246】

実施例 17

この実施例では、フラクション I I + I I I 懸濁物の濾過前のフュームドシリカ処理工程の追加が、より高い純度の I g G 濾過液をもたらすことを明らかにする。簡単に言うと、脱クリオ血漿は上述の方法でフラクション I I + I I I 段階に分画化され、その時点で2つのサンプルに分けられた。第1のサンプルは標準フラクション I I + I I I 懸濁液濾過前に、濾過助剤の添加によってのみ清澄化される（図7A）。第2のサンプルは、ここに記述したように、濾過助剤の添加および標準フラクション I I + I I I 懸濁液濾過前にフュームドシリカ前処理を受けた（図7B）。

【0247】

濾過液のタンパク質成分は、酢酸セルロース電気泳動によりその後分離され、個々のピーク面積が標準法を用いて計算された。クロマトグラフおよび定量されたデータに見られるように、濾過前にフュームドシリカを用いて処理した第2のサンプルは、フュームドシリカで処理していないサンプルよりも非常に高い I g G 純度を有する濾過液となった（68.8 % 対 55.7 % グロブリン；表18と表16を比較のこと）。

【0248】

（表17）図7Aに示した、濾過前に濾過助剤のみの添加によって清澄化された画分 I I + I I I 懸濁液由来の酢酸セルロース電気泳動により分離されたタンパク質ピークの定量

左から右への ピーク番号	面積 (%)	画分
1	55,7	γ -グロブリン
2	3,2	変性タンパク質
3	3,7	γ -グロブリン
4	25,5	α/β -グロブリン
5	11,9	アルブミン

【0249】

（表18）図7Bに示した、フュームドシリカを用いた前処理および濾過前に濾過助剤の添加によって清澄化されたフラクション I I + I I I 懸濁液由来の酢酸セルロース電気泳動により分離されたタンパク質ピークの定量

左から右への ピーク番号	面積 (%)	画分
1	68.8	γ -グロブリン
2	18.9	α/β -グロブリン
3	12.3	アルブミン

【0250】

実施例 18

本実施例では、限外濾過および20% IgG調製の処方が皮下注射に適していることを示す。この情報は生産スケールアップおよび非臨床の20% IgG調製の間に蓄積された。ナノ濾過工程前の20% ロットの製造に用いるプロセスは上述のとおりであった。限外/透析濾過は溶液を20%に濃縮するよう改良された。収率減少を最小にするため、透析濾過に用いる限外濾過装置の後洗浄液は、同じ膜を備えた第2のより小さな装置によって濃縮され、その後バルク溶液に加えられた。

【0251】

驚くべきことに、低いpHでの保管の間のウイルス不活性化は溶液のタンパク質濃度による影響を受けないことが示された。同様のウイルス減少が10%溶液(GAMMAGARD(登録商標)LIQUID)および20%溶液でも得られた。それゆえ、ウイルス減少工程としての低pHでの保管は20%生成物において維持された。

10

【0252】

ナノ濾過の前に、IgG溶液のグリシン濃度は目標の0.25Mに調整される。その後、その溶液を限外濾過(UF)でタンパク質濃度 $6 \pm 2\%$ (重量/体積)に濃縮する。pHは 5.2 ± 0.2 に調整する。使用したUF膜は公称分画分子量(NMWC0)が50,000ダルトン以下であり、高粘性の生成物のために特別に設計されている(例えば、ミリポアのVスクリーン)。

【0253】

その後、その濃縮物をpH 4.2 ± 0.2 の0.25Mグリシン溶液に対して透析濾過する。最小交換容量は元の濃縮物容量の10倍である。限外濾過/透析濾過操作の間、溶液は約4 ~ 20の間に保たれる。

20

【0254】

透析濾過後、その溶液は少なくともタンパク質濃度22%(重量/体積)にまで濃縮される。その溶液の温度は2 ~ 8に調整される。

【0255】

システム中の完全な残存タンパク質を回収するために、第1のより大きな限外濾過システムの後洗浄が、全てのタンパクが洗い落とされることを保証するために少なくとも再循環モードにおける2倍のデッドボリュームで行われる。それから、第1の限外濾過システムの後洗浄液は、第1のものの10分の1もしくはそれ未満の寸法の同じタイプの膜を備える第2の限外/透析濾過システムで、少なくともタンパク質濃度22%(重量/体積)まで濃縮される。後洗浄液の濃縮物はバルク溶液に加えられる。第2の限外濾過システムはその後、後洗浄される。この後洗浄液は、最終処方のタンパク質濃度の調整に用いられる。その溶液の温度は約2 ~ 8に維持される。

30

【0256】

最終溶液を製剤化するために、そのタンパク質濃度は、第2のより小さな限外濾過システムの後洗浄液および/または透析濾過緩衝液を用いて、約 $20.4 \pm 0.4\%$ (重量/体積)に調整される。必要であれば、pHは約4.4 ~ 4.9に調整される。

【0257】

実施例19

現在のGAMMAGARD(登録商標)LIQUID製造プロセスにおけるフラクションII+IIIの濾過液中に回収されたIgGの画分を比較するために、ここに提供する改良されたフラクションII+III沈殿と溶解法を用いて、IgGの5つの製造スケール精製を行った。簡単に言うと、-7でfluent添加によって合わせられた25%エタノールを用い、現在の製造プロセスで採用されている-5および20%エタノールと比較して、IgG初期濃度約 6.14 g/L であるIgGのコーンブル沈殿を行った。改変フラクションII+III沈殿物はそれから、pH4.3の溶解緩衝液または0.06%氷酢酸を用いて調整された緩衝液を用いて1~15を抽出し、その後溶解緩衝液の4.3倍のフィルターデッドボリュームの最終洗浄液を用いて深層フィルターを通して濾過した。表18に見られるように、ここに提供する改良された方法による改変フラクションII+III濾過液は、現在の製造プロセスにより調製された改変フラクションII+I

40

50

ⅠⅠ濾過液よりも、初期のコーンプール中に存在するⅠgGを顕著に高い割合（少なくとも8.0%の増加）で含んでいた（それぞれ、91.1%対91.6%、83.1%対83.8%）。

【0258】

（表18）ここに提供する改良された方法により製造されたロットにおけるⅠgG回収と比較した、2008年および2009年の一部の間にウィーンにて行われたバクスターの全ての製造稼働のフラクションⅠⅠ+ⅠⅠⅠ濾過液におけるⅠgGの平均回収

プロセス	ウィーンでの製造		研究開発スケールアップ ^{***}	
	現在	2008		
コーンプールのIgG (g/L)	6.26	6.31	6.14	6.13
Ⅱ+Ⅲ沈殿物でのアルコール(%)	20	20	25	25
酢酸 mL/溶解緩衝液 1000L	510	510	pH4.3で溶解； 濾過前に4.9へ シフト	600
アエロジル (g/gペースト)	0.045	0.04	0.04	0.04
加圧濾過器の デッドボリュームでの後洗浄	1.8	1.8	4.3	4.3
濾過液中の平均IgG (コーンプールの%)	83.1% 57ロット	83.8% 200ロット	91.1% 3ロット	91.6% 2ロット
濾過液に追加のIgG	データなし	データなし	+ 8.0%	+ 8.5%

【0259】

実施例20

ここに提供するⅠgG組成物の純度を求めるために、ⅠgGの3つのロットをここに提供する改良された方法により調製した。これらの精製の最終ⅠgG生成物は、最終組成物におけるⅠgG単量体/二量体の割合を求めるとともに、ⅠgA、ⅠgM、アミド分解活性、C3およびフィブリノーゲンを含むいくつかの混入物質について検査された。表19の下部に見られるように、ここに提供する改良された方法の製造により、初期物質の73.6%~78.5%と、現在採用されている方法における60%~70%と比較して、最終バルク組成物におけるⅠgG回収の増加をもたらす一方、不純物プロファイルが現在のⅠgG製造基準とはいわないまでも同じくらい良く維持された。

【0260】

（表19）ここに提供する改良された製造方法により調製されたⅠgG組成物中の不純物およびⅠgG単量体/二量体組成物のレベル

オプション	1	3	6
実験# (P0..10NG2)	19	20	21
ANXフロースルーでのタンパク質収率 [g/L血漿]	4.35	4.35	4.38
IgG回収: コーン出発物質からバルクへ [%]	73.6	78.5	78.5
最終バルクの特性			
IgA [$\mu\text{g/mL}$ @ 10% タンパク質]	29	26	未決
IgM [$\mu\text{g/mL}$ @ 10% タンパク質]	1.1	1.1	未決
アミド分解活性 [PL-1 nmol/mL min]	未決	<10	<10
MSD 単量体/二量体 [%]	99.7	99.9	99.7
C3 [$\mu\text{g/mL}$ @ 10% タンパク質]	未決	未決	未決
フィブリノーゲン [$\mu\text{g/mL}$ @ 10% タンパク質]	<0.2	未決	未決

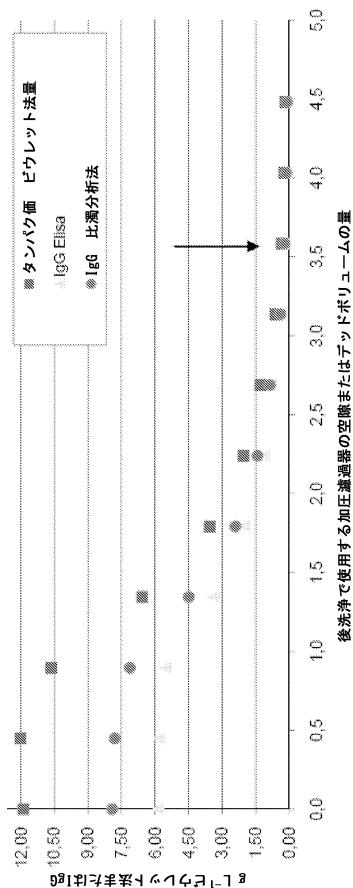
10

【 0 2 6 1 】

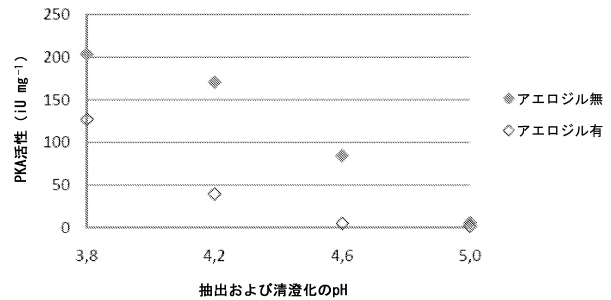
本明細書に記載される実施例および実施形態は、単に説明目的のためのものであり、それらに照らし合わせて様々な修正または変更が、当業者に暗示されることになり、本出願の趣旨および権限ならびに付属の請求項の範囲内に含まれるべきであると理解される。本明細書で引用される全ての公報、特許、および特許出願は、全ての目的のために、参考としてそのまま本明細書に組み込まれている。

20

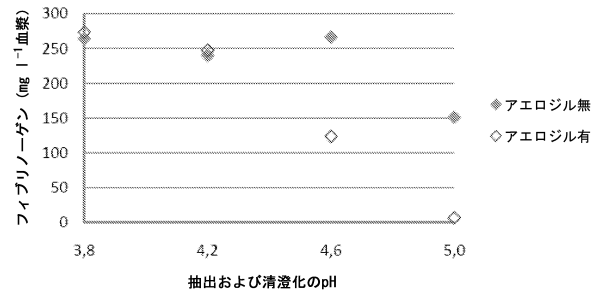
【 図 1 】



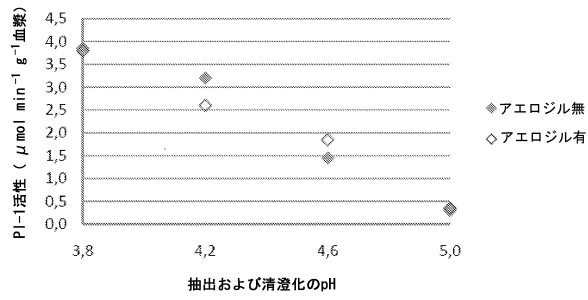
【 図 2 】



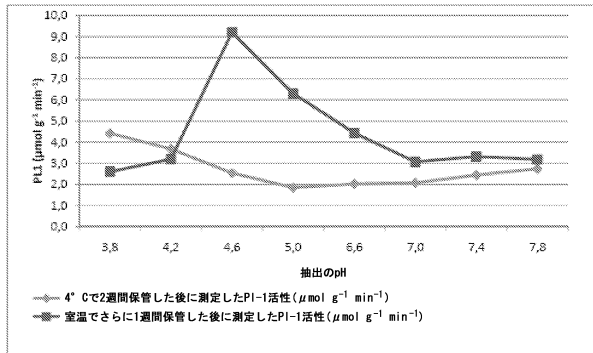
【 図 3 】



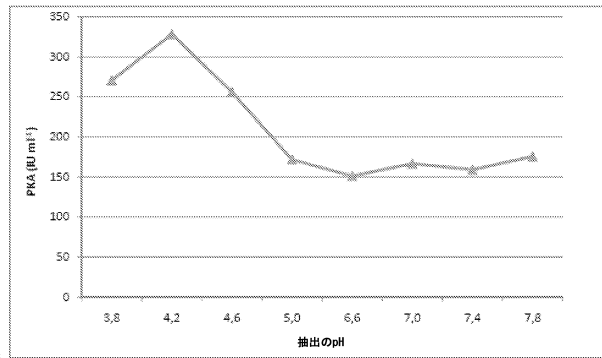
【図 4】



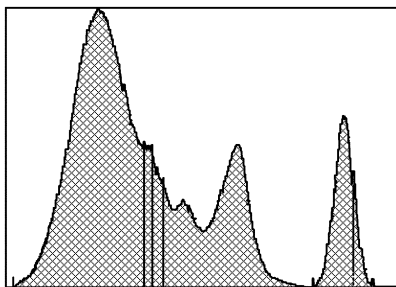
【図 5】



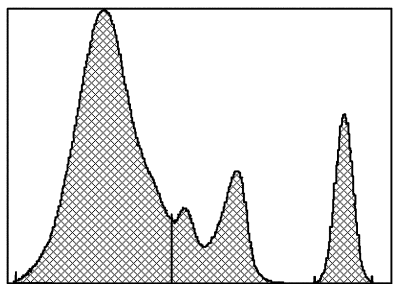
【図 6】



【図 7】

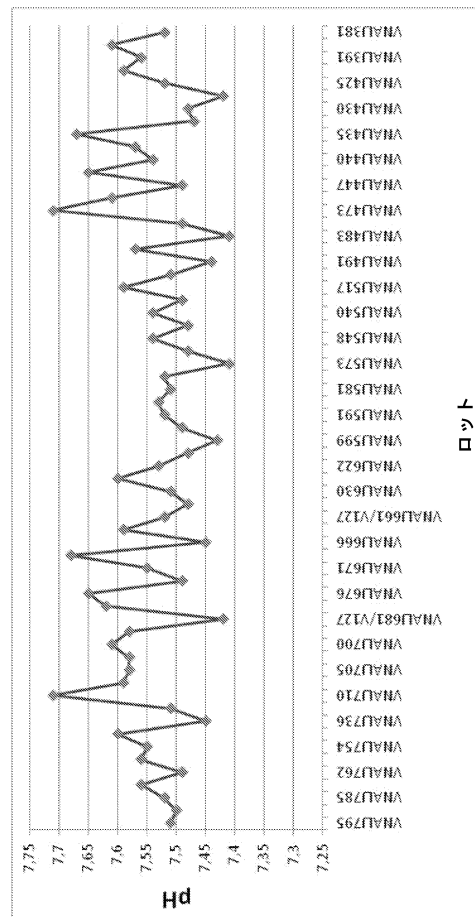


A

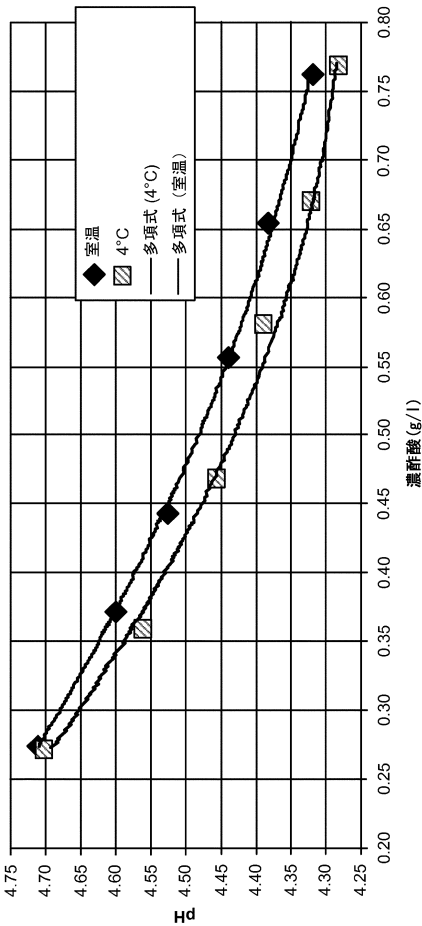


B

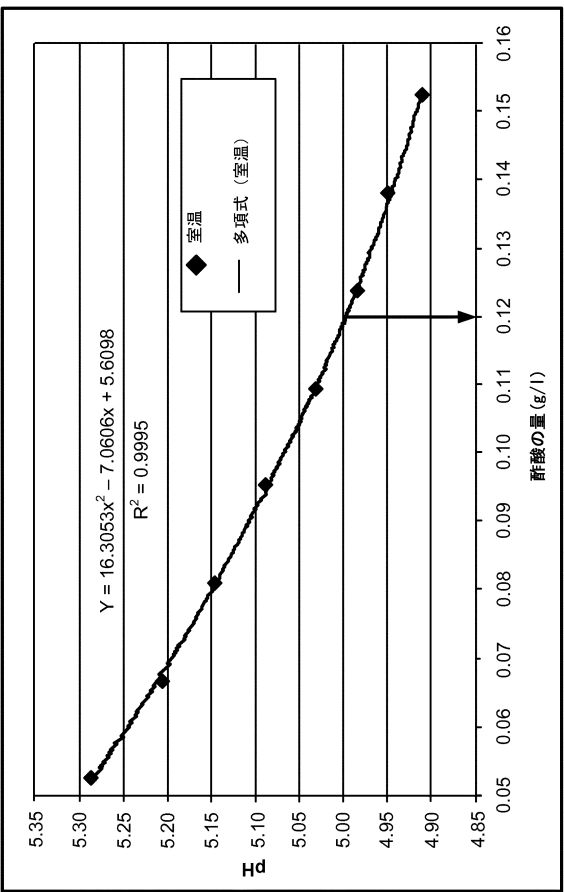
【図 8】



【図 9】



【図 10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 31/00 (2006.01) A 6 1 P 31/00
 A 6 1 K 35/16 (2015.01) A 6 1 K 35/16

(74)代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 ブルックシュヴァイガー レオポルト
 オーストリア共和国 ウィーン ヘルミネンガッセ 5 / 1 4
 (72)発明者 スヴァトシュ ソニヤ
 オーストリア共和国 ベルク カベレンガッセ 4 2
 (72)発明者 ニュルンベルガー ジュリア
 オーストリア共和国 ウィーン ドナウフェルダーシュトラッセ 5 2 / 4 5
 (72)発明者 テシュナー ヴォルフガング
 オーストリア共和国 ウィーン ゲシュテッテンガッセ 1 9 / 1 4
 (72)発明者 バターベック ハラルド アーノ
 オーストリア共和国 ウィーン テレフォンウェグ 3 / 4 / 1
 (72)発明者 シュバルツ ハンス ベーター
 オーストリア共和国 ウィーン ワイマーラー シュトラッセ 7 6
 (72)発明者 グンディンガー トマス
 オーストリア共和国 ウィーン パラヴィツカガッセ 4 / 1 1
 (72)発明者 ケールブル ベルンハルト
 オーストリア共和国 アハウ ヒンタウスシュトラッセ 2 0 / 5
 (72)発明者 グラウセンブルガー ラインハルト
 オーストリア共和国 ウィーン ディートリッヒガッセ 6 3 / 1 8 / 1 2
 (72)発明者 プリエブリャコビッチ アズラ
 オーストリア共和国 ウィーン オッタークリンガーシュトラッセ 9 4 / 2 2

審査官 長岡 真

(56)参考文献 J.M.Curling, Methods of plasma protein fractionation, 1980年, p.12,13,248,249
 J.L.Oncley et al., J.Am.Chem., 1949年, vol.71, p.541-550
 E.J.Cohn et al., J.Am.Chem., 1946年, vol.68, p.459-475

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 P 3 1 / 0 0
A 6 1 P 3 7 / 0 2
A 6 1 P 3 7 / 0 4
C 0 7 K 1 / 1 4
A 6 1 K 3 5 / 1 6

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)