

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-222674

(P2016-222674A)

(43) 公開日 平成28年12月28日(2016.12.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	D 4H045
A61P 37/02 (2006.01)	A61P 37/02	
A61P 31/04 (2006.01)	A61P 31/04	
G01N 33/53 (2006.01)	A61K 39/395	W

審査請求 有 請求項の数 22 O L (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-118887 (P2016-118887)	(71) 出願人	390035378
(22) 出願日	平成28年6月15日 (2016.6.15)		バイオテスト・アクチエンゲゼルシャフト
(62) 分割の表示	特願2013-511592 (P2013-511592) の分割		ドイツ連邦共和国、ドライアイヒ、ラント シュタイネル ストラーセ、5
原出願日	平成23年4月21日 (2011.4.21)	(74) 代理人	100107515
(31) 優先権主張番号	1006753.6		弁理士 廣田 浩一
(32) 優先日	平成22年4月22日 (2010.4.22)	(74) 代理人	100107733
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 流 良広
		(74) 代理人	100115347
			弁理士 松田 奈緒子
		(72) 発明者	ヴォルフガング・メーラー
			ドイツ連邦共和国 61440 オーバー ウルゼル グラーフ-フォン-シュタウフ エンベルク-シュトラーセ 32

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体調製物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 特異的な補体活性化活性を有するが非特異的な補体活性化能が低い I g M を含む抗体 (免疫グロブリン) 調製物の提供。

【解決手段】 ヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物であって、I g G と、I g A と、抗体の総量の少なくとも 5 重量% の I g M 抗体とを含み、ヒト血漿から調製され、特異的な補体活性化活性を有すると共に、非特異的な補体活性化能の測定に適したヒト血清を用いるインビトロアッセイにおいて、C 5 a 及び C 3 a の少なくともいずれかを実質的に産生しない抗体調製物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物であって、I g G と、I g A と、抗体の総量の少なくとも 5 重量 % の I g M とを含み、ヒト血漿から調製され、特異的な補体活性化活性を有すると共に、非特異的な補体活性化能の測定に適したヒト血清を用いるインビトロアッセイにおいて、C 5 a 及び C 3 a の少なくともいずれかを実質的に産生しない抗体調製物。

【請求項 2】

抗体の総量の 5 重量 % 超の I g A、及び抗体の総量の 40 重量 % 超の I g G を更に含む請求項 1 に記載の抗体調製物。

10

【請求項 3】

抗体の総量の少なくとも 10 重量 % の I g M を含む請求項 1 から 2 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 4】

抗体の総量の少なくとも 15 重量 % の I g M を含む請求項 3 に記載の抗体調製物。

【請求項 5】

1.72 mg / mL の I g M 濃度に調整された抗体調製物が、アッセイの 60 分間後に産生する C 5 a が 200 ng / mL 未満である請求項 1 から 4 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 6】

1.72 mg / mL の I g M 濃度に調整された抗体調製物が、アッセイの 60 分間後に産生する C 3 a が 6,000 ng / mL 未満である請求項 1 から 5 のいずれかに記載の抗体調製物。

20

【請求項 7】

インビトロ血清アッセイにおいて、ヒト血清を含む抗体調製物が、ヒト血清単独の場合の ± 70 % と同量の C 5 a 及び C 3 a の少なくともいずれかを産生する請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 8】

抗体調製物が C 5 a を実質的に産生しないことを判定するインビトロ血清アッセイが、次の工程：

30

(a) 抗体調製物を 100 μ L のヒト血清に添加して 1.72 mg / mL の I g M を含有する反応混合物を調製し、該反応混合物を 37 で 60 分間、定速攪拌下にてインキュベートする工程；

(b) E L I S A に適した前記反応混合物の希釈系列を調製する工程；

(c) C 5 a に対する一次抗体及び二次抗体並びに発色性物質を用いて、前記反応混合物の希釈系列に対してサンドイッチ E L I S A を行う工程であって、前記二次抗体は、酵素とコンジュゲートされており、前記発色性物質は、前記酵素の基質である工程；

(d) 前記発色性物質を、前記二次抗体を介して C 5 a と結合した前記酵素に接触させた結果生じる色の変化に基づいて前記反応混合物中の C 5 a の量を測定する工程；

を含む請求項 1 から 7 のいずれかに記載の抗体調製物。

40

【請求項 9】

抗体調製物が C 3 a を実質的に産生しないことを判定するインビトロ血清アッセイが、次の工程：

(a) 抗体調製物を 100 μ L のヒト血清に添加して 1.72 mg / mL の I g M を含有する反応混合物を調製し、該反応混合物を 37 で 60 分間、定速攪拌下にてインキュベートする工程；

(b) E L I S A に適した前記反応混合物の希釈系列を調製する工程；

(c) C 3 a に対する一次抗体及び二次抗体並びに発色性物質を用いて、前記反応混合物の希釈系列に対してサンドイッチ E L I S A を行う工程であって、前記二次抗体は、酵素とコンジュゲートされており、前記発色性物質は、前記酵素の基質である工程；

50

(d) 前記発色性物質を、前記二次抗体を介してC3aと結合した前記酵素に接触させた結果生じる色の変化に基づいて前記反応混合物中のC3aの量を測定する工程；
を含む請求項1から8のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項10】

1,200kDa以上の凝集体の含有量が2%未満である請求項1から9のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項11】

1,200kDa以上の凝集体の含有量が1.5%未満である請求項10に記載の抗体調製物。

【請求項12】

抗補体活性が1.0CH50/mgタンパク質未満である請求項1から11のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項13】

抗補体活性が0.75CH50/mgタンパク質未満である請求項12に記載の抗体調製物。

【請求項14】

免疫グロブリン含量が、総タンパク質含量の95%超である請求項1から13のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項15】

10分間超の40℃以上での熱処理工程を行うことなしに、ヒト血清から調製される請求項1から14のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項16】

抗体の化学的又は酵素的修飾を伴う工程を行うことなしに、ヒト血清から調製される請求項1から15のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項17】

化学的修飾の工程が、抗体をβ-プロピオラクトンに接触させる工程である請求項16に記載の抗体調製物。

【請求項18】

非エンベロープウイルスを3log₁₀超除去可能なプロセスで調製される請求項1から17のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項19】

(a) ヒト血漿から血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として調製する工程；
(b) C₇～C₉カルボン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；
(c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る工程；
(d) 前記IgM含有免疫グロブリン組成物を、pH3.5～pH4.5の範囲でインキュベートしてインキュベート溶液を得る工程；
(e) 前記インキュベート溶液にUVCを照射してUVC照射溶液を得る工程；及び
(f) 前記UVC照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得る工程；
を含むプロセスによってヒト血漿から調製される請求項1から18のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項20】

プロセスが、工程(d)で得られたインキュベート溶液を、工程(e)における照射の前にナノ濾過に付すことを更に含む請求項19に記載の抗体調製物。

【請求項21】

投与前のレベルから10%超の動脈圧の低下を伴うことなしに、カニクイザルに115mgIgM/kgBW/hrで投与することが可能である請求項1から20のいずれかに記載の抗体調製物。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

調製物中の抗体の少なくとも 90% が生物学的に活性である請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 2 3】

Fc 機能の測定に適した風疹抗原を用いるインビトロアッセイにおいて、抗体調製物の抗体の Fc 部分の活性が生物学的レファレンス調製物の活性の $\pm 10\%$ と同等である請求項 1 から 2 2 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 2 4】

請求項 1 から 2 3 のいずれかに記載の抗体調製物をヒト血漿から調製する方法であって、

- (a) ヒト血漿から血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として調製する工程；
 - (b) C₇ ~ C₉ カルボン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；
 - (c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離して IgM 含有免疫グロブリン組成物を得る工程；
 - (d) 前記 IgM 含有免疫グロブリン組成物を、pH 3.5 ~ pH 4.5 の範囲でインキュベートしてインキュベート溶液を得る工程；
 - (e) 前記インキュベート溶液に UVC を照射して UVC 照射溶液を得る工程；及び
 - (f) 前記 UVC 照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得る工程；
- を含む方法。

10

20

【請求項 2 5】

医薬において使用するための請求項 1 から 2 3 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 2 6】

免疫障害又は細菌感染症の治療において使用するための請求項 2 5 に記載の抗体調製物。

【請求項 2 7】

免疫障害が IgM 欠乏症である請求項 2 6 に記載の抗体調製物。

【請求項 2 8】

免疫障害又は細菌感染症の治療のための薬剤を製造するための請求項 1 から 2 3 のいずれかに記載の抗体調製物の使用。

30

【請求項 2 9】

請求項 1 から 2 3 のいずれかに記載の抗体調製物を投与することを含む患者の治療方法。

【請求項 3 0】

患者が免疫障害又は細菌感染症に罹患している請求項 2 9 に記載の治療方法。

【請求項 3 1】

抗体調製物が患者に静脈内投与される請求項 2 9 から 3 0 のいずれかに記載の治療方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特異的な補体活性化活性を有するが非特異的な補体活性化能が低い IgM を含む抗体（免疫グロブリン）調製物に関する。本発明はまた、前記抗体調製物の医薬における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト血漿から調製され、静脈内投与に適する免疫グロブリン組成物は、当技術分野において知られており、数十年間に亘って広範な疾患の治療において重要な役割を果たしてきた。免疫グロブリンは、例えば、ヒトの感染症の治療に用いられ、様々な生化学的及び生

50

理学的性質に基づいて様々なクラスに分類することができる。免疫グロブリンGは、ウイルス抗原に対する防御に関与し、一方、I g Mは、抗細菌及び抗毒素免疫反応において主たる活性を有する。

【0003】

免疫グロブリン溶液は、様々な割合のI g G、I g A、及びI g Mを含み、これらの割合が異なる調製物は、その治療適応も異なる。例えば、高割合のI g Mを含む調製物は、細菌感染症の予防又は治療に用いられる。

【0004】

免疫グロブリン溶液は、通常、血漿又は血清の画分、例えば、C o h n画分から調製される。次いで、これら画分は、多数の精製工程に付されて、ウイルス、変性タンパク質、
10
プロテアーゼ、及び脂質等の混入物が除去される。

【0005】

分画するためのヒト血漿は、数千人のドナーから回収されるので、元血漿を徹底的に試験しているにも関わらず、病原ウイルスを含有している場合がある。したがって、医療で使用するための安全な製品を得るためには、ウイルスを不活化又は除去するためのプロセス工程が必須である。ウイルスを不活化/除去するための幾つかの技術が、当技術分野において知られている。例えば、化学的処理、U V C光の照射、又はナノ濾過であり、これらは、全体的なウイルス安全性を保証するために実施される。

【0006】

前記プロセス工程のウイルス除去能又は不活化能は、生産プロセスの実験室規模のモデルを用いて検証され、各工程について、除去又は不活化係数が求められる。不活化/除去係数を増加させることにより、更なるウイルス安全性が医薬品に付加される。今日、規制機関による指針では、血漿に由来する医薬品の製造において、エンベロープウイルス及び非エンベロープウイルスに対する少なくとも2つの有効な工程を実施することが必要である。エンベロープウイルスの不活化又は除去には、溶剤/界面活性剤処理、オクタン酸処理、ナノ濾過、及び熱処理等の幾つかの方法が有効であるが、例えば、バルボウイルス等の非エンベロープウイルスを不活化又は除去するための方法は、僅かしか知られていない。これら非エンベロープウイルスは、多くの場合非常に小さく、通常20nm超の孔径のナノフィルタを通過する。この孔径は、30nm以下の直径を有するI g M分子には小さすぎる。非エンベロープウイルスは、
20
- プロピオラクトン等の化学物質により有効に不
30
活化されるが、機能の低下した修飾免疫グロブリンも生じさせる。別の有効な処理は、U V C照射(特許文献1、C A F - D C F)である。しかし、知られた溶剤/界面活性剤処理、オクタン酸処理、及び穏やかな熱処理は、非エンベロープウイルスに対して実質的に効果を有しない。

【0007】

上述したように、潜在的に存在するウイルスに加えて、脂質、プロテアーゼ、タンパク質凝集体、及び変性免疫グロブリン等の他の混入物を除去する必要もある。これらのあらゆる混入物を除去することは、(1)製品が、ウイルスの混入に関する生物学的安全性の指針に準拠することを保証するため、(2)製品が、静脈内投与後患者にとって忍容性を有するようになるため、(3)製品が、長期保存に対し安定であるようになるため(タン
40
パク質分解活性が少しでも残存すると、長期保存期間、例えば2年間に亘る保存期間において製品を分解させる場合がある)、及び(4)望ましい化合物混合物/医薬組成物を得るために、必須である。

【0008】

しかし、同時に、混合物を除去するための精製工程は、できる限り免疫グロブリン分子がその正常な生物学的活性を保持し且つ溶液中に大量に保持されるように、免疫グロブリン分子に干渉しないことが必須である。例えば、U V Cを長時間照射すると、最終免疫グロブリン溶液中で得られるネイティブで活性のあるI g Mの収量が低下する場合があるなど、多くの知られた精製工程は、免疫グロブリンの活性、特にI g Mに対してネガティブな影響を及ぼす場合があるので、このバランスをとることは困難である。これは、最終免
50

疫グロブリン溶液の有効性を低下させるだけでなく、インピボにおける前記溶液の忍容性を低下させる場合もある。

【0009】

特定の精製工程により増加する場合がある凝集体及び変性免疫グロブリンは、特に、患者に対する潜在的なリスクとなる。その理由は、補体を非特異的に活性化する能力が高いため、これら変性免疫グロブリンを投与された患者において重篤な副作用を生じさせるためである。非特異的な補体活性化とは、特定の抗体-抗原複合体が存在しなくても補体カスケードが開始されることを指す。非特異的な補体活性化は、血圧低下、紅潮、頭痛、発熱、悪寒、悪心、嘔吐、筋肉痛、呼吸困難、及び頻拍等の望ましくない副作用を引き起こす場合があるので、厳密に避けるべきことである。他方、特異的な補体活性化は、望ましいものであり、免疫グロブリンが特定の抗原に結合した後で初めて生じる。

10

【0010】

非特異的な補体活性化は、欧州薬局方に記載されている標準化試験により、所謂抗補体活性（ACA）として測定される。

【0011】

病原体の免疫防御における補体系の役割は、よく知られている。補体系は、約20のタンパク質からなり、これらが順次活性化される。古典的補体経路は、通常、その活性化に特定の抗原抗体複合体を必要とし、一方、第二経路は、抗体が存在しなくても抗原により活性化することができる。補体活性化の古典的経路及び第二経路はいずれも、プロテアーゼC3コンベルターゼを生成する。C3コンベルターゼは、C3成分を切断及び活性化してC3a及びC3bを生成し、C5コンベルターゼによるC5a及びC5bの生成という更なる切断及び活性化事象のカスケードを引き起こす。C5bは、膜侵襲経路を開始させ、C5b、C6、C7、C8、及び多量体C9からなる膜侵襲複合体を生じさせる。これは、膜貫通チャネルを形成する補体カスケードの細胞溶解性最終産物であり、細菌等の標的細胞の浸透圧溶解を引き起こす。

20

【0012】

補体活性化は、更に、生物学的活性タンパク質C5aなどのアナフィラトキシンを形成させる。このアナフィラトキシンは、免疫細胞及び炎症性細胞に対して強力な走化作用を有する物質であり、細胞を活性化させ、マスト細胞からヒスタミンを放出させる。補体活性化が過剰であるか若しくは制御されていない及び/又は非特異的である場合、C5aの過剰産生は、患者に有害な作用を引き起こす場合がある。

30

【0013】

C5aは、有効な白血球の化学誘引物質であり、補体活性化部位に白血球、特に好中顆粒球を蓄積させる。C5aは、白血球を活性化し、また、強力な炎症メディエータである。これら機能は、特定の抗体-抗原複合体が反応している間は有益であるが、副作用の可能性があるので、C5aの非特異的生成を全て避けなければならない。

【0014】

IgG調製物とは対照的にIgM抗体が溶液中で容易に凝集するので、非特異的な補体活性化は、IgM免疫グロブリン調製物（即ち、少なくとも5%のIgMを含む調製物）において特に問題である。IgM調製物は、特に、血漿濃度に比べてIgM濃度が富化されており且つ液体溶液で保存される場合、安定化させるのが困難である。IgMは、補体の強力なアクチベータであり、僅か1分子が抗原に結合しただけで補体を活性化させることができることが知られている。これは、補体を活性化させるためには、互いに近接する抗原に2分子以上のIgGが結合しなければならないIgGとは対照的である。

40

【0015】

更に、IgM含有免疫グロブリン調製物により治療される主な適応症は、細菌感染症及び敗血症である。これら疾患患者は、既に低血圧でもあるので、更に望ましくない非特異的な補体活性化及びC5aが生じると、患者の状態は極めて悪化する。したがって、IgM調製物は、静脈内投与用に調製することが困難であると報告されている。

【0016】

50

ヒト血漿から I g M 含有免疫グロブリン調製物を製造するための幾つかの方法が、当技術分野において報告されている。

【0017】

ヒト I g M 溶液の初期における精製は、古典的な C o h n 血漿分画法又はそのよく知られた改良法（例えば、C o h n / O n c l e y、K i s t l e r / N i t s c h m a n n）により実施されている。低温エタノール沈殿プロセスを用いると、I g M 画分は、画分 I I I 又は画分 I / I I I（B 又は B + I と呼ばれる）に回収される。I g M が富化されたタンパク質溶液を精製するために、画分 I I I 又は画分 I / I I I から出発する方法が報告されている。特許文献 2 には、オクタン酸、 γ -プロピオラクトン処理を用いる工程と、陰イオン交換樹脂を用いる吸着工程とを含む画分 I I I から出発する精製方法が記載されている。この方法を用いて P e n t a g l o b i n（登録商標）が製造される。P e n t a g l o b i n は、今日まで、唯一市販されている静脈内投与用 I g M 製品である。 γ -プロピオラクトンは、存在する可能性のあるウイルスを不活化するために殺菌工程で用いられるよく知られた化学物質である。 γ -プロピオラクトンは、タンパク質の化学修飾を引き起こす非常に反応性の高い物質であるので、免疫グロブリンの抗ウイルス活性及び抗細菌活性もかなり失われる。他方、この化学修飾は、化学修飾されていない免疫グロブリンと比べて抗補体活性を低下させる。特許文献 3 は、陰イオン交換クロマトグラフィー、 γ -プロピオラクトン、U V C 光照射、及び高温（40 ~ 60）におけるインキュベート工程を用いることにより抗補体活性の低下した静脈内投与用 I g M 濃縮物の調製について記載している。この方法により製造される調製物は、化学修飾されているので液体溶液中で安定である時間は限られていた。I g M 濃度は、総免疫グロブリン含量の 50 % 超であった。

10

20

【0018】

γ -プロピオラクトンで化学修飾されていない I g M 富化タンパク質溶液の調製について、特許文献 4 及び 5 に記載されている。これらの方法は、C o h n 画分 I I I 又は画分 I I / I I I から出発して、好適なタンパク質溶液をオクタン酸処理及び陰イオン交換クロマトグラフィーに付すことを含む。特許文献 4 では、C o h n 画分 I I I 中に存在する脂質を除去するために、15 分間攪拌することによりオクタン酸処理が実施される。

【0019】

特許文献 4 に係る調製物は、0.6 C H 5 0 / m g タンパク質 ~ 0.8 C H 5 0 / m g タンパク質という低い抗補体活性を有していたが、安定化及び γ -プロピオラクトンによるウイルスの不活化を行わなければならなかった。低い抗補体活性とは、免疫グロブリンに関する E P モノグラフに従って 1 C H 5 0 / m g タンパク質以下であるとみなす。

30

【0020】

特許文献 5 には、抗補体活性を低下させるために、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いることによる静脈内投与用 I g M 富化調製物の調製について記載されている。更に、40 ~ 60、好ましくは 50 ~ 54 にて p H 4 ~ p H 4.5 で熱処理すると抗補体活性が低下することが記載されている。この調製物は、数ヶ月間調製物の安定性を確保するために凍結乾燥させなければならなかった。液体溶液として長期安定性を有することについて示すことはできなかった。

40

【0021】

非特許文献 1 は、P E G 沈殿により単離した I g M 調製物が、標準的な補体固定試験により高い抗補体活性（A C A）を有しており、37 で 8 時間 p H 4.0 にて前記 I g M 調製物をインキュベートし、次いで中性 p H に再調整することによりこの A C A 活性が 10 倍低下することを示した。この 10 倍低下が静脈内投与に対する忍容性を確保するのに十分であるかどうかは示されていない。非特許文献 1 は、I g M 濃縮物の特異的な補体活性化能について評価しておらず、また、任意の動物又はヒトモデルにおける安全性も評価していない。

【0022】

40 ~ 62、好ましくは 45 ~ 55 で、p H 4.0 ~ p H 5.0 にて I g M 調

50

製物を穏やかに熱処理して、非特異的な補体活性化を減少させる別の方法が記載されている（特許文献6）。この特許出願では、プレカリクレインアクチベータ及びリポタンパク質を遠心分離により除去するために、オクタン酸をCohn画分III懸濁液に添加する。しかし、この穏やかな熱処理でもIgMの抗原決定基が一部失われる。これによって、新生抗原が生じるリスクが増し、ヒトにおける免疫原性の上昇又は活性の喪失が導かれる場合もある。

【0023】

オクタン酸沈殿工程後にプロテアーゼ処理（例えば、ペプシン処理）を行うことによる静脈内投与用IgM含有タンパク質溶液の調製が、特許文献7に記載されている。プロテアーゼ処理により、免疫グロブリン分子が部分的に断片化され、Fab及びFc部分の全体的な機能活性が低下する。したがって、プロテアーゼ処理された免疫グロブリンは、修飾されていないとみなすことはできない。また、この調製方法では、分子量100kD未満の断片が約5%生じる。

【0024】

オクタン酸処理を実施するための知られた方法（特許文献4及び7）は、非エンベロープウイルスの除去及び不活化に対してオクタン酸処理が有効ではなく、また、全てのタンパク質分解活性を実質的に除去するものではないという問題点を有する。

【0025】

特許文献8には、治療用途のための少なくとも33%のIgMを含む高濃度IgM調製物が開示されており、前記調製物は、同種凝集素力価を実質的に有しない。この特許出願では、オクタン酸を添加することによりオクタン酸沈殿が実施され、同種凝集素は、Synsorbアフィニティークロマトグラフィーにより除去される。最終調製物は、凍結乾燥させる必要があった。

【0026】

総じて、免疫グロブリンが化学的に若しくは酵素的に修飾されている、クロマトグラフィーにより更に精製される、及び穏やかな熱処理に付される、のうちの少なくとも1つにより、抗補体活性の低いIgM含有調製物の製造が可能である。しかし、これら方法は、ウイルスが除去/不活化されない（延いては、ウイルス安全性ではない）、ネイティブ型の免疫グロブリンの量が低下している、及び/又は抗補体活性が残存しているという問題点を有する。したがって、ヒトにおける静脈内投与に適した、改善されたIgM含有免疫グロブリン調製物の提供が依然として必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0027】

【特許文献1】欧州特許第1842561号明細書

【特許文献2】欧州特許第0013901号明細書

【特許文献3】欧州特許第0352500号明細書

【特許文献4】欧州特許第0413187号明細書（Biotest）

【特許文献5】欧州特許第0413188号明細書（Biotest）

【特許文献6】欧州特許第0450412号明細書（Miles）

【特許文献7】欧州特許第0835880号明細書（米国特許第6136312号明細書、ZLB）

【特許文献8】欧州特許第0345543号明細書（Bayer、Miles）

【非特許文献】

【0028】

【非特許文献1】M. Wickerhauser et al. "Large Scale Preparation of Macroglobulin", Vox Sang 23, 119 - 125 (1972)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0029】

第1の態様において、本発明は、ヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物であって、IgGと、IgAと、抗体の総量の少なくとも5重量%のIgM抗体とを含み、ヒト血漿から調製され、特異的な補体活性化活性を有すると共に、非特異的な補体活性化能の測定に適したヒト血清を用いるインビトロアッセイにおいて、C5a及びC3aの少なくともいずれかを実質的に産生しない抗体調製物を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0030】

驚くべきことに本出願人は、特異的な補体活性化活性を有すると共に非特異的な補体活性化活性を実質的に有しないIgM抗体調製物をヒト血清から製造することが可能であることを見出した。該調製物は、静脈内投与後の非特異的な補体活性化に伴う血圧低下などの望ましくない副作用を低減しつつ製造効率を維持するので、有利である。

10

【0031】

更なる態様において、本発明は、

- (a) ヒト血漿から血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として調製する工程；
 - (b) C₇～C₉カルボン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；
 - (c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る工程；
 - (d) 前記IgM含有免疫グロブリン組成物を、pH3.5～pH4.5の範囲でインキュベートしてインキュベーション溶液を得る工程；
 - (e) 前記インキュベーション溶液にUV-Cを照射してUV-C照射溶液を得る工程；及び
 - (f) 前記UV-C照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得る工程；
- を含む本発明の抗体調製物をヒト血漿から調製する方法を提供する。

20

【0032】

驚くべきことに本出願人は、免疫グロブリン溶液をカルボン酸と混合する工程における振動式攪拌機の使用が、非常に有利であることを見出した。該工程により、望ましくないタンパク質（プロテアーゼなど）がより効率的に除去され、免疫グロブリン製剤を製造するために行われる下流の処理工程により適した中間生成物が得られる。即ち、該中間生成物は、これら下流の処理工程をより効率的にする。したがって、下流の処理工程は、より穏やかな工程とすることができ、これは、特異的な補体活性化活性を有すると共に非特異的な補体活性化活性を実質的に有しない本発明の抗体調製物の達成を促す。

30

【0033】

特に、工程(c)で得られるIgM含有免疫グロブリン組成物は、穏やかな酸性条件での処理、UV-C照射による処理などの更なる処理工程に付すことができ、これにより、静脈内投与に適した、次の有利な性質、即ち、抗補体活性が低い；ネイティブで活性のあるIgMを高レベルに維持する；ウイルス安全性を有し、そのためヒトにおける静脈内投与に適する、という性質を有するIgM含有免疫グロブリン製品又は抗体調製物が製造される。本明細書に記載の方法で達成されるウイルス安全性のレベルは、これまで得られるレベルではない。更なる利点は、タンパク質分解活性が低いこと（そのため、長期保存安定性を有すること）及び化学的に修飾されていないことである。

40

【0034】

更に本発明は、医薬において使用するための本発明の抗体調製物を提供する。一実施形態においては、前記抗体調製物は、免疫障害又は細菌感染症の治療において使用される。

【0035】

更なる態様において、本発明は、本発明の抗体調製物を投与することを含む患者の治療方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0036】

50

添付の図面を参照して、本発明をより詳細に説明するが、以下の説明はほんの1例に過ぎない。

【0037】

【図1】図1は、本発明に係る静脈内投与に適した抗体調製物を得るために用いることができる各工程の概要である。このうち、振動式混合機を用いるオクタン酸処理、pH4処理、及びUV-C処理がハイライトされている。出発材料は、ヒト血漿の標準的な低温エタノール沈殿プロセスにより得られる。

【図2】図2は、IgM調製物とインキュベーションした後のヒト血清中に存在するC5aの経時における平均濃度を示すグラフである。

【図3】図3は、IgM調製物とインキュベーションした後のヒト血清中に存在するC3aの経時における平均濃度を示すグラフである。

10

【発明を実施するための形態】

【0038】

抗体調製物

上述の通り、本発明は、ヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物であって、IgGと、IgAと、抗体の総量の少なくとも5重量%のIgM抗体とを含み、ヒト血漿から調製され、特異的な補体活性化活性を有すると共に、非特異的な補体活性化能の測定に適したヒト血清を用いるインビトロアッセイにおいて、C5a及びC3aの少なくともいずれかを実質的に産生しない抗体調製物を提供する。

【0039】

20

本発明の抗体調製物は、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%が免疫グロブリン(ポリクローナル抗体)であるヒト血漿タンパク質を含む。特に、前記調製物は、免疫グロブリンIgG、IgA及びIgMを含み、該免疫グロブリンの少なくとも5%はIgMである。IgG、IgA及びIgM免疫グロブリンの量は、比濁分析法又はPh.Eur.2.7.1に基づく免疫沈降法により測定することができる。

【0040】

前記抗体調製物は、少なくとも10%のIgMを含むことがより好ましく、少なくとも15%のIgMを含むことが最も好ましい。IgG及びIgAに関しては、前記抗体調製物は、5%超のIgA及び40%超のIgGの少なくともいずれかを含むことが好ましい。パーセンテージ(%)はいずれも、抗体の総量に対するパーセンテージである(例えば、 $IgMの量(g) / (IgGの量(g) + IgAの量(g) + IgMの量(g)) \times 100$ など)。

30

【0041】

免疫グロブリン分子のFc部分の機能的活性を評価することによって前記抗体調製物が特異的な補体活性化活性(即ち、抗原の存在下での補体カスケード活性化能)を有することを判定する方法は、当技術分野において知られている。特に、好適な方法が風疹抗原を用いる欧州ガイドラインICH S6(CPMP/ICH/302/95)による現行のEur.Ph.方法に記載されている。以下、生物学的活性に言及して、特異的な補体活性化についてより詳細に説明する。

【0042】

40

前記抗体調製物は、正常なヒト血清(即ち、健常人由来の血清)における非特異的な補体活性化の判定に適したインビトロアッセイにおいて、非特異的な補体活性化(即ち、抗原の不存在下での免疫グロブリンによる補体カスケードの活性化)を実質的に引き起こさない。特に、該アッセイは、抗原の不存在下でアッセイで生じたC5a及びC3aの少なくともいずれかの量を測定することができるものである。上述したように、補体が活性化されるとC5a及びC3aが産生される。これらのタンパク質はいずれも補体系の終末経路(古典的/レクチン経路又は第二経路のいずれでもなく)に関わるので、これらは、補体活性化の判定に特に有用である。

【0043】

前記抗体調製物は、抗原の不存在下におけるヒト血清を用いた適切なインビトロアッセ

50

イにおいて、C 5 a 及び C 3 a の少なくともいずれかを実質的に産生しない。好ましい実施形態においては、1.72 mg/mL の Ig M 濃度に調整された前記抗体調製物が 60 分間の前記アッセイ後に産生する C 5 a が 200 ng/mL 未満であるか、1.72 mg/mL の Ig M 濃度に調整された前記抗体調製物が 60 分間の前記アッセイ後に産生する C 3 a が 6,000 ng/mL 未満であるか、又は 1.72 mg/mL の Ig M 濃度に調整された前記抗体調製物が 60 分間の前記アッセイ後に産生する C 5 a が 200 ng/mL 未満であり且つ C 3 a が 6,000 ng/mL 未満である。

【0044】

これに代えて或いはこれに加えて、前記アッセイにおいて、前記抗体調製物により産生される C 5 a 及び C 3 a の少なくともいずれかの量が、同一のアッセイにおいて、ヒト血清単独により産生される C 5 a 及び C 3 a の少なくともいずれかの量の $\pm 70\%$ と同量である。これは、前記アッセイの 60 分間後であることが好ましい。

10

【0045】

好適なアッセイが当技術分野において知られている。好ましい実施形態においては、前記アッセイは、次の工程を含む：

(a) 抗体調製物を 100 μ L のヒト血清に添加して 1.72 mg/mL の Ig M を含有する反応混合物を調製し、該反応混合物を 37 で 60 分間、定速攪拌下にてインキュベートする工程；

(b) E L I S A に適した前記反応混合物の希釈系列を調製する工程；

(c) C 5 a 又は C 3 a に対する一次抗体及び二次抗体並びに発色性物質を用いて、前記反応混合物の希釈系列に対してサンドイッチ E L I S A を行う工程であって、前記二次抗体は、酵素とコンジュゲートされており、前記発色性物質は、前記酵素の基質である工程；

20

(d) 前記発色性物質を、前記二次抗体を介して C 5 a 又は C 3 a と結合した前記酵素に接触させた結果生じる色の変化に基づいて前記反応混合物中の C 5 a 又は C 3 a の量を測定する工程。

【0046】

前記 E L I S A においては、前記一次抗体でコーティングしたアッセイプレートの各ウェルに各希釈系列を接触させる。インキュベーション後、ウェルを洗浄して希釈サンプルを除去する。続いて、前記二次抗体をインキュベートすると、ウェル中の一次抗体に結合した C 3 a / C 5 a に結合する。これは、一次抗体に結合した C 3 a / C 5 a 上に固有のエピトープが存在するからである。結合していない二次抗体を除去する更なる洗浄を行った後、前記発色原体をインキュベートすると、二次抗体にコンジュゲートされた前記酵素と反応する。この結果生じる色の変化は、光度計による吸光度測定により測定することができ、各希釈系列中に存在する C 5 a / C 3 a 濃度に比例する。

30

【0047】

ここで、工程 (a) で添加される前記抗体調製物の量は、前記反応混合物の Ig M 濃度を 1.72 mg/mL とするのに適切な量である。工程 (c) 及び (d) は、次の (i) ~ (v i i i) を含むことができる：(i) 前記反応混合物の希釈系列を、C 3 a / C 5 a に対する一次抗体 (即ち、「捕捉抗体」) をコーティングしたアッセイプレートの各ウェルに添加すること；(i i) 前記プレートをインキュベートして C 3 a / C 5 a を前記一次抗体と結合させること；(i i i) 前記プレートを洗浄して、一次抗体に結合していない希釈液中の物質を除去すること；(i v) C 3 a / C 5 a と結合する酵素結合二次抗体 (検出抗体) を添加すること；(v) 前記プレートをインキュベートして二次抗体を C 3 a / C 5 a と結合させること；(v i) 前記プレートを洗浄して結合していない二次抗体を除去すること；(v i i) 前記酵素によって発色シグナルに変換される化学物質を添加すること；及び (v i i i) 前記プレートの各ウェルの吸光度を測定して C 3 a / C 5 a の有無及び量を測定すること。

40

【0048】

前記サンドイッチ E L I S A は、当技術分野において知られた方法に従って行われる、

50

及び/又は、市販のキットを用い製造業者の説明書に従って行われる。好適で特に好ましい市販の酵素結合免疫測定法(ELISA)キットは、Quidel社製 MicroVue C5a Plus EIA Kit; A025、及びQuidel社製 MicroVue C3a Plus EIA Kit; A032である。

【0049】

本発明の更なる実施形態においては、前記抗体調製物は、1,200kDa以上の凝集体の含有量が2%未満、好ましくは1.5%未満である。これは、免疫グロブリン量のパーセンテージ(%)を意味する。凝集体の含有量は、高速サイズ排除クロマトグラフィー(HPSEC)により測定することができる。これは、当技術分野において知られた方法により行うことができる。

10

【0050】

これに代えて或いはこれに加えて、前記抗体調製物の非特異的な補体活性化を実質的に生じさせない能力は、前記抗体調製物の抗補体活性として定義することができ、該抗補体活性は、1.0CH50/mgタンパク質未満であり、より好ましくは0.75CH50/mgタンパク質未満である。このスケールで抗補体活性を測定するアッセイは、欧州薬局方(方法2.6.17, Ph. Eur. 6. Edition, 2008)に記載の方法に従って行うことができる。このアッセイについては、以下のアッセイの項目で詳述する。

【0051】

好ましい実施形態においては、前記抗体調製物は、抗体の化学的又は酵素的修飾を伴う工程を行うことなしに、ヒト血清から調製されたものである。即ち、ヒト血清からの前記抗体調製物の製造プロセスは、抗体と、酵素的又は化学的修飾を引き起こし得る試薬とを接触させる工程を含まない。特に、前記プロセスは、抗体と該抗体の化学的修飾を引き起こし得る - プロピオラクトンとを接触させる工程、及び抗体と該抗体の酵素的分解を引き起こし得るペプシンとを接触させる工程のいずれも含まない。

20

【0052】

これに代えて或いはこれに加えて、前記抗体調製物は、抗体を40℃以上で10分間以上加熱することを伴う工程を行うことなしに、ヒト血清から調製されたものである。加熱工程により、免疫グロブリンが変性し免疫グロブリン凝集体を生じることが知られている。

30

【0053】

前記抗体調製物は、非エンベロープウイルスを $3 \log_{10}$ 超、好ましくは $4 \log_{10}$ 超、最も好ましくは $5 \log_{10}$ 超除去可能なプロセスで調製されることが更に好ましく、前記抗体調製物にウイルス安全性をもたせる。そのため、前記抗体調製物は、従来の抗体調製物よりも安全であり、特に、例えばパルボウイルスなどの活性な非エンベロープウイルスに関して安全である。これにより、ウイルスを実質的に含有しない抗体調製物、特に非エンベロープウイルスを実質的に含有しない抗体調製物となる。更に、本発明の方法は、前記抗体調製物の活性IgMの量と抗補体活性のいずれに対しても大きな影響を与えることなく、前記レベルのウイルス粒子除去/不活化を達成することが可能である。

【0054】

特に、前記抗体調製物は、次の(a)~(f)の工程を含むプロセスによってヒト血漿から調製することができる：

40

- (a) ヒト血漿から血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として調製する工程；
- (b) C₇~C₉カルボン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；
- (c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る工程；
- (d) 前記IgM含有免疫グロブリン組成物を、pH3.5~pH4.5の範囲でインキュベートしてインキュベート溶液を得る工程；
- (e) 前記インキュベート溶液にUVCを照射してUVC照射溶液を得る工程；及び

50

(f) 前記UV C照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得る工程。

【0055】

前記プロセスは、工程(d)で得られたインキュベート溶液を、工程(e)における照射の前にナノ濾過に付すことを更に含むことが好ましい。前記製造方法の更なる詳細と好ましい態様については、以下の項目で記載する。

【0056】

本発明の更に好ましい実施形態においては、前記抗体調製物は、投与前のレベルから10%超の動脈圧の低下を伴うことなしに、カニクイザルに115mg IgM/kg体重/時間で投与することが可能である。上述したように、非特異的な補体活性化は血圧低下を引き起こすので、動脈圧に大きな変化がないことは、健全なサルインビボで補体の非特異的活性化が実質的に生じていないことを示す。動脈圧は、右大腿動脈を介して下腹部大動脈に圧力カテーテルを挿入することにより測定することができる。

10

【0057】

好ましい実施形態においては、前記抗体調製物は、肺炎球菌多糖体、大腸菌、エンテロコッカスフェカーリス、カンジダアルピカンス、及びクラミジアの1種以上に対する抗体を更に含むことができる。

【0058】

更に好ましい実施形態においては、前記抗体調製物中の抗体の少なくとも90%が生物学的に活性である。「生物学的に活性」という用語は、前記調製物中の抗体がネイティブの形態であり、特に抗原との特異的結合の結果、補体カスケードの活性化が可能であることを意味する。抗体調製物の生物学的活性は、抗体の力価/結合活性及びFcの完全性/機能を測定する当技術分野で知られたアッセイに基づいて評価することができる。特に、Fc機能の測定に適した風疹抗原を用いるインビトロアッセイにおいて、前記抗体調製物の抗体のFc部分の活性が生物学的レファレンス調製物の活性の±10%、より好ましくは±5%と同等である。

20

【0059】

生物学的レファレンス調製物は、インターナショナルメディカルヘルスケアコミュニティ(international medical and healthcare community)により用いられており、医薬品のコンシステンシーの確認に役立つ。このように、前記アッセイに好適な生物学的レファレンス調製物は、当技術分野において知られており入手可能である(例えば、Immunoglobulin Biological Reference Preparation(バッチ番号3など)。特に、前記アッセイは、Human Immunoglobulin Biological Reference Preparation(バッチ番号3)をコントロールとして用いる国際的に認識されたEur. Ph. 2.7.9 免疫グロブリンのFc機能のための試験(Test for Fc Function of Immunoglobulin)(現行版2011年4月)に従って行うことができ、前記抗体調製物の活性(%)は、該コントロールに対して測定される。この試験は、次の工程(i)~(iv)を含む：(i)タンニン酸処理済O型ヒト赤血球に風疹ウイルス抗原をロードして抗原被覆血球を調製する工程；(ii)前記抗体調製物を前記血球と共にインキュベートし、モルモットの補体を添加して補体により開始される血球の溶解を開始させる工程；(iii)541nmにおける吸光度の経時変化に基づいて溶血速度を測定する工程；(iv)時間当たりの吸光度の最大変化を用いて前記抗体調製物の抗体の機能を評価する工程。

30

40

【0060】

前記抗体調製物はまた、先行技術における抗体調製物よりもタンパク質分解活性が低いことが好ましい。特に、2~8で保存したときに、前記調製物にタンパク質分解活性が検出されない。タンパク質分解活性は、以下のアッセイの項目及び実施例6に記載される発色性基質を用いる方法など、当技術分野において知られた標準的な試験方法により測定することができる。

50

【0061】

本発明の抗体調製物は、グリシンなどの安定化剤を更に含むことができる。

【0062】

当技術分野において知られた調製物と同様に、本発明の抗体調製物は、 5 ± 3 で保存することができる。しかしながら、本発明の方法による効率的な精製により、前記抗体調製物の安定性は非常に優れている。最終産物は、 $2 \sim 8$ で少なくとも3ヶ月間、好ましくは6ヶ月間、最も好ましくは2年間、液状で安定である。これは、H P S E Cで測定される1.5%超のI g Mの断片化及び重合化がないこと、タンパク質分解活性の上昇がないこと、E s c h e r i c h i a c o l iに対するI g M抗体活性及びP n e u m o c o c c u s s a c c h a r i d eに対するI g M抗体活性の25%超の低下がないこと、抗補体活性の25%超の上昇がなく1 C H 5 0 / m g タンパク質未満を維持していることを意味する。更に、本発明の方法により製造される最終産物は、同一の基準で評価されたときに、室温($23 \sim 27$)で少なくとも3ヶ月間、好ましくは6ヶ月間、最も好ましくは1年間、液状で安定である。

10

【0063】

抗体調製物の製造方法

上述したように、本発明は、免疫グロブリンを含む血漿画分からのI g M含有抗体調製物の調整を提供する。特に、本発明は、ヒト血漿から本明細書に記載の抗体調製物を製造するための方法であって、次の工程(a)～(f)を含む：

- (a) ヒト血漿から血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として調製する工程；
- (b) $C_7 \sim C_9$ カルボン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；
- (c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離してI g M含有免疫グロブリン組成物を得る工程；
- (d) 前記I g M含有免疫グロブリン組成物を、 $pH 3.5 \sim pH 4.5$ の範囲でインキュベートしてインキュベート溶液を得る工程；
- (e) 前記インキュベート溶液にU V Cを照射してU V C照射溶液を得る工程；及び
- (f) 前記U V C照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得る工程。

20

【0064】

免疫グロブリン医薬組成物の調製に適した血漿画分及びそれらの製造方法は当技術分野においてよく知られている。前記血漿画分は、沈殿した血漿画分が好ましく、C o h n分画法又はそのよく知られた改良法(例えば、K i s t l e r - N i t s c h m a n n)のプロセスにより得られた沈殿血漿画分が最も好ましい。前記画分は、低温エタノール分画法により得られる画分I / I I I又は画分I I I(画分B + I又は画分Bとしても知られる)が最も好ましい。前記血漿画分の免疫グロブリンは、少なくとも5%のI g Mを含むことが好ましい。

30

【0065】

工程(a)は、血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として準備することを含む。多くの場合、免疫グロブリンの含有する血漿画分は、固体又は半固体の形態となる。したがって、この工程の目的は、前記血漿画分のタンパク質を確実に工程(b)におけるカルボン酸との混合に適した状態にする、又はそのような状態になるように前記血漿画分のタンパク質を溶液状にすることである。この工程は、血漿画分を好適なバッファと混合することを含んでいてもよい。バッファのモル濃度は低いことが好ましく(即ち、1 M未満)、p Hは $4.5 \sim 5.5$ であることが好ましい(例えば、0.1 M酢酸ナトリウムバッファ、 $pH 5.05 \pm 0.1$)。混合は、ブレードミキサー又は振動式攪拌機を用いて完了させることができる。

40

【0066】

工程(b)においては、工程(a)で得られた溶液を $C_7 \sim C_9$ カルボン酸と振動式攪拌機を用いて混合し、混入タンパク質(例えば、プロテアーゼ、ウイルスなど)を沈殿さ

50

せる。前記カルボン酸は、分岐していてもよいし、工程（b）の効果を実質的に変えることがない置換基を有していてもよいし、分岐しており且つそのような置換基を有していてもよい。前記カルボン酸は、オクタン酸が好ましい。前記カルボン酸は、少なくとも0.075 kg/kg血漿画分の濃度、多くても0.2 kg/kg血漿画分の濃度で添加されることが好ましい。前記カルボン酸は、0.8 kg/kg血漿画分～0.15 kg/kg血漿画分で添加されることがより好ましく、0.09 kg/kg血漿画分～0.13 kg/kg血漿画分で添加されることが最も好ましい。酸のモル濃度を適宜調整することで正確な濃度に行うことができる。

【0067】

振動式攪拌機は、化学品/医薬品業界での使用に好適ないかなる種類の市販の振動式攪拌機も用いることができる。好適な振動式攪拌機としては、例えば、Grabber + Pfenniger 有限会社から市販されている。特に、「Labormodell Typ 1」振動式混合機は実験室規模の実験に用いることができ、「Industriemixer Typ 4」は生産規模の調製に用いることができる。前記振動式混合機は、製造業者の説明書に従って、特にタンパク質を含有する溶液の混合に好適であるとして製造業者によって記載されている設定で用いることができる。前記振動式混合機は、通常、100 Hz未満、振幅10 mm未満で運転させることができる。例えば、本発明者らは、「Labormodell Typ 1」を用いる実験室規模での振動混合を、230 V電源を用いる場合には、50 Hzで行った。前記混合プロセスの振動振幅は、0 mm～3 mmとし、IgM調製物の場合には、好ましい振幅である3 mmとした。直径23 mm～65 mmの攪拌プレートを実験室規模の実験に用いた。生産規模では、直径395 mmの攪拌プレートを用いた（孔径：13.5 mm～16 mm）。

10

20

【0068】

工程（b）においては、混合溶液のpHは、4.5～5.5が好ましく、4.8～5.3がより好ましい。この工程は、酢酸ナトリウムバッファ中に行うことができ、例えば、約0.1 M酢酸ナトリウムバッファが用いられる。工程（b）を行う際の温度は、10～35℃が好ましく、14～30℃がより好ましい。

【0069】

振動式攪拌機による混合時間は、特に限定されないが、少なくとも30分間～最長3時間であることが好ましく、40分間～110分間であることがより好ましい。インキュベーション時間が30分間未満であると、ウイルスの不活化レベルが低下することがある。

30

【0070】

工程（b）の一実施形態においては、リン酸三カルシウムを工程（b）における前記溶液と混合する。これは、0.01 kg/kg血漿画分～0.02 kg/kg血漿画分で添加されることが好ましい（リン酸三カルシウムは、固体又は半固体の形態であるので）。リン酸三カルシウムは、カルボン酸と同時に、別々に又は順次添加することができる。好ましい実施形態においては、リン酸三カルシウムは、カルボン酸の添加後少なくとも20分間の間に添加される。

【0071】

工程（c）では、工程（b）で沈殿させた混入タンパク質を前記溶媒から分離除去してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る（即ち、免疫グロブリン含有溶液）。この分離工程は、特に限定されず、当技術分野で知られたいかなる好適な方法によっても行うことができる。しかしながら、前記分離工程は、濾過により行うことが好ましく、限外濾過により行うことがより好ましい。したがって、工程（c）の結果物は、濾過溶液である。

40

【0072】

上述したように、本発明の方法は、混入タンパク質をより効率的に沈殿させ、その結果、工程（c）が実施し易くなるので、製造効率の点で有利である。工程（b）の結果得られる混合物を分離すると、透明で清澄な溶液、即ち、IgM含有免疫グロブリン組成物が得られる。したがって、濾過は、より迅速且つより容易になる。

【0073】

50

後続の処理工程 (d) ~ (f) は、工程 (c) で得られた I g M 含有免疫グロブリン組成物を静脈内投与に適した抗体調製物にするために必要である。

【0074】

工程 (d) は、工程 (c) で得られた I g M 免疫グロブリン組成物を穏やかな酸性条件で処理することを含む。工程 (e) は、酸処理済組成物に U V C を照射して U V C 照射溶液を得ることを含む。工程 (f) は、U V C 照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得ることを含む。

【0075】

穏やかな酸性条件での処理のために、工程 (c) で得られた前記 I g M 含有免疫グロブリン組成物を p H 3 . 5 ~ p H 4 . 5、好ましくは p H 3 . 8 ~ p H 4 . 2 でインキュベートして、インキュベート溶液を得る。穏やかな酸性条件は、好適な酸を I g M 含有免疫グロブリン組成物に添加することにより達成できる。例えば、0 . 2 M H C l を添加して p H を調整することができる。

10

【0076】

このインキュベーション工程は、32 ~ 42 で行うことが好ましく、35 ~ 39 で行うことがより好ましい。インキュベーション時間は、少なくとも2時間~最長24時間であることが好ましく、少なくとも9時間~最長16時間であることがより好ましい。

【0077】

前記照射工程では、上述の穏やかな酸処理により得られたインキュベート溶液を U V C 光で処理して U V C 照射溶液を得る。この工程は、U V i v a t e c (登録商標) 装置 (Bayer Technology Services 社製) などの市販の装置を用いて行うことができる。潜在的に存在するウイルス及びプロテアーゼを更に不活化するためには、前記インキュベート溶液は、254 nm ± 10 nm で 200 J / m² ~ 500 J / m²、より好ましくは 200 J / m² ~ 300 J / m² で処理することが好ましい。なお、通常必要とされるよりも穏やかな条件での U V C 処理は、振動攪拌によるオクタン酸処理後に本発明によって得られる清澄な濾液で初めて可能となる。標準的な攪拌技術で通常得られる、より乳白色又は不透明な溶液の場合には、照射時間をより長くする必要があり、I g M 活性の変性を促進すると共にウイルス不活化率を低下させ得る。

20

【0078】

工程 (f) では、照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物を得る。前記濾過は、ナノ濾過であることが好ましく、孔径 40 nm ~ 50 nm のフィルタで行うことがより好ましい。

30

【0079】

前記穏やかな酸処理、U V C 照射及び濾過工程のほかに、静脈内投与用の免疫グロブリン調製物を得るための追加の工程として、一回以上の更なる濾過工程を任意に行うことができる。一実施形態においては、処理されるタンパク質溶液を D E A E S e p h a d e x (登録商標) に吸着させた後、深層濾過により S e p h a d e x から分離することができる。望ましくない付随タンパク質であるセルロプラスミンを除去するために、例えば、タンパク質溶液を 75 mg / kg D E A E S e p h a d e x、p H 5 . 8 でバッチ式吸着に更に付してもよい。

40

【0080】

特に好ましい実施形態においては、U V C 照射処理に先立ち、穏やかな酸処理により得られたインキュベート溶液を D E A E S e p h a d e x に吸着させ、深層濾過により前記 S e p h a d e x から分離する。

【0081】

他の実施形態においては、処理される免疫グロブリン溶液をナノメートルフィルタで濾過してもよい。孔径 75 nm ± 5 nm ~ 35 nm ± 5 nm のフィルタ、又は公称孔径 75 nm ~ 35 nm のフィルタ (例えば、P a l l 社製 U l t i p o r (登録商標) D V 50) を前記プロセス中の各段階で用いることができる (例えば、公称孔径 50 nm は、

50

50 nm以上の大きさのウイルスに対して保持率 $4 \log_{10}$ 以上であることを意味する)。好ましい実施形態においては、上記段落に記載した DEAE Sephadex 工程から得られた溶液を、UV C 照射に先立ち $0.2 \mu\text{m}$ フィルタで濾過する。

【0082】

上に定義したプロセスにより得られた最終抗体調製物（即ち、処理された IgM 含有免疫グロブリン溶液）は、滅菌条件下でそのまま容器に充填してもよい。或いは、前記抗体調製物は、pH 4 ~ pH 5.5、好ましくは pH 4.1 ~ pH 4.5 でグリシン含有バッファ中で製剤化してもよい。前記抗体調製物はまた、 $40 \text{ g/L} \sim 80 \text{ g/L}$ のタンパク質濃度、好ましくは $55 \text{ g/L} \sim 70 \text{ g/L}$ のタンパク質濃度に希釈してもよい。なお、陰イオン交換クロマトグラフィーなどのよく知られた方法で、前記抗体調製物の IgM 含量を上げることがもできる。

10

【0083】

既に述べたように、上記の方法は、ウイルス粒子の不活化率及び除去率をより高め、特にパルボウイルスなどの耐性の高い非エンベロープウイルスの不活化率及び除去率を高める。これらのウイルスは、通常、オクタン酸処理に対する感受性があまりない。更に、従来の攪拌に比べて、タンパク質分解活性をよりよく取り除くことができる。これらの特徴は、化学的に修飾されていない IgM の量を高く維持しながら達成される。この知見は、オクタン酸による処理は、非エンベロープウイルスに対して有効な工程ではなく、ウイルス安全性を改善するためには、プロピオラクトン処理などのより過酷な方法でウイルスを不活化しなければならないという従来の見解と対照的である。また、タンパク質分解活性を完全に取り除くために例えばオクタン酸濃度を上げることが、多量の IgM を失うことになることは、よく知られていた。

20

【0084】

前記方法のこのような結果は、オクタン酸処理と組合わせて振動式の混合装置を使用することで達成される。IgM は、不所望の高い抗補体活性をもたらし得るせん断応力に対して感受性が非常に高いことが知られているので、この事実は、特に驚くべきことである。即ち、IgM 組成物を調製するために振動式混合機を用いることは、誰も考えないであろうし、IgM 含有溶液の処理に振動式混合機を用いることでこのような望ましい影響を期待する者もないであろう。

【0085】

更に、前記方法において、工程 (b) で得られるオクタン酸処理済溶液の濾過による清澄化などの工程 (c) で達成される分離は、振動式混合装置を用いることで向上する。分離がより容易に達成されると、処理時間が短縮され製造コストが低減する。工程 (c) により、下流の処理に有利な透明溶液が得られる。オクタン酸処理済 IgM 含有溶液を攪拌し濾過して得られる従来の溶液は、乳白色又は不透明である。

30

【0086】

工程 (c) で得られる IgM 含有組成物は、穏やかな酸性条件（例えば、pH 4）での処理及び UV C 照射工程に付して、ウイルス安全性を更に高めると共に最終産物を安定化させることが好ましい。工程 (c) で得られた IgM 含有免疫グロブリン組成物の清澄度を高めることにより、 $3 \log_{10}$ 超又は $4 \log_{10}$ 超の非エンベロープウイルスを不活化するために必要な UV C 照射時間を短縮することが可能である。これにより、UV C 処理後のネイティブで活性のある IgM の量がより多くなる。

40

【0087】

驚くべきことに、これらの工程により、ネイティブで活性のある IgM が高量であり、抗補体活性が低く、タンパク質分解活性が低く、抗菌活性及び抗ウイルス活性が高く、静脈内投与用の医薬にとって重要な特徴であるエンベロープウイルス及び非エンベロープウイルスに関する顕著なウイルス安全性を有する、化学的にも酵素的にも修飾されていない IgM 含有溶液が得られる。更に、処理された IgM 含有溶液は、改善された長期安定性を有し、2 ~ 8 で 12 ヶ月間を超える期間、溶液として非常に安定である。

【0088】

50

医薬用途

本発明の抗体調製物は、医薬における使用に適しており、免疫障害及び感染症、特に、IgM欠乏症及び細菌感染症の治療に用いることができる。静脈内投与用のヒトIgM富化多価免疫グロブリン調製物は、多価免疫グロブリンG調製物に比べて、臨床的に重要なグラム陰性菌及びグラム陽性菌に対する抗体力価が高く、且つグラム陰性菌のエンドトキシン及びグラム陽性菌のエンドトキシンに対する抗体力価も高い。

【0089】

特に、本発明の抗体調製物は、患者への静脈内投与に適している。

【0090】

本発明はまた、本発明の抗体調製物を患者に投与することを含む患者の治療方法を提供する。特に、前記患者は、免疫障害又は細菌感染症に罹患している患者である。より好ましい実施形態においては、前記抗体調製物は、静脈内投与される。

10

【0091】

本発明をより詳細に説明するが、以下の説明はほんの一例に過ぎない。

【実施例】

【0092】

アッセイ方法

IgM濃縮物についてのHPLCによる分子サイズの分布

以下の方法を利用して、抗体調製物中の凝集体の割合(%) (実施例8で使用する)を求めることができる。

20

試験溶液：約50g/Lの未希釈のサンプルを注入体積10 μ Lで注入する(タンパク質量は約500 μ gである)。

レファレンス溶液：ヒト免疫グロブリン(例えば、Intratect(登録商標), Biotest AG社製)

標準溶液：Bio-Rad社製ゲル濾過標準(商品番号151-1901)

カラム：

- サイズ：1 = 30mm、 = 7.8mm

- 固定相：20,000Da~7 \times 10⁶Daの相対分子量を有する球状タンパク質の分画に適しているBioscience TSK-Gel(登録商標)G4000 SWXL(東ソー株式会社製)

30

移動相：4.873gのリン酸水素二ナトリウム二水和物、1.741gのリン酸二水素ナトリウム一水和物、11.688gの塩化ナトリウム、及び50mgのアジ化ナトリウムを1Lの水に溶解させる。

流速：0.5mL/分

検出：分光光度計、280nm(レファレンス溶液で得られたクロマトグラムにおいて)

以下のスキームに従ってクロマトグラムを積分し、ピークを同定する：

- ・ポリマー(>1,200kD)、10分~13分
- ・IgM(1,200kD~750kD)、13分~19分
- ・ダイマー/IgA(750kD~350kD)、19分~20分
- ・IgG(350kD~100kD)、20分~26分
- ・フラグメント(<100kD)、26分~40分
- ・フラグメント(<100kD)、26分~40分

40

【0093】

非特異的な補体活性化の測定

ヘモリシンで前処理したヒツジ赤血球を補体により溶血させる。サンプル中の補体結合抗体により、溶血を抑制する。1mgの免疫グロブリンに結合している(不活化されている)補体の量を求める。

【0094】

一定量の免疫グロブリン(10mg)とモルモットの補体とを混合し、遊離補体を滴定

50

する。抗補体活性は、レファレンス溶液中の使用された補体に対する、使用された補体として表される。補体活性の溶血単位 (CH₅₀) は、最適なバッファ条件において、合計 5×10^8 個の赤血球のうち、最適に調製された赤血球を 2.5×10^8 個溶血させる補体の量である。

【0095】

最適に調製された赤血球 (ヒツジ由来の安定化赤血球 8 mL をゼラチン - バルビタール - バッファで 3 回洗浄し、最後に赤血球沈殿物 1 mL をゼラチン - バルビタール - バッファ 24 mL に懸濁させる) は、20 mL の赤血球懸濁液と 20 mL のヘモリシン (2 MHE / mL (最低溶血単位) に調整されている) とを混合し、37 で 15 分間インキュベートすることにより調製する。

10

【0096】

10 mg の免疫グロブリンをゼラチン - バルビタール - バッファ (バルビタールバッファ 1 L 中ゼラチン 1 g (pH 7.3)、5 倍バルビタールバッファ溶液: 水 2 L 中塩化ナトリウム 83 g、バルビタールナトリウム 10.192 g (pH 7.3)) で希釈する。最終体積が 1 mL になるように、200 μ L の補体 100 CH₅₀ / mL を添加する。37 で 1 時間、振盪させながら試験管をインキュベートする。サンプルを希釈し、最適に調製された赤血球に対して滴定する。37 で 1 時間インキュベートした後、サンプルを遠心分離し、541 nm の波長で分光光度計を用いることにより吸光度を求める。

【0097】

タンパク質分解活性の測定

20

タンパク質分解活性は、発色基質 (特に、少なくとも 1 つのセリンプロテアーゼに対して感受性である発色基質) と 37 の抗体調製物のサンプル (通常、バッファで希釈して線形範囲でアッセイできるようにする) とを混合し、分光光度計を用いて吸収動態をモニタリングすることによりアッセイすることができる。サンプルのタンパク質分解活性は、方程式 $C(U/L) = S \times Abs / 分 \times F$ (C = タンパク質分解活性; S = 発色基質の特異的吸光変化に関する変換係数; 及び F = 希釈倍率) を用いることにより、初期吸収差 ($Abs / 分$) から計算される。基質の使用は、製造業者の説明書に従う。

【0098】

タンパク質分解活性は、具体的には、以下の工程でアッセイすることができる:

(a) 25 mg の基質 S - 2288 (Chromogenix 社製) を 7.2 mL の注射用水に溶解させる;

30

(b) 抗体調製物のサンプルをバッファ (100 mM の Tris - HCl (pH 8.4)、106 mM の NaCl) で希釈して、線形範囲でアッセイできるようにし、温度を 37 に調整する;

(c) 等量 (例えば、200 μ L) の希釈された抗体調製物と溶解した基質とを混合する;

(d) 分光光度計を用いて 37 で 1 分間 ~ 3 分間、405 nm で吸収速度を測定する;

(e) 等式 $C(U/L) = 313 \times Abs / 分 \times F$ (C = タンパク質分解活性、 F = 希釈倍率) を用いることにより初期吸収差 ($Abs / 分$) からタンパク質分解活性を計算する。

40

【0099】

この方法の定量限界は、8 U / L であり、本発明の抗体調製物のサンプルは検出不可能である。したがって、本発明の最終産物におけるタンパク質分解活性のレベルは、8 U / L 未満である。

【0100】

実施例 1 - 画分 I / III から IgM を富化した調製物の調製

ヒト血漿の低温エタノール画分から得られた Cohn 画分 I / III 180 kg を 0.1 M 酢酸ナトリウムバッファ (pH 5.05) 720 L に懸濁させ、懸濁温度 (22 \pm 4) に達した後 15 分間 ~ 30 分間混合する。

【0101】

50

室温のオクタン酸（用いたペーストI / I I I 1 k g 当たり0 . 1 1 0 k g）19 . 8 k g を添加することにより溶液を処理し、振動式混合機（V i b r o m i x e r（登録商標）、サイズ - 4、G r a b e r + P f e n n i g e r 有限会社製、レベル2 ~ 3 に調整されたV i b r o m i x e r）を用いてタンパク質溶液を更に80分間混合する。オクタン酸は、30分間かけてゆっくりと添加する。

【0102】

約3 k g のリン酸三カルシウム（ $C a_3 (P O_4)_2$ ）を添加し、タンパク質溶液を少なくとも15分間更に混合する。フィルタプレスを用いて清澄濾過することにより沈殿物を除去する。更に0 . 2 μm 濾過を実施し、タンパク質溶液を10 k D の膜を用いる限外濾過に付す。タンパク質溶液を0 . 0 4 M のN a C l で透析し、その後、タンパク質濃度を40 g / L に調整する。

10

【0103】

注射用水で1 + 1 希釈した後、タンパク質溶液をp H 4 . 0 \pm 0 . 1 で処理する。p H の調整は、1 M のH C l を用いて行い、タンパク質溶液は、37 \pm 2 で9時間インキュベートする。p H 4 でのインキュベーションの後、タンパク質溶液のp H を1 M のN a O H を用いて5 . 8 に調整する。パッチ方式でD E A E S e p h a d e x を添加することにより（タンパク質1 k g 当たりD E A E S e p h a d e x 75 g）、得られたタンパク質溶液を更に精製する。タンパク質溶液を室温で60分間以上攪拌しながらインキュベートする。清澄濾過によりD E A E S e p h a d e x を除去する。タンパク質溶液を0 . 2 μm 濾過に付す。

20

【0104】

タンパク質溶液を0 . 1 μm のフィルタ及びU l t i p o r V F D V 5 0 , 2 0 " フィルタ（P a l l 社製）に通して濾過する。U V C 線量240 J / m² で、フロースルー-U V i v a t e c 処理装置（B a y e r T e c h n o l o g y S e r v i c e s 社 / S a r t o r i u s S t e d i m 社製）を用いて、254 nm でU V C 光処理することにより濾液を更に処理する。製造業者の説明書に従ってU V C 反応機を通過する流速を計算する。照射されたタンパク質溶液を、限外濾過によりタンパク質濃度が50 g / L ~ 70 g / L になるように濃縮し、透析（10 k D の膜、0 . 3 2 M のグリセリンバッファ（p H 4 . 3）を用いる）に付す。最終産物を0 . 2 μm のフィルタに通して濾過し、2 ~ 8 で保存する。

30

【0105】

実施例2 - オクタン酸処理工程における条件の検討

オクタン酸処理に関して、実施例1に記載の方法を用いて以下の実験範囲について、また実験範囲を互いに組み合わせて試験した（結果は示さない）。

- オクタン酸の量：0 . 0 9 k g / k g ~ 0 . 1 3 k g / k g（用いた画分I / I I I 1 k g 当たりのオクタン酸量）（120 m M ~ 180 m M のオクタン酸）
- オクタン酸処理のp H：p H 4 . 8 ~ p H 5 . 3
- 反応の温度範囲：14 ~ 30
- インキュベート時間：40分間 ~ 110分間

40

【0106】

試験した全ての条件で、更に処理するための清澄化が容易であり、且つタンパク質分解活性が、懸濁C o h n 画分I / I I I 中数百U / L から著しく低下している中間体が得られる。これら中間体から、定量限界である8 U / L（下記実施例6に記載の通り計算）未満のタンパク質分解活性を有する最終産物が得られる。

【0107】

実施例3 - V i b r o m i x e r の使用によるウイルスの減少 - オクタン酸処理にV i b r o m i x e r を用いる場合及び用いない場合のウイルス除去係数の決定

250 m L の懸濁画分I / I I I をp H 5 . 0 5 及び22 で30分間ホモジナイズした。懸濁液に2 . 6 m L のウイルス原液を加えた。オクタン酸を添加し（110 g / k g）、V i b r o m i x e r を用いて60分間ホモジナイズした。平行して、同じ混合物を

50

標準的な攪拌機でホモジナイズした。60分間後、リン酸三カルシウム(0.15 g/kg オクタン酸)を添加し、懸濁液を15分間攪拌した。フィルタディスクを用いて深層濾過により懸濁液を清澄化した。フィルタディスクは、70 mL ~ 80 mLのバッファで予めすすいでおいた。濾過後、80 mLのバッファでフィルタをすすいだ。濾液及び洗浄液をプールし、ウイルス滴定のためのサンプルを抜き取った。

【0108】

SV40、Reo、及びPPV(CV-1、CCL-7.1、及びPK13)について適切な指示細胞において、オクタン酸の添加前及び濾過後に採取したサンプルのウイルス力価を求めた。最後に、ウイルス検証研究に関する現行の指針に従ってウイルス除去係数を計算した。

10

【0109】

ウイルス検証研究では、SV40及びReo等の非エンベロープウイルスは、それぞれ $4 \log_{10}$ 超及び $5 \log_{10}$ 超のオーダーで効果的に除去された。更に、PPVは、 $3 \log_{10}$ 超除去された。これら値は、Vibromixerを用いずに標準的な攪拌条件下で同じオクタン酸処理を行ったときの10倍~1,000倍高い値である。

【表1】

	オクタン酸反応 標準的な攪拌 [\log_{10} 減少]	オクタン酸反応 Vibromixerで攪拌 [\log_{10} 減少]
PPV	2.15 ± 0.32	3.39 ± 0.36
REO	2.34 ± 0.38	5.46 ± 0.28
SV40	2.05 ± 0.4	4.71 ± 0.34

20

表1: Vibromixerを用いた及び用いなかったオクタン酸処理
についてのウイルス減少係数(\log_{10})の比較

【0110】

実施例4 - UVC処理の評価

UVC照射線量の最適範囲について評価した。非エンベロープウイルスについて少なくとも $4 \log_{10}$ 不活化するための最低必須線量と、Fabの抗原に結合する機能を低下させ且つ補体活性化に影響を与えるFcの機能を低下させるIgM分子の変性を避けるための最高耐性線量とのバランスがある。 $200 \text{ J/m}^2 \sim 400 \text{ J/m}^2$ の範囲では、免疫グロブリンの凝集体の僅かな増加がみられ、断片含量に対する著しい影響はなかった。

30

【0111】

実験のために、オリジナルのタンパク質溶液の吸光度(OD)を用いて、BTSより提供されるExcelシート(customer Master Calculation Sheet UVivatec Lab IIバージョン3.0)を用いてUVivatecラボシステムにおける流速を計算する。ランプの性能、UVシグナルランプセンサの設定点、及び望ましいUVC照射線量を考慮して、流速を計算する。

40

【0112】

シグナルフロースルーについて 200 J/m^2 の線量を得るために、流速 5.8 L/h でUVivatecシステムを通過するように、タンパク質含量が約 55 g/L であるIgM含有溶液(Batch 86GB005BE07)をポンプで送った。流速 3.9 L/m^2 で前記システムを通過するようにタンパク質溶液をポンプで送ることにより、 300 J/m^2 の線量を得た。流速 2.9 L/m^2 で前記システムを通過するようにタンパク質溶液をポンプで送ることにより、 400 J/m^2 の線量を得た。

【表 2】

		UVCを照射し なかったIgM産 物	UVC200J/m ² 照射後のIgM 産物	UVC300J/m ² 照射後のIgM 産物	UVC400J/m ² 照射後のIgM 産物
タンパク質含量	g/L	56.3	56.2	57.6	54.4
IgG含量(比濁分析)	%	56.1	55.5	55.7	54.9
IgA含量(比濁分析)	%	20.1	20.6	20.5	20.7
IgM含量(比濁分析)	%	23.7	23.9	23.7	24.4
HPSEC					
凝集体>1200 kD	面積%	1.9	2.6	3.3	4.0
断片<100 kD	面積%	0.66	0.73	0.76	0.79
ACA	CH50/mg タンパク質	0.68	0.48	0.46	0.46
PA	U/L	< 8	< 8	< 8	< 8

10

表2:濃縮最終産物中におけるUVC処理前及び後の活性及び力価測定についての分析結果

【0113】

200 J/m² ~ 400 J/m² の範囲では、免疫グロブリン含量、タンパク質分解活性、又はACAについて有意な差はみられなかった。非エンベロープウイルスを不活化するには200 J/m² で十分であり、且つ300 J/m² で凝集体の形成及び抗体力価に対する著しい影響がみられなかったので、線量の好ましい範囲を200 J/m² ~ 300 J/m² に設定した。好ましい線量は、225 J/m² である。

20

【0114】

シングルフロースルーについて200 J/m² ~ 300 J/m² の線量を得るために、流速5.8 L/hでUVivaticシステムを通過するように、タンパク質含量が8 g/L ~ 12 g/Lである希釈したIgM含有溶液(Batch 86BB059BE07)をポンプで送った。

【表 3】

Batchフラクション/III 86BB059BE07		UVC前	UVC: 200 J/m ²	UVC: 225 J/m ²	UVC: 250 J/m ²	UVC: 300 J/m ²
タンパク質	g/L	11.34	10.56	10.65	10.69	10.56
IgG含量	%	59.2	59.1	58.5	58.6	57.1
IgA含量	%	19.6	19.6	20.2	20.1	20.3
IgM含量	%	21.1	21.3	21.2	21.4	22.6
HSEC						
凝集体>1200kD	%	0.20	0.39	0.54	0.3	0.47
断片<100kD	%	0.47	0.46	0.25	0.26	0.47
PA	U/L	< 8	< 8	n.t.	n.t.	n.t.
PKA	U/mL	3	3	3	3	3
ACA	CH50/ mg タンパク質	0.1	0.08	0.1	0.1	0.18
抗大腸菌 O1:K1 - IgG	U/mg	24.7	20.5	18.9	19.5	20.2
抗大腸菌 O1:K1 - IgA	U/mg	9.4	9.5	9.5	9.1	8.9
抗大腸菌 O1:K1 - IgM	U/mg	14.1	13.0	15.1	13.9	13.4
抗カンジダアルビカス - IgG	U/mg	15.6	16.8	17.9	17.3	17.0
抗カンジダアルビカス - IgA	U/mg	11.3	11.6	10.5	10.3	10.4
抗カンジダアルビカス - IgM	U/mg	13.8	13.3	13.7	13.9	13.1
抗エンテロコッカスフェーリス - IgG	U/mg	13.0	15.5	13.5	14.8	15.0
抗エンテロコッカスフェーリス - IgA	U/mg	11.3	10.5	10.1	9.7	9.6
抗エンテロコッカスフェーリス - IgM	U/mg	17.2	14.1	16.7	14.0	13.9
抗肺炎球菌多糖体 - IgG	U/mg	23.2	24.1	24.7	24.0	25.7
抗肺炎球菌多糖体 - IgA	U/mg	13.3	12.1	18.0	16.5	14.8
抗肺炎球菌多糖体 - IgM	U/mg	17.5	15.1	18.0	16.4	16.6

30

40

表3:UVC照射前及び様々なUVC線量を照射した後のIgM溶液についての分析結果

【0115】

この線量範囲内のUV照射では、免疫グロブリンのクラスの分布は影響を受けなかった

50

。H P S E Cにより分析した分子量分布パターンも変化しない。C Z Eにより分析した純度のレベルも変化しなかった。タンパク質分解活性 (P A)、プレカリクレインアクチベータ (P K A)、及び抗補体活性 (A C A)も変化しない。また、E L I S A法により測定した抗細菌活性は、全ての免疫グロブリンのクラスについて有意には変化しない。

【 0 1 1 6 】

漸増強度のU Vを照射したアリコートを最終産物まで更に処理し、同パネルの分析試験に付した。この試験でも、最終産物に有意な差はみられなかった。試験した抗体力価は全て、常に、U V C処理していない対照調製物の $100 \pm 10\%$ の範囲内である。

【 0 1 1 7 】

実施例 5 - V i b r o m i x e r / p H 4 処理及びU V C 処理の使用による全体的なウイルス減少 - ウイルス除去係数の決定

以下の3工程：V i b r o m i x e r で攪拌しながらオクタン酸処理する工程と、p H 4 処理工程と、U V C 処理 ($215 \text{ J} / \text{m}^2$) 工程とによるウイルス除去 / 不活化の検証を、以下のモデルウイルスを用いて実施した：C型肝炎ウイルスのモデルウイルスとしてのウシウイルス性下痢症ウイルス (B V D V)、ヒトヘルペスウイルスのモデルウイルスとしての偽狂犬病ウイルス (P R V)、ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1)、コロナウイルスとしてのウマ動脈炎ウイルス (E A V)、フラビウイルスのモデルウイルスとしてのシンドビスウイルス (S i n V)、A型肝炎ウイルスのモデルウイルスとしてのマウス脳脊髄炎ウイルス (M E V)、他の非エンベロープウイルスのモデルウイルスとしてのレオウイルス (R e o)、ヒトパルボウイルス B 1 9 のモデルウイルスとしてのブタパルボウイルス (P P V)。

【 0 1 1 8 】

以下の3工程：オクタン酸処理工程、p H 4 処理工程、及びU V C 処理工程を用いたこれら研究結果を以下の表 4 に示す。

【表 4】

モデルウイルス	BVDV	PRV	HIV-1	EAV	SinV	MEV	Reo	PPV
合計減少量 (log ₁₀)	>12.5	>10.1	>12.7	>8.4 ^a	>13.7 ^a	9.2	>11.0	>8.4

^a UVC照射工程の検証のためのデータを用いない減少係数

表4: IgM生産プロセスによる合計ウイルス減少量

【 0 1 1 9 】

公称孔径約 5 0 n m のフィルタを用いて更にナノ濾過して、ウイルスのサイズに依存して $17 \log_{10}$ 超まで合計減少量を増加させることにより更に安全性を高める。例えば、H I V - 1 では $17.5 \log_{10}$ 超に達したが、P P V は、ナノ濾過を行ってもそれ以上除去されなかった。

【 0 1 2 0 】

したがって、I g M 含有調製物では現在までウイルス不活化 / 減少量が $8 \log_{10}$ 超に達しており、本発明に係る精製手順により優れたウイルス安全性を有する I g M 調製物が得られる。これは、一般的に、サイズが小さく且つ脂質エンベロープが存在しないのでウイルス不活化及び除去手順に対する耐性が高い M E V、R e o、及び P P V 等の非エンベロープウイルスにとって特に重要である。

【 0 1 2 1 】

実施例 6 - オクタン酸処理に V i b r o m i x e r を用いる場合及び用いない場合の残存タンパク質分解活性の測定

V i b r o m i x e r を用いずに、ブレードスターラを用いて激しく標準的な攪拌を行いながら、実施例 1 及び並行実験と同様にオクタン酸処理を実施した。オクタン酸 / リン酸三カルシウム処理及び限外濾過 / 透析後のサンプルのタンパク質分解活性を、製造業者の説明書に従って発色基質 S - 2 2 8 8 (C h r o m o g e n i x 社製) を用いて測定した。2 5 m g の基質 S - 2 2 8 8 を 7 . 2 m L の注射用水に溶解させる。サンプルをバッ

10

20

30

40

50

ファ(100mMのTris/HCl(pH8.4)、106mMのNaCl)で希釈して、線形範囲でアッセイできるようにする。例えば、200μLのバッファと200μLのサンプル(混合及び37℃への温度調整)及び200μLの発色基質溶液とを混合する。分光光度計を用いて37℃で405nm(1分間~3分間)にて吸収動態を測定する。サンプルのタンパク質分解活性を、方程式 $C(U/L) = 313 \times Abs / 分 \times F$ (C = タンパク質分解活性、 F = 希釈倍率)を用いることにより初期吸収差($Abs / 分$)から計算する。

【表5】

	Vibromixerを用いないオクタン酸処理	Vibromixerを用いるオクタン酸処理
出発物質(U/L)	5630	5630
オクタン酸処理後の平均残存タンパク質分解活性(U/L)	42	< 8 (LOD)

10

【0122】

Vibromixerを使用したとき、オクタン酸処理後の濾液は澄んでいた。比較実験において、ブレードスターを用いてオクタン酸処理した後の濾液は、非常に不透明であり、濾過が困難であった。

20

【0123】

実施例7：本発明に係るIgM調製物における抗細菌力価

唯一市販されている静脈内耐性IgM含有調製物であるPentaglobinと比較するために、この十分に確立されている薬剤3バッチで抗細菌活性を分析し、本発明に係る調製物と比較した。抗細菌抗原又は抗真菌抗原に対するIgM調製物中におけるIgA又はIgMクラスの抗体をELISAにより測定した。対応する抗原でマイクロタイタープレートをコーティングし、標準物質又はIgM調製物と共にインキュベートした。抗原に結合している抗体を抗ヒトIgA又は抗ヒトIgMコンジュゲートで検出した。酵素の基質を用いることにより検出を行った。生じる色の変化は、IgM調製物中に存在する抗体の量に対応する。

30

【表6】

パラメータ	単位	本発明のIgM調製物の平均	市販製品Pentaglobinの平均
肺炎球菌多糖体に対するIgM抗体	U/mg IgM	72	21
大腸菌に対するIgM抗体	U/mg IgM	62	39
エンテロコッカスフェカリスに対するIgM抗体	U/mg IgM	69	27
カンダアルビカスに対するIgM抗体	U/mg IgM	61	41
クラミアに対するIgM抗体	U/mg IgM	71	6

40

表6: 本発明に係る調製物及び市販のPentaglobinにおけるIgMの抗細菌結合活性の比較

【表 7】

パラメータ	単位	本発明のIgM調製物の平均	市販製品Pentaglobinの平均
肺炎球菌多糖体に対するIgA抗体	U/mg IgA	86	25
大腸菌に対するIgA抗体	U/mg IgA	83	26
エンテロコッカスフェカリスに対するIgA抗体	U/mg IgA	93	21
クラミジアに対するIgA抗体	U/mg IgA	65	38
ヘルシバクターヒロリに対するIgA抗体	U/mg IgA	59	24

10

表7: 本発明に係る調製物及び市販のPentaglobinにおけるIgAの抗細菌結合活性の比較

【0124】

新規調製物におけるIgM及びIgA媒介活性は、典型的に、Pentaglobinの少なくとも1.5倍高かったが、これは、Pentaglobin中のIgM及びIgAがγ-プロピオラクトンで化学的に修飾されているという事実により説明することができる。この工程は、本発明に係るより穏やかな手順により置換される。

【0125】

これらデータは、全体的に、最終調製物中のIgM分子の結合領域が機能的に完全に活性であることを示す。

20

【0126】

実施例8：液体IgM生成物を用いた保存安定性試験

UV処理を行わなかった実施例1の生成物を、2～8℃にて10mL又は100mLのガラスバイアル（充填体積5mL又は50mL）中で保存し、仕様に従って全てのパラメータについて分析した。結果を表8に示す。安定性に関連するパラメータは、高速サイズ排除クロマトグラフィー（HPLC）を用いて測定する凝集体及び断片の含量、タンパク質分解活性（PA）、並びに抗補体活性（ACA）である。これらパラメータは、静脈内耐性にとって重要であり、長期保存中に変化しやすい。2～8℃では、これらパラメータに有意な変化はみられなかった。室温（23～27℃）保存した場合でさえも、これら値は仕様の範囲内であったが、室温で24ヶ月間保存した後は断片が僅かに増加する。着色、オパール光、pH値等の他のパラメータについても測定したが、全試験期間に亘って変化していなかった。様々な細菌に対するIgM及びIgAの力価は、2～8℃で2年間に亘って安定である。

30

【0127】

また、UV処理を行った実施例1の生成物を、2～8℃及び室温にて10mL又は100mLのガラスバイアル（充填体積5mL又は50mL）中で保存し、仕様に従って全てのパラメータについて分析した。結果を表9に示す。この進行中の安定性試験では、現在入手可能な12ヶ月間のデータは、UV処理を行わなかった生成物と同じ安定性プロファイルを示しているため、24ヶ月間安定であると推定できる。

40

【表 8】

試験したパラメータ	要件 (許容値)	2°C~8°Cで保存(月)							23°C~ 27°C
		0	3	6	9	12	18	24	24
タンパク質(g/L)	45-55	50.3	51.4	50.3	50.4	50.5	49.6	50.8	49.8
HPSEC									
>1200kDの凝集体の割合(%)	≤5	0.9	0.6	0.5	0.8	0.6	1.0	1.3	1.7
<100kDの断片の割合(%)	≤5	0.2	0.6	1.1	0.7	1.6	0.9	1.2	4.1
タンパク質分解活性 (U/L)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
免疫グロブリン含量 (%)	> 95 %	96.7	99.0	100	n.t.	99.5	n.t.	98.4	97.5
IgM含量	≥20 %	21.6	22.1	22.1	n.t.	22.3	n.t.	20.9	20.5
抗補体活性 (CH50/mg タンパク質)	≤1.0	0.48	0.56	0.48	0.66	0.70	0.64	0.54	0.38

n.t.=試験せず

表8: 横にした状態で2°C~8°Cにて試験したバッチA586067の安定性 充填体積:5mL

【表 9】

試験したパラメータ	要件 (許容値)	2°C~8°Cで保存(月)							23°C~ 27°C
		0	3	6	9	12	18	24	24
タンパク質(g/L)	45-55	50.2	50.8	49.7	50.4	50.3	49.4	50.3	49.7
HPSEC									
>1200kDの凝集体の割合(%)	≤5	0.9	0.5	0.4	0.8	0.6	1.0	1.3	1.5
<100kDの断片の割合(%)	≤5	0.3	0.6	1.0	0.9	1.4	1.2	1.2	4.2
タンパク質分解活性 (U/L)	< 8	< 8	< 8	< 8	n.t.	< 8	n.t.	< 8	< 8
免疫グロブリン含量 (%)	> 95 %	98.6	98.9	100	n.t.	99.5	n.t.	98.5	98.0
IgM含量	≥20 %	21.3	22.3	24.5	n.t.	22.0	n.t.	20.9	20.1
抗補体活性 (CH50/mg タンパク質)	≤1.0	0.48	0.82	0.52	0.64	0.68	0.48	0.60	0.40

表9: 横にした状態で2°C~8°Cにて試験したバッチA586057の安定性 充填体積:50mL

【 0 1 2 8 】

実施例 9 : I g M 生成物によるインビトロにおける非特異的な補体活性化

実施例 9 A : C 5 a 濃度の測定

末端補体経路の活性化のマーカーとしてC5a因子を用いて、インビトロにおいて非特異的に補体を活性化するI g M調製物の能力の分析を実施した。この目的のために、ヒト血清を免疫グロブリン製品又はバッファと共に120分間インキュベートした。0分間、5分間、15分間、60分間、及び120分間インキュベートした後にサンプルを採取した。インビトロ系が適切に機能していることを示すために、補体阻害及び補体系の完全活性化を示した。市販の酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)キット(Quidel社製 MicroVue C5a Plus EIA Kit; A025)を用い、光度計による吸光度測定を行って補体因子の濃度を測定した。

【 0 1 2 9 】

ヒト血清(Quidel社製 NHS; A113)を37°Cで急速に解凍させ、直ちに氷上に置いた。全ての単一サンプルは、血清を含有する反応バッチ(100µL)からなっていた。まず、添加剤をピペティングして添加し、次いで、ヒト血清を添加して、全ての反応バッチで反応を開始させた。

【 0 1 3 0 】

任意の添加剤を含まないヒト血清は、ブランクとして機能し、実験設定に起因するベースラインの補体活性化を示した。熱凝集I g G(HAAG Quidel社製; A114; 1.3µL)の添加は、インビトロ系の応答性を示すためのヒト血清補体の強力なアクチベータとして機能した。EDTA(最終濃度10mM)は、全反応時間及び実験処理について補体活性化を完全に阻害するためにヒト血清に添加した。各反応において、I g M調製物、Pentaglobin(欧州特許第0013901号明細書)及びI g M調製物(欧州特許第0413187号明細書)のI g M濃度を1.72mg/mLに調整した

10

20

30

40

50

。ネガティブコントロールとして、それぞれの体積の製剤バッファを用いた。

【0131】

安定化溶液（Quidel社製 サンプル安定化剤A9576；140 μ L）を添加することにより、常時攪拌しながら37 $^{\circ}$ Cで0分間、5分間、15分間、60分間、及び120分間インキュベートした後、全ての反応を停止させた。次いで、サンプルを希釈し、製造業者の説明書に従ってELISA分析を実施した。2つの別々の複製物を用いて実験を実施し、平均値を計算した。結果を表10及び図2に示す。

【0132】

アクチベータ（熱凝集IgG）の添加により、15分間以内にC5aが大きく増加した。これは、補体活性化を検出するためにインビトロ系が高感度で応答することを示す。阻害剤としてEDTAを添加しても、全インキュベート時間に亘って値は変化せず、これは、補体活性化が特異的であり、且つサンプルの取扱又は調製に起因するアーティファクトではないことを示す。37 $^{\circ}$ Cでヒト血清をインキュベートし、人工表面に曝露すると、ブランク値として記録される僅かな補体活性化が誘導される。

10

【0133】

欧州特許第0413187号明細書に係るIgMレファレンス調製物では、60分間後に1,000ng/mL超まで補体が活性化される（表10）。しかし、市販の化学的に修飾されているレファレンス調製物であるPentaglobin（欧州特許第0013901号明細書）は、欧州特許第0413187号明細書に係る生成物に比べて半分の補体活性化能しか示さなかった。

20

【0134】

本発明に係るIgM調製物で処理した血清中のC5a濃度は、添加剤を含まない血清（ブランク）又は製剤バッファ（300mMのグリセリン（pH4.3）又は0.45%のNaCl/2.5%のグルコース（pH6.8））で処理した血清において測定されたC5a濃度と同程度である。したがって、本発明に係るIgM調製物中の免疫グロブリンは、実質的に、インビトロ試験系においてヒト血清中の補体を非特異的に活性化するものではない。

【表10】

時間[分]	0	5	15	60	120
IgM調製物(本発明) C5a [ng/mL]	23.8	42.0	110.5	162.0	150.8
Pentaglobin (EP0013901) C5a [ng/mL]	46.4	55.4	329.2	460.9	653.5
EP0413187生成物 C5a [ng/mL]	21.1	149.5	423.2	1029.4	1084.2
対照					
ブランク C5a [ng/mL]	22.3	30.7	66.2	149.5	168.1
アクチベータ(IgGポリマー) C5a [ng/mL]	19.4	897.6	3409.2	4536.1	4829.6
阻害剤 EDTA C5a [ng/mL]	25.9	22.3	25.5	23.8	27.5
製剤バッファIgM C5a [ng/mL]	19.8	35.5	101.2	112.8	173.4
製剤バッファPentaglobin C5a [ng/mL]	26.2	33.1	56.7	82.6	187.2

30

40

表10: IgMを含有する免疫グロブリンで処理したヒト血清中で検出された平均C5a濃度

【0135】

実施例9B：C3a濃度の測定

補体経路の活性化のマーカーとしてC3a因子を用いて、インビトロにおいて非特異的に補体を活性化するIgM調製物の能力の分析を実施した。この目的のために、ヒト血清

50

を免疫グロブリン製品又はバッファと共に120分間インキュベートした。0分間、5分間、15分間、60分間、及び120分間インキュベートした後にサンプルを採取した。インビトロ系が適切に機能していることを示すために、補体阻害及び補体系の完全活性化を示した。市販の酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)キット(Quidel社製 MicroVue C3a Plus EIA Kit; A032)を用い、光度計による吸光度測定を行って補体因子の濃度を測定した。

【0136】

ヒト血清(Quidel社製 NHS; A113)を37℃で急速解凍させ、直ちに氷上に置いた。全ての単一サンプルは、血清を含有する反応バッチ(100µL)からなっていた。先ず、添加剤をピペティングして添加し、次いで、ヒト血清を添加して、全ての反応バッチで反応を開始させた。

10

【0137】

任意の添加剤を含まないヒト血清は、ブランクとして機能し、実験設定に起因するベースラインの補体活性化を示した。コブラ毒素因子(CVF Quidel社製; A600; 20U/mL)の添加は、インビトロ系の応答性を示すためのヒト血清補体の強力なアクチベータとして機能した。EDTA(最終濃度10mM)は、全反応時間及び実験処理について補体活性化を完全に阻害するためにヒト血清に添加した。各反応において、IgM調製物及びPentaglobin(欧州特許第0013901号)のIgM濃度を1.72mg/mLに調整した。ネガティブコントロールとして、それぞれの体積の製剤バッファを用いた。

20

【0138】

安定化溶液(Quidel社製 サンプル安定化剤A9576; 140µL)を添加することにより、常時攪拌しながら37℃で0分間、5分間、15分間、60分間、及び120分間インキュベートした後、全ての反応を停止させた。次いで、サンプルを希釈し、製造業者の説明書に従ってELISA分析を実施した。2つの複製物を用いて独立に実験を実施し、平均値を計算した。結果を表11及び図3に示す。

【0139】

アクチベータ(CVF)の添加により、15分間以内にC3aが大きく増加し、これは、補体活性化を検出するためにインビトロ系が高感度で応答することを示す。阻害剤としてEDTAを添加しても、全インキュベート時間に亘って値は変化せず、これは、補体活性化が特異的であり、且つサンプルの取扱又は調製に起因するアーティファクトではないことを示す。37℃でヒト血清をインキュベートし、人工表面に曝露すると、ブランク値として記録される僅かな補体活性化が誘導される。市販の化学的に修飾されているレファレンス調製物であるPentaglobin(欧州特許第0013901号明細書)は、ブランクと比べて3倍高いC3活性化能を示した。

30

【0140】

本発明に係るIgM調製物で処理した血清中のC3a濃度は、添加剤を含まない血清(ブランク)又は製剤バッファ(300mMのグリセリン(pH4.3)又は0.45%のNaCl/2.5%のグルコース(pH6.8))で処理した血清において測定されたC3a濃度と同程度である。したがって、本発明に係るIgM調製物中の免疫グロブリンは、実質的に、インビトロ試験系においてヒト血清中の著しい量の補体を非特異的に活性化するものではない。

40

【表 1 1】

時間[分]	0	5	15	60	120
IgM調製物(本発明) C3a [ng/ mL]	1458.3	2484.1	3972.1	5280.7	5703.1
Pentaglobin (EP0013901) C3a [ng/ mL]	1371.9	3069.4	7585.9	10225.4	11769.5
対照					
ブランク C3a [ng/ mL]	1301.1	1742.6	2468.7	3361	4117.4
アクチベータ(CVF) C3a [ng/ mL]	1194.3	6077.1	12796.8	27679.1	27284.5
阻害剤 EDTA C3a [ng/ mL]	1140.2	1098.0	1025.7	964.2	1004.8
製剤バッファIgM C3a [ng/ mL]	1060.3	2262.3	2907.3	3480.7	4435.4
製剤バッファPentaglobin C3a [ng/mL]	1070.9	1965.8	3548.0	4008.1	5251.9

10

表 11: IgMを含有する免疫グロブリンで処理したヒト血清中で検出された平均C3a濃度

【 0 1 4 1】

実施例 1 0 I g M 生成物を用いたインビトロ実験

安全性及び忍容性を確認するために、5日間に亘って反復静脈内注射した後の動脈圧に対するI g M調製物の影響を8頭の覚醒カニクイザルで試験した。190mg / I g M / kg / 日の用量の本明細書に記載の方法に従って調製したI g M調製物を投与した。比較物質として、市販の静脈内耐性I g M含有調製物であるPentaglobinを何頭かのサルに投与した。同用量のI g Mを投与する方法でPentaglobinを投与した。投与により、許容できないレベルの非特異的な補体活性化が起こっているかどうかを調べるために、注射後の血圧を測定した。免疫グロブリン調製物を投与する数時間前に、対照用量の0.9%NaClを動物に投与した。右大腿動脈を介して下腹部大動脈に圧力カテーテルを挿入することにより血圧を測定した。結果をテレメトリーにより送信した。

20

【 0 1 4 2】

I g M調製物(15mL / kg / 日)の投与は、動脈圧(平均、収縮期、及び拡張期)に対して僅かな影響しか与えなかった。予備試験の値と比較した各注射の4時間後までの差は、4mmHgを超えなかった。これら差を、生物学的に関連しているとみなすことはできない。

30

【表 1 2】

	対照(0.9% NaCl, pH 4.5) C3a [ng/mL]	IgM調製物の投与 C3a [ng/mL]
平均	229	240
SD	83	37
N	8	8

40

表 12a: IgM調製物投与後のC3a濃度[ng/mL]

【表 13】

	対照(0.9% NaCl, pH 6.8) C3a [ng/mL]	IgM調製物の投与 C3a [ng/mL]
平均	204	263
SD	20	61
N	4	4

表12b: レファレンス調製物Pentaglobin投与後のC3a濃度[ng/mL]

【0143】

補体経路の非特異的な活性化のマーカーとして注射後に採取した血漿サンプル中のC3a濃度を測定した。C3a濃度[ng/mL]は、IgM調製物を投与しても僅かに増加するのみであり(15mL/kgBW)、IgMと等量の市販のレファレンス調製物Pentaglobinによる増加よりも更に少なかった。処理の約6時間後に血液をサンプリングした。

10

【0144】

IgM調製物に起因する実質的な毒物学的所見はみられず、Pentaglobinではみられなかった明らかな変化も生じなかった。Pentaglobinの安全性は長年に亘る臨床試験で十分に確立されているので、これら変化が任意の臨床的関連性を有しないと結論付けるのが合理的である。

20

【0145】

また、IgM調製物の優れた忍容性及び安全性は、24人の健常男性及び女性のボランティアにおけるヒトの第I相試験でも検証された。投与の最初の4時間後における収縮期血圧は、平均して、0.5mL/分で91mg~274mgのIgM調製物/kgBW/日を注射した後、約9%(11.9mmHg)しか低下しなかった。

【0146】

これは、プラセボである0.9%NaCl溶液と同程度であった(9.4%、11.7mmHg)。

【0147】

重篤な有害事象は記録されず、全ての重篤ではない有害事象は自己制限的であった。更に、PCT測定により示される通り、感染因子の伝染の証拠は存在しなかった。

30

【0148】

関連疾患の動物モデルにおける有効性試験の有用性は、免疫原性及びヒト血漿から得られたIgM調製物中で予め形成されているGal抗体により制限されることに留意すべきである。しかし、疾患の治療におけるPentaglobinの使用に関する先行技術の知見及び本発明の方法により調製されるIgM調製物の抗細菌抗体力価(実施例7に示す)を鑑みて、IgM調製物は臨床的有效性を有すると結論付けることができる。

【0149】

実施例11 抗体調製物のFc部分の機能的完全性

本明細書に記載の方法に従って調製した抗体調製物中の抗体のFc部分の機能的完全性を、IgG調製物に関するEuropean Guidelines ICH S6(CPMP/ICH/302/95)(バイオテクノロジー応用医薬品の非臨床における安全性評価に関する指針)に従って、現行の欧州薬局方法(2.7.9 免疫グロブリンのFcの機能についての試験、欧州薬局方、現行版、2011年4月)を用いて分析した。免疫グロブリンに関する欧州薬局方のモノグラフ(01/2005:20709)は、免疫グロブリンのFc機能について風疹抗原に基づく試験を推奨している。

40

【0150】

具体的には、タンニン酸処理済O型ヒト赤血球を風疹ウイルス抗原でロードする。特定の体積の抗体調製物を、抗原で被覆された血球と共にインキュベートした。モルモットの補体を添加することにより、補体によって開始される血球の溶解を開始させた。541n

50

mにおける吸光度の時間依存性変化を用いて、その後の溶血速度を測定した。時間当たりの吸光度の最大変化を用いて評価を行った。ヒト免疫グロブリン生物学的レファレンス調製物；BRPバッチ番号3を比較物質として用いた。

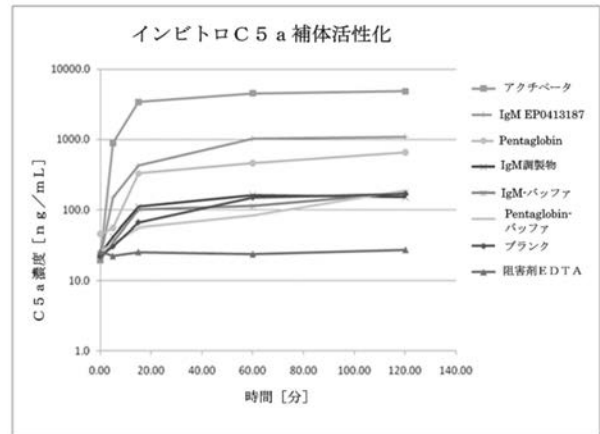
【0151】

抗体分子のFc部分の活性を、7バッチのIgM含有抗体調製物で測定したところ、全てのバッチにおいて、生物学的レファレンス調製物（BRP）に比べて96.5%～103.3%であった。したがって、IgM含有抗体調製物の機能が証明された。

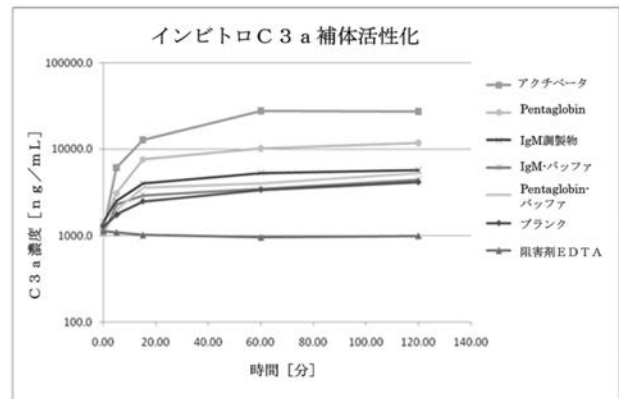
【図1】



【図2】



【図3】



【手続補正書】

【提出日】平成28年7月11日(2016.7.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体の総量に対し、少なくとも15重量%のIgMと、5重量%超のIgAと、40重量%超のIgGとを含み、

高速サイズ排除クロマトグラフィーにより測定される総免疫グロブリン含量における1,200kDa以上の凝集体の含有量が1.5%未満である抗体調製物。

【請求項2】

抗補体活性が1.0CH50/mgタンパク質未満である請求項1に記載の抗体調製物。

【請求項3】

抗補体活性が0.75CH50/mgタンパク質未満である請求項2に記載の抗体調製物。

【請求項4】

調製物中の抗体の少なくとも90%が生物学的に活性であり、前記生物学的活性がEur.Ph.2.7.9免疫グロブリンのFc機能のための試験により測定される請求項1から3のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項5】

ヒトにおける静脈内投与に適した抗体調製物であって、ヒト血漿から調製され、特異的な補体活性化活性を有し、非特異的な補体活性化能の測定に適したヒト血清を用いるインビトロアッセイにおいて、C5a及びC3aの少なくともいずれかを実質的に産生しない請求項1から4のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項6】

安定化剤を含む請求項1から5のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項7】

安定化剤がグリシンである請求項6に記載の抗体調製物。

【請求項8】

1.72mg/mLのIgM濃度に調整された抗体調製物が、アッセイの60分間後に産生するC5aが200ng/mL未満である請求項5から7のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項9】

1.72mg/mLのIgM濃度に調整された抗体調製物が、アッセイの60分間後に産生するC3aが6,000ng/mL未満である請求項5から8のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項10】

インビトロ血清アッセイにおいて、ヒト血清を含む抗体調製物が、ヒト血清単独の場合の±70%と同量のC5a及びC3aの少なくともいずれかを産生する請求項5から9のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項11】

抗体調製物がC5aを実質的に産生しないことを判定するインビトロ血清アッセイが、次の工程：

(a)抗体調製物を100μLのヒト血清に添加して1.72mg/mLのIgMを含有する反応混合物を調製し、該反応混合物を37℃で60分間、定速攪拌下にてインキュベートする工程；

(b) ELISAに適した前記反応混合物の希釈系列を調製する工程；
(c) C5aに対する一次抗体及び二次抗体並びに発色性物質を用いて、前記反応混合物の希釈系列に対してサンドイッチELISAを行う工程であって、前記二次抗体は、酵素とコンジュゲートされており、前記発色性物質は、前記酵素の基質である工程；
(d) 前記発色性物質を、前記二次抗体を介してC5aと結合した前記酵素に接触させた結果生じる色の変化に基づいて前記反応混合物中のC5aの量を測定する工程；
を含む請求項5から10のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項12】

抗体調製物がC3aを実質的に産生しないことを判定するインビトロ血清アッセイが、次の工程；

(a) 抗体調製物を100 μ Lのヒト血清に添加して1.72mg/mLのIgMを含有する反応混合物を調製し、該反応混合物を37 $^{\circ}$ Cで60分間、定速攪拌下にてインキュベートする工程；

(b) ELISAに適した前記反応混合物の希釈系列を調製する工程；

(c) C3aに対する一次抗体及び二次抗体並びに発色性物質を用いて、前記反応混合物の希釈系列に対してサンドイッチELISAを行う工程であって、前記二次抗体は、酵素とコンジュゲートされており、前記発色性物質は、前記酵素の基質である工程；

(d) 前記発色性物質を、前記二次抗体を介してC3aと結合した前記酵素に接触させた結果生じる色の変化に基づいて前記反応混合物中のC3aの量を測定する工程；
を含む請求項5から11のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項13】

免疫グロブリン含量が、総タンパク質含量の95%超である請求項1から12のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項14】

10分間超の40 $^{\circ}$ C以上での熱処理工程を行うことなしに、ヒト血清から調製される請求項1から13のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項15】

抗体の化学的又は酵素的修飾を伴う工程を行うことなしに、ヒト血清から調製される請求項1から14のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項16】

化学的修飾の工程が、抗体を β -プロピオラクトンに接触させる工程である請求項15に記載の抗体調製物。

【請求項17】

投与前のレベルから10%超の動脈圧の低下を伴うことなしに、カニクイザルに115mg IgM/kg BW/hrで投与することが可能である請求項1から16のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項18】

Fc機能の測定に適した風疹抗原を用いるインビトロアッセイにおいて、抗体調製物の抗体のFc部分の活性が生物学的レファレンス調製物の活性の $\pm 10\%$ と同等である請求項1から17のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項19】

請求項1から18のいずれかに記載の抗体調製物をヒト血漿から調製する方法であって

(a) ヒト血漿から血漿画分を免疫グロブリン含有溶液として調製する工程；

(b) オクタン酸を前記溶液と混合し、該混合溶液を振動式攪拌機で処理して混入タンパク質を沈殿させる工程；

(c) 沈殿した前記タンパク質を前記溶液から分離してIgM含有免疫グロブリン組成物を得る工程；

(d) 前記IgM含有免疫グロブリン組成物を、pH3.5～pH4.5の範囲でインキュベートしてインキュベート溶液を得る工程；

(e) 前記インキュベート溶液に U V C を照射して U V C 照射溶液を得る工程 ; 及び
(f) 前記 U V C 照射溶液を滅菌条件下で濾過してヒトにおける静脈内投与に適した抗体
調製物を得る工程 ;
を含む方法。

【請求項 2 0】

医薬において使用するための請求項 1 から 1 8 のいずれかに記載の抗体調製物。

【請求項 2 1】

免疫障害又は細菌感染症の治療において使用するための請求項 2 0 に記載の抗体調製物

。

【請求項 2 2】

免疫障害が I g M 欠乏症である請求項 2 1 に記載の抗体調製物。

フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/531 (2006.01)			G 0 1 N	33/53		D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)			G 0 1 N	33/531		A
			G 0 1 N	33/531		B
			G 0 1 N	33/543	5 4 5 S	
(72)発明者	ディーター・ラドニック					
	ドイツ連邦共和国	6 3 3 0 3	ドライアイヒ	イン	デア	ノイエン
						ラッハ 3
(72)発明者	オリバー・マネク					
	ドイツ連邦共和国	6 1 3 5 2	バート	ホンブルク	リンデンシュトラーセ	2 4
(72)発明者	ミハエル・ロデマー					
	ドイツ連邦共和国	6 3 1 1 0	ロートガウ	ヴァイスキルヒェンシュトラーセ		6 1
(72)発明者	マティアス・ゲルマー					
	ドイツ連邦共和国	6 3 2 2 5	ランゲン	テオドール・ホイス	- シュトラーセ	1
(72)発明者	ファイト・ブラウン					
	ドイツ連邦共和国	5 5 1 2 2	マインツ	アム	フォールト	ゴンゼンハイム
						5 7 エー
Fターム(参考)	4C085	AA13	BB33	BB36	BB37	BB42
			CC14	DD10	DD11	DD31
			DD37	DD41	DD51	DD59
			EE01	GG02		
	4H045	AA11	AA20	AA30	BA10	CA40
			DA75	EA20	FA71	

专利名称(译)	抗体调制物		
公开(公告)号	JP2016222674A	公开(公告)日	2016-12-28
申请号	JP2016118887	申请日	2016-06-15
[标]申请(专利权)人(译)	生物测试股份公司		
申请(专利权)人(译)	生物测试激活连接Gezerushiyafuto		
[标]发明人	ヴォルフガング・メーラー ディーター・ラドニツク オリバー・マネク ミハエル・ロデマー マティアス・ゲルマー ファイト・ブラウン		
发明人	ヴォルフガング・メーラー ディーター・ラドニツク オリバー・マネク ミハエル・ロデマー マティアス・ゲルマー ファイト・ブラウン		
IPC分类号	C07K16/00 A61K39/395 A61P37/02 A61P31/04 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	A61K9/0019 A61K39/39591 A61K47/183 A61K2039/507 A61P31/00 A61P31/04 A61P37/00 A61P37/02 C07K16/065 C07K16/121 C07K16/1232 C07K16/125 C07K16/1275 C07K16/14 C07K2317/21 A61K9/08 A61K38/17 A61K38/18 A61K39/00 A61K39/39 A61K39/395 A61K47/42 A61K49/16 C07K14/435 C07K14/475 C07K16/06 C07K16/18 C07K16/22 C07K16/24 A61K39/39516 A61K39/39525 A61K2300/00 C07K1/30 C07K16/1267 C07K2317/76		
FI分类号	C07K16/00 A61K39/395.D A61P37/02 A61P31/04 A61K39/395.W G01N33/53.D G01N33/531.A G01N33/531.B G01N33/543.545.S		
F-TERM分类号	4C085/AA13 4C085/BB33 4C085/BB36 4C085/BB37 4C085/BB42 4C085/CC14 4C085/DD10 4C085/DD11 4C085/DD31 4C085/DD37 4C085/DD41 4C085/DD51 4C085/DD59 4C085/EE01 4C085/GG02 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA71		
代理人(译)	广田幸一		
优先权	2010006753 2010-04-22 GB		
其他公开文献	JP6612186B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供含有具有特异性补体激活活性但具有非特异性补体激活能力的IgM的抗体（免疫球蛋白）制剂。一种适用于人静脉内给药的抗体制剂，其包含IgG，IgA和IgM抗体，其抗体量至少为抗体总量的5%，由人血浆和特定补充剂制备。一种抗体制剂，其具有体活化活性，并且在体外测定中基本上不产生C5a和C3a中的任何一种，使用适于测量非特异性补体活化能力的人血清。【选择图】无

【表1】

	オクタン酸反応 標準的な攪拌 [log ₁₀ 減少]	オクタン酸反応 Vibromixerで攪拌 [log ₁₀ 減少]
PPV	2.15 ± 0.32	3.39 ± 0.36
REO	2.34 ± 0.38	5.46 ± 0.28
SV40	2.05 ± 0.4	4.71 ± 0.34