

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>6</sup>

C07K 16/06

A61K 39/395

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97198762.9

[43]公开日 1999年10月27日

[11]公开号 CN 1233258A

[22]申请日 97.10.14 [21]申请号 97198762.9

[30]优先权

[32]96.10.14 [33]EP [31]96810690.6

[86]国际申请 PCT/CH97/00388 97.10.14

[87]国际公布 WO98/16558 德 98.4.23

[85]进入国家阶段日期 99.4.13

[71]申请人 瑞士红十字会创立血液捐赠服务中央实验室

地址 瑞士伯尔尼

[72]发明人 M·伦特施

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 温宏艳

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 用于制备静脉内给药的 IgM 制剂的方法

[57]摘要

本发明涉及一种制备适于静脉给药的免疫球蛋白溶液的方法,该溶液的 IgM 部分以免疫球蛋白部分计多于 5 重量%,该方法包括用蛋白酶处理含有 IgM 的免疫球蛋白溶液,如此获得的静脉可耐受制剂的特征在于,是不经化学修饰的,并且具有低的抗补体的活性 ACA。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

## 权 利 要 求 书

1. 用于制备可静脉给药的多克隆, 非化学修饰的免疫球蛋白制剂的方法, 所述制剂中 IgM 一部分以总免疫球蛋白部分计多于 5 重量%, 且具有低的抗补体活性, 其特征在于, 相应的含有 IgM 的血浆部分的水悬液用蛋白酶处理。  
5
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 该制剂显示具有 <500 CH 50/g 蛋白质, 优选 <200 CH 50/g 蛋白质, 特别是 <150 CH 50/g 蛋白质的抗补体活性。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其特征在于, 含有 IgM 的血浆部分的水溶液或悬浮液在酸性 pH 值下, 在加入蛋白酶, 在至少 15°C 温度下温育。  
10
4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 温育温度为 20 至 50°C, 优选 35 至 40°C。
5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法, 其特征在于, 温育时间为 1 至 48 小时, 优选 6 至 12 小时。  
15
6. 根据权利要求 1 至 5 之一所述的方法, 其特征在于, 含有 IgM 的血浆部分的水溶液或悬浮液中蛋白酶浓度至少是 50 U/g 蛋白质, 优选 300 至 1200 U/g 蛋白质。
7. 根据权利要求 1 至 6 之任一所述的方法, 其特征在于, 含有 IgM 的血浆部分的水溶液或悬浮液经受蛋白酶处理时的 pH 值是 3.5 至 5.5, 优选 3.7 至 4.3。  
20
8. 根据权利要求 1 至 7 之任一的方法, 其特征在于, 蛋白酶是一内肽酶 (Endopeptidase)。
9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其特征在于, 蛋白酶是至少一种内肽酶, 其选自胃蛋白酶、番木瓜蛋白酶、血纤维蛋白溶酶或嗜热菌蛋白酶, 其任意地固定在载体上。  
25
10. 根据权利要求 1 至 9 之任一的方法, 其特征在于, 含有 IgM 的血浆部分的水溶液或悬浮液的离子强度 <0.1, 优选 <0.04。

# 说明书

## 用于制备静脉内给药的 IgM 制剂的方法

5 本发明涉及一种用于制备适于静脉给药的免疫球蛋白溶液的方法。人或动物血液中包含的蛋白质组分用作出发材料，该组分含有浓缩形成的免疫球蛋白。

免疫球蛋白在人和哺乳动物防御感染的免疫系统中起重要作用。免疫球蛋白被分类为具有不同的生化和生理特性的不同类型（如 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE）。直到 1980 年仅分离了 IgG，并用作用于预防  
10 和治疗的适于静脉给药的制品。在 EP-A-0013901、EP-A-0413187 和 EP-A-0352500 中描述了 IgM 制品，该制品主要是通过用  $\beta$ -丙酮酸内酯处理。使之适用静脉内给药。EP-A-0413188 描述了一种方法，其中通过选择性洗脱静脉适用的组分的离子交换层析来达到静脉适用性。

15 本发明的目的是制备一种高纯度的适用于静脉内给药的 IgM 浓缩剂以用于治疗 and 预防。该制品在型模型中应当展示低的抗补体活性 (ACA) 和低的血压下降，但是 IgM 分子是未经化学修饰的。该发明目的令人惊讶地通过用蛋白酶处理含有 IgM 的免疫球蛋白溶液实现。

因此如前所述本发明的主题是如权利要求 1 所定义的方法。

20 优选地，蛋白酶处理在较高温度下，在胃蛋白酶、番木瓜蛋白酶、血纤维蛋白溶酶或嗜热菌蛋白酶的存在下温育完成。蛋白酶可以是化学修饰的，固定化在载体上和/或基因工程技术制备的。按照本发明的方法获得的制剂可以从可静脉给药的溶液形式递送。这样的制品在大鼠模型中显示出 ACA，血压下降的消失，以及 C1q 结合活性。

25 适用于本发明的方法的出发材料是含有免疫球蛋白的溶液，如血浆、来自 Kistler-Nitschmann 级分的沉淀 A 或 B；Cohn 组分 I/II/III；II/III，III 或其他来自人或动物血浆的含有 IgM 的血浆组分。例如一种含有免疫球蛋白的组分，即 Kistler-Nitschmann 的沉淀 B，溶于缓冲液中，其大多数杂质通过 pH 4 至 6 优选 5 的 0.5 至 5% 的辛酸  
30 沉淀而去掉，随后将该溶液在低离子强度下，在 20 至 50°C，优选 37°C，加入至少 50 U/g 胃蛋白酶，优选 600 U/g 温育 1 至 48 小时，优选 9 小时。

为进一步纯化，可将溶液吸附，例如借助于含有 DEAE 基团的凝胶的床或柱的方法。为了进一步提高终产物中的 IgM 浓度，应将含有 IgM 的溶液上样于离子交换柱（如 TMAE - Fraktogel<sup>®</sup>）。通过选择性洗脱，如借助于盐或 pH 梯度可分离 IgM 组分。通过超滤和透析过滤，如凝胶过滤，可将溶液浓缩和将电解质含量基于最终的适于静脉给药的制剂进行调整。蛋白质浓度总计 1 至 20%，优选 3 至 6%，该产品另外还可含有蛋白质，如白蛋白，以及糖，优选葡萄糖或蔗糖或者是氨基酸。

为评价免疫球蛋白制剂的静脉可给药性通常应考虑抗补体活性 (ACA)。为测定 ACA，将一定量的待测产品和一定量的豚鼠补体温育，并滴定剩余补体的量。ACA 定义为每克免疫球蛋白的 CH 50 需用量。给出的 ACA 的结果进而按 M. Mayer 发表的方法确定 (Mayer, M. M. (1961), 补体和补体固定, 见实验免疫化学, 第 2 版, pp 132-240, C Thomas, Springfield, II)。可静脉给药的 IgG 产品的近似值被认为其 ACA 是 <1000 CH 50 每克蛋白质。

为评定可静脉给药性，可进而衡量 C1q 补体组分在免疫球蛋白上的结合。为进行测量，将一定量的待测产品和一定量纯化的、放射性标记的 C1q - 补体在缓冲液和血清中温育，待测产品的 C1q - 结合活性通过在聚乙二醇存在的条件下沉淀而测定。沉淀中放射活性越高，该产品的 C1q - 结合活性越高。通过此种方法精确地证明了 C1q 结合活性，对产品进行定性，其中 C1q 用两种不同的方法进行放射标记。一方面，在可能温和的条件下采用乳过氧化物酶 (LPO)；另一方面，在强氧化条件下采用氯胺 T (CT)。该研究进一步按 P. Späth 发表的方法进行 P. J. Späth, A. Corvetta, U. E. Nydegger, R. Büttler 使用乳过氧化物酶和氯胺 T 碘标 C1q 进行的持续的 C1q - 结合测试, Scand 免疫学杂志 18, 319-328, 1983)。期待一种完整的，可静脉给药的制剂，其 C1q 结合活性尽可能地低。一种用于测定免疫球蛋白的可静脉给药性的模型是 Bleaher 等人的大鼠模型 [W. K. Bleeker, J. Agterbery, G. Rigter, A. de Vries-Van Rossen, J. C. Bakker: 用于检测免疫球蛋白制剂的低血压副作用的动物模型。Vox. Sang. 52:281-290 (1987)]。该模型中，静脉可适用性参数是血压。不适用于静脉给药的产物引起明显的血压降低。

## 实施例

### 对比例 1

1kg 来自 Kistler-Nitschmann 的沉淀 B 悬浮于 4kg 0.1M 乙酸盐缓冲液, pH 5.1 中, 在室温下加入 2% 辛酸。每克辛酸加入 0.15g 磷酸钙, 并过滤沉淀。用 20 mmol/L 哌嗪, 60 mmol/L NaCl, pH 5.8 透析滤液。经透析的溶液用每 g 蛋白质 75mg DEAE-Sephadex<sup>®</sup> 处理。随后将蛋白浓度调整到 20 mg/ml, 将溶液于 25℃ 用 1% Tween<sup>®</sup> 80 和 0.3% TNBP (三-正-丁基-磷酸酯) 处理 8 小时。溶液随后上样于 TMAE-Fraktogel<sup>®</sup>-柱, 并用 20 mmol 哌嗪, 160 mmol NaCl, pH 5.8 洗脱 IgM-组分。终产物浓缩到含蛋白质为 5%, 其 pH 值被调整到 4.5。

#### 对比例 2

10 1kg 来自 Kistler-Nitschmann 的沉淀 B 悬浮于 4kg 0.1M 乙酸盐缓冲液, pH 5.1 中, 在室温下加入 2% 辛酸。每克辛酸加入 0.15 克磷酸钙, 并过滤沉淀。用 20 mmol/L NaCl 透析滤液, 溶液获得 20 mg/ml 蛋白质用 0.2M HCL 将 pH 调到 4.0, 溶液于 37℃ 温孵 9 小时。冷却至 20℃ 后, 将 pH 调到 5.8, 将哌嗪加入, 其终浓度是 20 mmol/L 加入 NaCl, 其浓度是 60 mmol/L。溶液于 25℃ 用 1% Tween<sup>®</sup> 80 和 0.3% TNBP (三-正-丁基-磷酸酯) 处理 8 小时。溶液随后上样于 TMAE-Frakogel<sup>®</sup>-柱, 并用 20 mmol 哌嗪, 160 mmol NaCl, pH 5.8 洗脱 IgM 组分。将终产物浓缩到含蛋白质为 5%, 其 pH 值被调整到 4.5。

#### 实施例 1

20 1kg 来自 Kistler-Nitschmann 的沉淀 B 悬浮于 4kg 0.1M 乙酸盐缓冲液, pH 5.1 中, 在室温下加入 2% 辛酸。每克辛酸加入 0.15g 磷酸钙, 并过滤沉淀。滤液用 20 mmol/L NaCl 透析, 溶液获得 20 mg/ml 蛋白质。用 0.2 M HCL 将 pH 值调到 4.0, 每克蛋白中加入 600 U 胃蛋白酶。将溶液于 37℃ 温孵 9 小时。冷却至 20℃ 后, pH 调节为 5.8, 加入哌嗪, 其终浓度为 20 mmol/L, 加入 NaCl, 其终浓度为 60 mmol/L。溶液于 25℃, 用 1% Tween<sup>®</sup> 80 和 0.3% TNBP (三-正-丁基-磷酸酯) 处理 8 小时。溶液随后上样于 TMAE-Frakogel<sup>®</sup>-柱, 并用 20 mmol 哌嗪, 160 mmol NaCl, pH 5.8 洗脱。终产物的蛋白质被浓缩到 5%, 其 pH 值被调整到 4.5。

#### 实施例 2

30 类似于对比实施例 2 处理 1kg 沉淀 B, 然而, 在 pH 4 温孵之前。将 1200 U 胃蛋白酶每克蛋白质而不用 600 U 胃蛋白酶每克蛋白质加入到溶液中。

### I. 表征实验产品

用抗血清比浊法测定免疫球蛋白 IgG、IgA 和 IgM。总蛋白含量用 Kjeldahl-方法测定。

5

表 I

	蛋白质	IgG	IgA	IgM	同种凝集素	
	Mg/g	Mg/g	Mg/g	Mg/g	Anti-A	Anti-B
对比例 1	44.4	4.1	16.8	45.0	1:64	1:64
对比例 2	48.1	8.6	19.3	43.5	1:128	1:64
实施例 1	51.3	7.0	22.0	50.5	1:128	1:64
实施例 2	46.9	4.7	20.2	51.0	1:128	1:64

表 II. 适用性参数

	处理	ACA	大鼠模型	结合			
				缓冲液		血清	
				CH 50/G	血压下降 %	LPO %	CT %
对比例 1	不是 pH 4	515	19	1.5	0.1	43	5.5
对比例 2	pH 4	179	18	0	0.5	42	6.7
实施例 1	pH 4 加入 600 U 胃蛋白酶	125	7	0	0.3	34	3.9
实施例 2	pH 4 和加入 1200 U 胃蛋白酶	89	2	0	0.5	23	3.7

10

加入胃蛋白酶将降低 ACA, 消除大鼠模型中的血压下降, 以及降低 C1q-结合活性。