# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2013 年 8 月 29 日 (29.08.2013)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2013/123889 A1



(51) 国际专利分类号:
*C07K 16/06* (2006.01) *C07K 1/18* (2006.01)
*C07K 1/36* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2013/071754

(22) 国际申请日: 2013 年 2 月 22 日 (22.02.2013)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201210041098.6 2012 年 2 月 22 日 (22.02.2012) CN



(71) 申请人: **成都蓉生药业有限责任公司 (CHENGDU RONGSHENG PHARMACEUTICALS CO., LTD)** [CN/CN]; 中国四川省成都高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。

(72) 发明人: **杨汇川 (YANG, Huichuan)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。 **吕家成 (LV, Jiacheng)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。 **梁洪 (LIANG, Hong)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。 **王焰 (WANG, Yan)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。 **武鹏 (WU, Peng)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。 **李泽林 (LI, Zelin)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。 **兰学渊 (LAN, Xueyuan)**; 中国四川省成都市高新区起步园科园南路 7 号, Sichuan 610041 (CN)。

(74) 代理人: **成都高远知识产权代理事务所（普通合伙） (GAOYUNG INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY)**; 中国四川省成都高新衣冠庙邮局 A-42 信箱（高朋大道博士创业园）, Sichuan 610041 (CN)。



(81) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) **指定国** (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,


[见续页]

(54) **Title**: METHOD FOR PREPARING HUMAN IMMUNOGLOBULIN

(54) **发明名称** : 一种制备人免疫球蛋白的方法

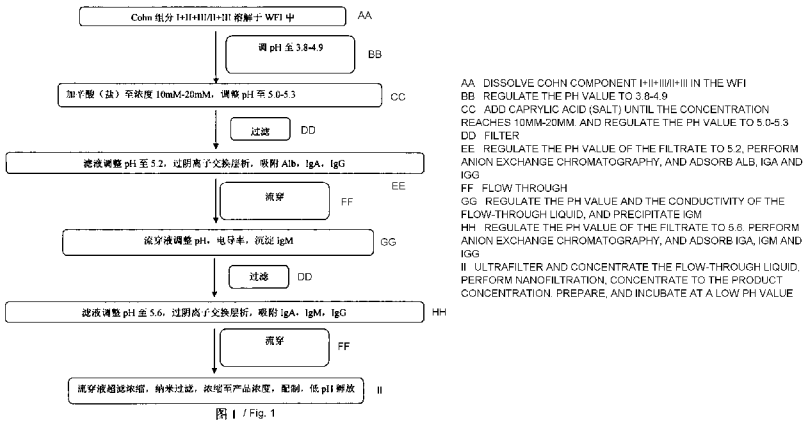


图 1 / Fig. 1


(57) **Abstract**: The present invention provides a method for preparing human immunoglobulin, comprising such steps as: dissolution of Cohn component I+II+III or Cohn component II+III, caprylic acid precipitation, first-step anion exchange chromatography, IgM precipitation, second-step anion exchange chromatography, ultrafiltration or dialysis, preparation, and inactivation of virus; as a result, high-purity human immunoglobulin is obtained through the preparation. Also provided is a human immunoglobulin prepared through the method and a pharmaceutical combination. The preparation method of the present invention is simple, has a low cost, and has a good industrial application prospect.

(57) **摘要**: 本发明提供了一种制备人免疫球蛋白的方法，包括 Cohn 组分 I+II+III 或者 Cohn 组分 II+III 溶解、辛酸沉淀、第一步阴离子交换层析、沉淀 IgM、第二步阴离子交换层析、超滤或者透析、配制、病毒灭活等步骤，制备得到了高纯度人免疫球蛋白。还提供了该方法制备的人免疫球蛋白和一种药物组合物。本发明制备方法简单，成本低，工业应用前景良好。


WO 2013/123889 A1

IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**根据细则 4.17 的声明**:

— 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

**本国际公布**:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

# 一种制备人免疫球蛋白的方法

## 技术领域

本发明涉及血液制品的制备方法，特别涉及一种制备人免疫球蛋白的方法。

## 背景技术

免疫球蛋白至少包括五种：IgG、IgM、IgA、IgE 和 IgD，其中 IgG 是最重要的免疫球蛋白，其缺乏时会导致机体防御力低下。免疫球蛋白制剂主要有三类：肌注人免疫球蛋白、特异性免疫球蛋白及静脉注射免疫球蛋白。目前，免疫球蛋白制剂主要是从血浆中分离。

1940s，美国哈佛大学的 E.J.Cohn 教授发明了低温乙醇分离血浆蛋白的工艺，其后，Nistchmann 和 Kistler 等人在 Cohn 氏低温乙醇法的基础上进行了改进，提出了改良的低温乙醇分离血浆蛋白方法，简化了步骤，缩短了生产周期。但是低温乙醇分离工艺在免疫球蛋白生产中也存在一定的局限性，球蛋白的回收量停留在 3.8~4.4g/L 间。此外，低温乙醇工艺制备的免疫球蛋白制剂中 IgA 的含量相对较高，先天性选择性 IgA 缺乏症患者输注后易发生不良反应。

1969 年，Steinbruch 等报道了采用辛酸沉淀结合阴离子交换层析从哺乳动物血浆中分离 IgG 的方法，在不低于 pH4.5 的弱酸性条件下，可以将除免疫球蛋白以外的杂蛋白沉淀，然而，该方法仍需采用 DEAE-纤维素作为阴离子交换介质进一步纯化 IgG，工艺复杂且成本高。

专利申请号为 US 6,307,028 的美国专利申请公开了一种采用辛酸沉淀结合两步阴离子交换层析的纯化方法，制备得到了高纯度，IgG 亚类分布与正常血浆相同的免疫球蛋白制品。

然而，与国外相比，中国人血浆中 IgM 含量较高（中国人血浆中 IgM 含量占总蛋白含量的 10%左右，国外人血浆中 IgM 含量占总蛋白含量的 1%-3%），依照前述方法制备纯度合格的免疫球蛋白，依靠层析柱吸附大量 IgM 所需的层析柱体积很大，成本高，难以实现大规模工业化生产。

## 发明内容

为了解决上述问题，本发明提供了一种新的制备人免疫球蛋白的方法。

首先，本发明提供了一种制备人免疫球蛋白的方法，它包括如下步骤：

（1）溶解：将 Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ或者 Cohn 组分Ⅱ+Ⅲ溶于注射用水中；

（2）辛酸沉淀：用辛酸或辛酸盐沉淀杂质，过滤，得滤液；

（3）第一步阴离子交换层析：将步骤（2）所得滤液调节 pH 至 5.2，用阴离子交换层析纯化，得流穿液；

（4）沉淀 IgM：用水将步骤（3）所得流穿液的电导率调节为 500-1000us/cm，再调节 pH 至 6.0-7.3，静置 1-2h，过滤，得滤液；

（5）第二步阴离子交换层析：将步骤（4）所得滤液的 pH 调节至 5.6，用阴离子交换层析纯化，得流穿液；

（6）经超滤或者透析，配制，病毒灭活，即得人免疫球蛋白成品。

其中，所述步骤（1）为：取 Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ或者 Cohn 组分Ⅱ+Ⅲ，加入注射用水中，2-8℃搅拌至其溶解，调节 pH 为 3.8-4.9。通常情况下，注射用水的用量为：注射用水与 Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ或者 Cohn 组分Ⅱ+Ⅲ的体积质量比为 10：1-15：1。

其中，所述步骤（2）为：加入浓度为 10mM-20mM 的辛酸或辛酸盐，调节 pH 为 5.0-5.3。

其中，步骤（3）所述阴离子交换层析的填料为 Capto Q、Gigacap Q 或者 Unosphere Q，交换层析柱体积为样品体积的 1/105~1/50。

其中，步骤（4）所述 pH 优选为 6.3~6.74，进一步优选为 6.51~6.7，再进一步优选为 6.51 或者 6.7。

其中，步骤（5）所述阴离子交换层析的填料为 Macrocap Q，交换层析柱体积为样品体积的 1/50~1/35。

本发明还提供了前述方法制备的人免疫球蛋白。

本发明最后提供了一种药物组合物，它是以前述的人免疫球蛋白为活性成分，加上药学上可接受的辅料或者辅助性成分制备而成。

本发明提供的制备方在两步阴离子层析之间巧妙的增加沉淀 IgM 这一步骤，第二步阴离子交换层析体积明显较少，降低生产成本，具有良好的市场应用前景。

显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

以下通过实施例形式的具体实施方式，对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

**附图说明**

图 1　本发明人免疫球蛋白制备方法示意图

图 2　pH 与 IgM 沉淀量以及 IgG 收率的关系图

## 具体实施方式

### 实施例 1 用本发明方法制备人免疫球蛋白

1、实验材料

Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ或者组分Ⅱ+Ⅲ：按照《医学生物制品学》（人民卫生出版社），第二版，1194 页记载的低温乙醇沉淀法制备。

盐酸、辛酸、Capto Q 填料、Gigacap Q 填料、Unosphere Q 填料、Macrocap Q、硅藻土和 Beckman IMMAGE IgA 检测试剂盒，均为市售品。

2、实验方法

如图 1 所示，制备人免疫球蛋白：

（1）Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ：取 4kg Cohn 组分 I+II+III 沉淀溶解于 40L 5℃ WFI（注射用水）中，搅拌 1h，使用 0.5M 盐酸调整 pH 至 4.20，25℃水浴加热搅拌 2h；

（2）辛酸沉淀：直接加入辛酸至终浓度 15mM，使用 0.5M NaOH 调 pH 至 5.20，25℃水浴加热搅拌 2h，8℃静置 2h；

（3）第一步阴离子交换层析：辛酸沉淀反应混悬液用普通深层滤板过滤，滤液用 0.5M 盐酸或 0.5M NaOH 调整 pH 至 5.20，用 Capto Q 填料进行第一步阴离子交换层析，层析 pH5.20，线流速 200cm/h，交换层析柱体积为样品体积的 1/75；

（4）沉淀 IgM：层析流穿液先调整电导至 700μs/cm，后使用 0.5M NaOH 调整 pH 至 6.3，静置 1h；

（5）第二步阴离子交换层析：加硅藻土过滤，滤液调整 pH 至 5.6，进行第二步阴离子交换层析，所用填料为 Macrocap Q，线流速 75cm/h，交换层析柱体积为样品体积的 1/40；

（6）收集层析流穿液，用 0.5M 盐酸调整 pH 至 3.9-4.2，再将溶液超滤浓缩至蛋白浓度 20mg/ml。为过滤病毒将溶液通过孔径为 200-15nm 的病毒过滤器过滤，如 DV50，DV20，Planova75，Planova35 等。该步骤结束后，将溶液浓缩至最终制剂所需要的蛋白浓度，如 5%或 10%（W/V），浓缩后添加适当的添加剂整溶液的渗透压值适合静脉注射的要求，添加剂可以使用糖或者氨基酸，再次调整溶液 pH 至 4.0-4.8，25℃孵放 21 天，再按照制剂所需要求分装到输液瓶中。

3、产品检验

（1）检测方法

按照中国药典（2010 版）规定方法分别检测产品纯度检、产品单体+二聚体即分子大小分布、产品亚类分布等检测指标。

产品 IgA 含量检测在 Beckman IMMAGE 血浆蛋白分析仪上进行，采用

免疫比浊法，选用 Beckman IMMAGE IgA 检测试剂盒进行检测，具体检测方法参见该检测试剂盒说明书。

收率检测方法：制品经超滤浓缩后，通过凯氏定氮法（《中国药典》2010版，附录 VI B 第一法）测定制品的蛋白浓度，收率=蛋白浓度*制品体积/血浆体积。

（2）检测结果

检测结果如表 1 所示：

表 1 本发明制备的免疫球蛋白制品与现有低温乙醇法所得制品的质量指标对比

| 检测指标 | 本工艺试验样品（5% IVIG） | | | 现有产品（低温乙醇法） |
|---|---|---|---|---|
| | 20110309 | 20110312 | 20110414 | |
| 纯度 | 99.9% | 99.3% | 99.9% | ~98% |
| 单体+二聚体 | 99.9% | 99.9% | 99.2% | ~98% |
| IgA（mg/L） | 12.5 | 14.5 | 18.1 | ~150 |
| $IgG_1$ | 54.50% | 55.50% | 53.47% | ~55% |
| $IgG_2$ | 37.39% | 35.80% | 36.99% | ~35% |
| $IgG_3$ | 6.13% | 6.21% | 7.05% | ~8% |
| $IgG_4$ | 2.08% | 2.46% | 2.48% | ~2% |
| 其余指标 | 均符合中国药典要求 | | | |
| 收率（g/L 血浆） | 5.85 | 5.71 | 5.61 | ~5.0 |

由表 1 可知，本发明工艺制备的人免疫球蛋白的各项指标均符合药典的要求。与传统的低温乙醇工艺相比，本发明工艺可以提高制品纯度，降低多聚体和 IgA 的含量，可以进一步提高大剂量输注情况下的安全性，且本发明制备人免疫球蛋的方法的收率高，与现有低温乙醇方法相比提高 10%以上。

**实施例 2　参数优选实验**

本发明方法步骤（4）沉淀 IgM 中的电导率和 pH 值进行筛选：

（1）电导率优选实验

实验方法：其他条件恒定，改变实施例 1 步骤（4）中的电导率和 pH，检测电导率与 IgM 沉淀量、IgG 收率的关系。

实验结果：通过多次实验观察到，当层析流穿液电导率高于 1ms/cm 时，即使提高溶液的 pH，IgM 也不会有沉淀析出。当层析流穿液的电导率介于 500~1000us/cm 时，调整 pH 至 6.0 以上，IgM 会明显析出。

（2）pH 优选实验

实验方法：其他条件恒定，改变实施例 1 步骤（4）中的 pH，并检测 pH 与 IgM 沉淀量、IgG 收率的关系。

实验结果：通过多次实验观察到，IgM 去除率随 pH 的提高而提高，但

pH 过高会造成 IgG 损失增加。

如表 2 和图 1 所示：

表 2 IgM 沉淀量、IgG 收率与 pH 的关系表

| 序号 | pH | IgG 收率 | IgM 沉淀量(%) |
|---|---|---|---|
| 1 | 6.2 | 100 | 37.5 |
| 2 | 6.28 | 91.63 | 43.04 |
| 3 | 6.3 | 98 | 50 |
| 4 | 6.3 | 100 | 41.57 |
| 5 | 6.31 | 100 | 47 |
| 6 | 6.51 | 100 | 60 |
| 7 | 6.52 | 98.64 | 51.23 |
| 8 | 6.59 | 96.44 | 55 |
| 9 | 6.7 | 100 | 60 |
| 10 | 6.7 | 98.87 | 60 |
| 11 | 6.74 | 97 | 48.9 |
| 12 | 7.01 | 92 | 70 |
| 13 | 7.3 | 100 | 61.58 |

由表 2 和图 1 可知，pH 介于 6.2~7.3 时，IgM 沉淀明显析出，pH 介于 6.3~6.74 时，IgM 沉淀析出量大，且 IgG 收率高，pH 介于 6.51~6.7 时，IgM 沉淀析出量和 IgG 收率均较优。

综上，平衡 IgM 去除率和 IgG 的收率，本发明方法步骤（4）电导率调节为 500~1000us/cm，pH 调节为 6.0-7.0。

为了进一步说明本发明方法的有益效果，提供如下对比实验：

1、人免疫球蛋白的制备

（1）、本发明制备方法：如实施例 1 所述；

（2）、对比制备方法：

1）Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ溶解：取 4kg Cohn 组分 I+II+III 沉淀溶解于 40L 5℃ WFI（注射用水）中，搅拌 1h，使用 0.5M 盐酸调整 pH 至 4.20，25℃水浴加热搅拌 2h；

2）辛酸沉淀：直接加入辛酸至终浓度 15mM，使用 0.5M NaOH 调 pH 至 5.20，25℃水浴加热搅拌 2h，8℃静置 2h；

3）第一步阴离子交换层析：辛酸沉淀反应混悬液用普通深层滤板过滤，滤液用 0.5M 盐酸或 0.5M NaOH 调整 pH 至 5.20，用 Capto Q 填料进行第一步阴离子交换层析，层析 pH5.20，线流速 200cm/h；

4）第二步阴离子交换层析：收集层析流穿液，加硅藻土过滤，滤液调整 pH 至 5.6，进行第二步阴离子交换层析，所用填料为 Macrocap Q，线流速

75cm/h，交换层析柱体积为样品体积的 1/19；

5）收集层析流穿液，用 0.5M 盐酸调整 pH 至 3.9-4.2，再将溶液超滤浓缩至蛋白浓度 20mg/ml。为过滤病毒将溶液通过孔径为 200-15nm 的病毒过滤器过滤，如 DV50，DV20，Planova75，Planova35 等。该步骤结束后，将溶液浓缩至最终制剂所需要的蛋白浓度，如 5%或 10%（W/V），浓缩后添加适当的添加剂整溶液的渗透压值适合静脉注射的要求，添加剂可以使用糖或者氨基酸，再次调整溶液 pH 至 4.0-4.8，25℃孵放 21 天，再按照制剂所需要求分装到输液瓶中。

2、产品检验

（1）检测方法

检测方法与实施例 1 相同。

（2）检测结果

检测结果如表 3 所示：

表 3 本发明方法和对比方法制备的人免疫球蛋白的质量对比

| 检测指标 | 本工艺试验样品（5% IVIG） | | | 对比试验产品 |
|---|---|---|---|---|
| | 20110309 | 20110312 | 20110414 | |
| 纯度 | 99.9% | 99.8% | 99.9% | 99.8% |
| 单体+二聚体 | 99.9% | 99.7% | 99.2% | 99.7% |
| IgA（mg/L） | 12.5 | 21 | 18.1 | 21 |
| $IgG_1$ | 54.50% | 57.26% | 53.47% | 57.26% |
| $IgG_2$ | 37.39% | 31.59% | 36.99% | 31.59% |
| $IgG_3$ | 6.13% | 8.08% | 7.05% | 8.08% |
| $IgG_4$ | 2.08% | 3.07% | 2.48% | 3.07% |
| 其余指标 | 均符合中国药典要求 | | | |
| 收率（g/L 血浆） | 5.85 | 5.71 | 5.61 | 5.7 |

如表 3 所示，两种方法制备的免疫球蛋白质量指标无明显差异，且收率分别为 5.5-6.0g/L 血浆和 5.7g/L 血浆，也无明显差异。

第二步阴离子交换层析中，本发明制备方法的交换层析柱体积为样品体积的 1/40，对比方法的交换层析柱体积为样品体积的 1/19。

实验说明，制备质量指标相当的人免疫球蛋白，与对比方法相比，本发明方法可显著降低第二步阴离子交换层析所需层析柱体积。

综上，本发明提供的方法解决了因中国人血浆中 IgM 含量过高导致的人免疫球蛋白生产成本高的问题，大幅度降低生产成本，使人免疫球蛋白的大规模工业化生产成为可能，具有良好的市场应用前景。

# 权 利 要 求 书

1、一种制备人免疫球蛋白的方法，其特征在于：它包括如下步骤：

（1）溶解：将 Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ或者 Cohn 组分Ⅱ+Ⅲ溶于注射用水中；

（2）辛酸沉淀：用辛酸或辛酸盐沉淀杂质，过滤，得滤液；

（3）第一步阴离子交换层析：将步骤（2）所得滤液调节 pH 至 5.2，用阴离子交换层析纯化，得流穿液；

（4）沉淀 IgM：用水将步骤（3）所得流穿液的电导率调节为 500-1000us/cm，再调节 pH 至 6.0-7.3，静置 1-2h，过滤，得滤液；

（5）第二步阴离子交换层析：将步骤（4）所得滤液的 pH 调节至 5.6，用阴离子交换层析纯化，得流穿液；

（6）经超滤或者透析，配制，病毒灭活，即得人免疫球蛋白成品。

2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤（1）为：取 Cohn 组分Ⅰ+Ⅱ+Ⅲ或者 Cohn 组分Ⅱ+Ⅲ，加入注射用水中，2-8℃搅拌至其溶解，调节 pH 为 3.8-4.9。

3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：所述步骤（2）为：加入浓度为 10mM-20mM 的辛酸或辛酸盐，调节 pH 为 5.0-5.3。

4、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤（3）所述阴离子交换层析的填料为 Capto Q、Gigacap Q 或者 Unosphere Q。

5、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤（4）所述 pH 为 6.3~6.74。

6、根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于：步骤（4）所述为 6.51~6.7。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：步骤（4）所述 pH 为 6.51 或者 6.7。

8、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤（5）所述阴离子交换层析的填料为 Macrocap Q。

9、权利要求 1-8 任意一项所述方法制备的人免疫球蛋白。

10、一种药物组合物，其特征在于：它是以权利要求 9 所述的人免疫球蛋白为活性成分，加上药学上可接受的辅料或者辅助性成分制备而成。

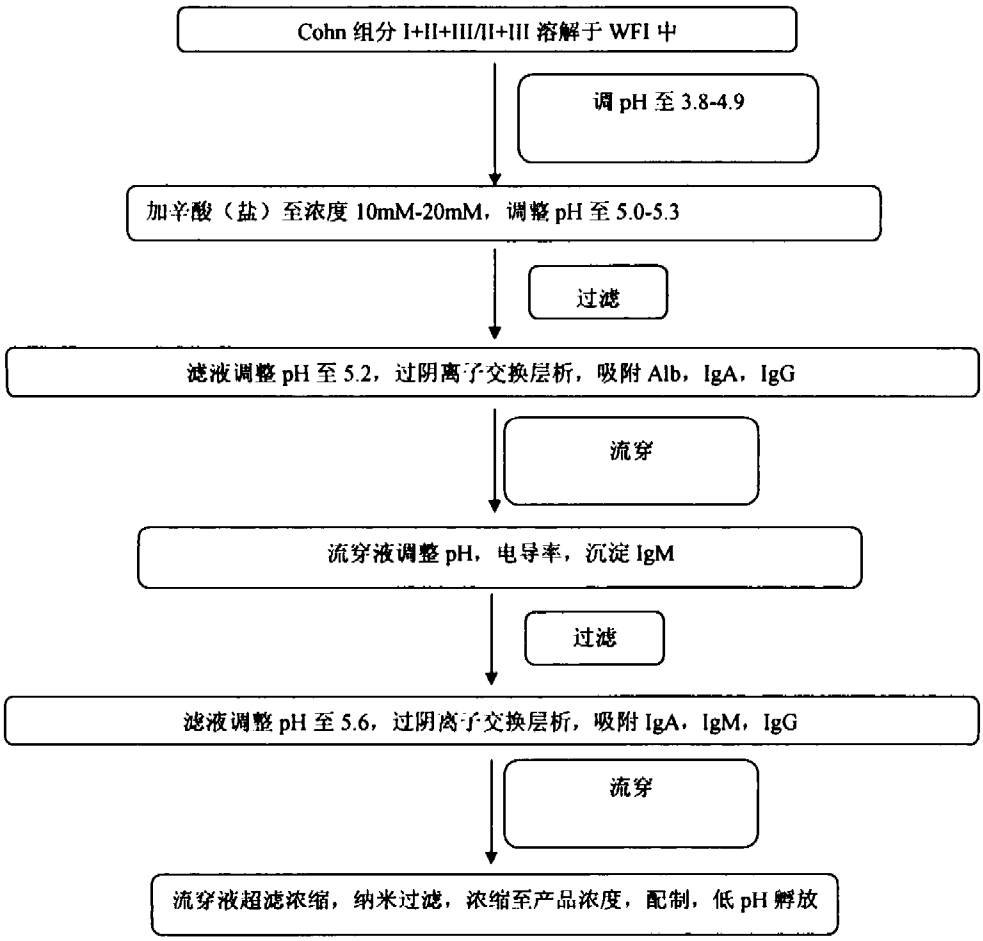
Cohn 组分 I+II+III/II+III 溶解于 WFI 中
调 pH 至 3.8-4.9
加辛酸（盐）至浓度 10mM-20mM，调整 pH 至 5.0-5.3
过滤
滤液调整 pH 至 5.2，过阴离子交换层析，吸附 Alb，IgA，IgG
流穿
流穿液调整 pH，电导率，沉淀 IgM
过滤
滤液调整 pH 至 5.6，过阴离子交换层析，吸附 IgA，IgM，IgG
流穿
流穿液超滤浓缩，纳米过滤，浓缩至产品浓度，配制，低 pH 孵放

图 1

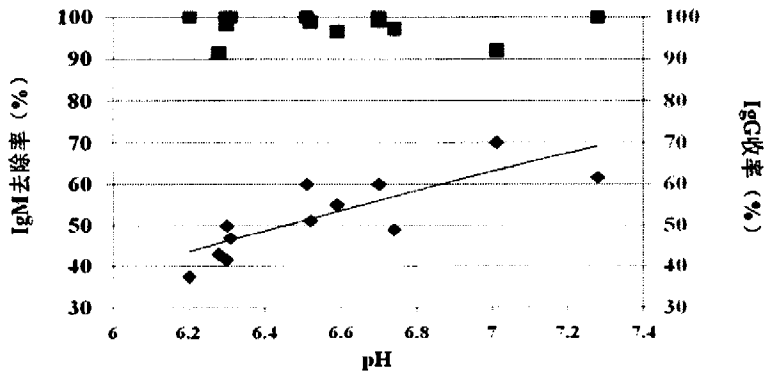
IgM去除率（%）
IgG收率（%）
pH
100
90
80
70
60
50
40
30
6
6.2
6.4
6.6
6.8
7
7.2
7.4

图 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2013/071754**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K 16/-; C07K 1/-; A61K 39/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CA on CD, NCBI: human immunoglobulin, Cohn Fraction, precipitate, impurity, caprylic acid, caprylate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| X | GE Healthcare Life Sciences. Application Case of Blood Product——Improve IVIG Product Quality and Process Recovery by Two Steps Chromatographic Process. docin.com 26.December 2011 (26.12.2011) capture on website: <URL: http://www.docin.com/p-315009809.html> (see "2 Experiment") | 1-10 |
| A | WO 9964462 A1 (STATENS SERUMINSTITUT et. al), 16 December 1999 (16.12.1999), see claims 1-20 | 1-10 |
| A | WO 2010138736 A2 (BAXTER INTERNATIONAL INC. et. al), 02 December 2010 (02.12.2010), see claims 1-7, 17-18 | 1-10 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| 06 May 2013<br>(06.05.2013) | **30 May 2013 (30.05.2013)** |
| Name and mailing address of the ISA<br>State Intellectual Property Office of the P. R. China<br>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao<br>Haidian District, Beijing 100088, China<br>Facsimile No. (86-10) 62019451 | Authorized officer<br>Lin, Li<br>Telephone No. (86-10) **62413784** |

Form PCT/ISA /210 (second sheet) (July 2009)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
**PCT/CN2013/071754**

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| WO 9964462 A1 | 16. 12. 1999 | AU 4257299 A | 30. 12. 1999 |
| | | EP 1084147 A1 | 21. 03. 2001 |
| | | BR 9911131 A | 06. 03. 2001 |
| | | CZ 20004534 A3 | 13. 06. 2001 |
| | | US 6281336 B1 | 28. 08. 2001 |
| | | SK 18662000 A3 | 10. 07. 2001 |
| | | HU 0101988 A2 | 28. 09. 2001 |
| | | KR 20010052733 A | 25. 06. 2001 |
| | | CN 1311797 A | 05. 09. 2001 |
| | | US 2001051708 A1 | 13. 12. 2001 |
| | | JP 2002517516 A | 18. 06. 2002 |
| | | NZ 509135 A | 25. 10. 2002 |
| | | AU 753468 B | 17. 10. 2002 |
| | | RU 2197500 C2 | 27. 01. 2003 |
| | | MXPA 00012230 A | 01. 04. 2002 |
| | | EP 1084147 B1 | 29. 09. 2004 |
| | | DE 69920693 E | 04. 11 2004 |
| | | EP 1493751 A1 | 05. 01. 2005 |
| | | ES 2229784 T3 | 16. 04. 2005 |
| | | INCHENP 200000799 E | 04. 03. 2005 |
| | | MX 227176 B | 08. 04. 2005 |
| | | DE 69920693 T2 | 03. 11. 2005 |
| | | IL 140155 A | 18. 12. 2005 |
| | | CN 1196714 C | 13. 04. 2005 |
| | | KR 100501263 B | 18. 07. 2005 |
| | | CZ 297199 B6 | 13. 09. 2006 |
| | | US 7138120 B2 | 21. 11. 2006 |
| | | IN 227004 B | 13. 02. 2009 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
**PCT/CN2013/071754**

| Patent Documents referred in the Report | Publication Date | Patent Family | Publication Date |
|---|---|---|---|
| | | EP 2270044 A1 | 05. 01. 2011 |
| | | EP 2272870 A1 | 12. 01. 2011 |
| | | CA 2330170 C | 02. 11. 2010 |
| | | JP 4685238 B2 | 18. 05. 2011 |
| | | JP 2011102314 A | 26. 05. 2011 |
| | | HK 1151045 A0 | 20. 01. 2012 |
| | | HK 1151044 A0 | 20. 01. 2012 |
| WO 2010138736 A2 | 02. 12. 2010 | US 2010330071 A1 | 30. 12. 2010 |
| | | WO 2010138736 A3 | 17. 03. 2011 |
| | | TW 201107344 A | 01. 03. 2011 |
| | | AU 2010253830 A1 | 02. 12. 2010 |
| | | CA 2763138 A1 | 02. 12. 2010 |
| | | EP 2435474 A2 | 04. 04. 2012 |
| | | CN 102459331 A | 16. 05. 2012 |
| | | MXPA 11012576 A | 31. 05. 2012 |
| | | JP 2012528190 A | 12. 11. 2012 |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2013/071754**

Continuation of: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C07K 16/06 (2006.01) i

C07K 1/36 (2006.01) i

C07K 1/30 (2006.01) i

C07K 1/18 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

# 国际检索报告

国际申请号
**PCT/CN2013/071754**

**A. 主题的分类**

参见附加页

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

**B. 检索领域**

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC: C07K16/-, C07K1/-, A61K39/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

WPI; EPODOC; CNPAT; CA on CD; NCBI; human immunoglobulin, Cohn Fraction, precipitate, impurity, caprylic acid, caprylate, 免疫球蛋白, 酸沉淀, 辛酸, 透析

**C. 相关文件**

| 类　型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| X | GE Healthcare Life Sciences. 血液制品应用案例——两步层析工艺提高 IVIG 产品质量和工艺收率. 豆丁网. 26. 12 月 2011. 从因特网获取: <URL: http://www.docin.com/p-315009809.html> (参见“2 实验部分”) | 1-10 |
| A | WO9964462 A1 (STATENS SERUM INSTITUT), 16. 12 月 1999 (16. 12. 1999) (参见权利要求 1-20) | 1-10 |
| A | WO2010138736 A2 (BAXTER INTERNATIONAL INC. et. al), 02. 12 月. 2010 (02. 12. 2010) (参见权利要求 1-7,17-18) | 1-10 |

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。　　☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 06. 5 月 2013 (06. 05. 2013) | **30.5 月 2013 (30.05.2013)** |
| ISA/CN 的名称和邮寄地址：<br>中华人民共和国国家知识产权局<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088<br>传真号： (86-10)62019451 | 受权官员<br>李林<br>电话号码：(86-10) **62413874** |

# 国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
**PCT/CN2013/071754**

| 检索报告中引用的专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|---|---|---|---|
| WO9964462 A1 | 16. 12. 1999 | AU4257299 A | 30. 12. 1999 |
| | | EP1084147 A1 | 21. 03. 2001 |
| | | BR9911131 A | 06. 03. 2001 |
| | | CZ20004534 A3 | 13. 06. 2001 |
| | | US6281336 B1 | 28. 08. 2001 |
| | | SK18662000 A3 | 10. 07. 2001 |
| | | HU0101988 A2 | 28. 09. 2001 |
| | | KR20010052733 A | 25. 06. 2001 |
| | | CN1311797 A | 05. 09. 2001 |
| | | US2001051708 A1 | 13. 12. 2001 |
| | | JP2002517516 A | 18. 06. 2002 |
| | | NZ509135 A | 25. 10. 2002 |
| | | AU753468 B | 17. 10. 2002 |
| | | RU2197500 C2 | 27. 01. 2003 |
| | | MXPA00012230 A | 01. 04. 2002 |
| | | EP1084147 B1 | 29. 09. 2004 |
| | | DE69920693 E | 04. 11 2004 |
| | | EP1493751 A1 | 05. 01. 2005 |
| | | ES2229784 T3 | 16. 04. 2005 |
| | | INCHENP200000799 E | 04. 03. 2005 |
| | | MX227176 B | 08. 04. 2005 |
| | | DE69920693 T2 | 03. 11. 2005 |
| | | IL140155 A | 18. 12. 2005 |
| | | CN1196714 C | 13. 04. 2005 |
| | | KR100501263 B | 18. 07. 2005 |
| | | CZ297199 B6 | 13. 09. 2006 |
| | | US7138120 B2 | 21. 11. 2006 |
| | | IN227004 B | 13. 02. 2009 |
| | | EP2270044 A1 | 05. 01. 2011 |
| | | EP2272870 A1 | 12. 01. 2011 |
| | | CA2330170 C | 02. 11. 2010 |
| | | JP4685238 B2 | 18. 05. 2011 |
| | | JP2011102314 A | 26. 05. 2011 |
| | | HK1151045 A0 | 20. 01. 2012 |
| | | HK1151044 A0 | 20. 01. 2012 |
| WO2010138736 A2 | 02. 12. 2010 | US2010330071 A1 | 30. 12. 2010 |
| | | WO2010138736 A3 | 17. 03. 2011 |
| | | TW201107344 A | 01. 03. 2011 |

# 国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
**PCT/CN2013/071754**

| 检索报告中引用的专利文件 | 公布日期 | 同族专利 | 公布日期 |
|---|---|---|---|
| | | AU2010253830 A1 | 02. 12. 2010 |
| | | CA2763138 A1 | 02. 12. 2010 |
| | | EP2435474 A2 | 04. 04. 2012 |
| | | CN102459331 A | 16. 05. 2012 |
| | | MXPA11012576 A | 31. 05. 2012 |
| | | JP2012528190 A | 12. 11. 2012 |

续：第 2 页: A.主题的分类：

C07K16/06 (2006.01)i

C07K1/36 (2006.01)i

C07K1/30 (2006.01)i

C07K1/18 (2006.01)i

A61K39/395 (2006.01)i