(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 101961498 A
(43)申请公布日 2011.02.02

(21)申请号 201010241085.4

(22)申请日 2010.07.21

(30)优先权数据
61/227107 2009.07.21 US
12/582725 2009.10.21 US

(71)申请人 通用电气医疗集团股份有限公司
地址 挪威奥斯陆

(72)发明人 G·哈格林 L·G·威斯特兰

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 梁谋 林毅斌

(51)Int.Cl.
A61K 49/06(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54)发明名称

造影剂中内毒素的去除

(57)摘要

本发明涉及造影剂的制造方法，更具体而言涉及这种造影剂中内毒素的去除方法，所述方法包括使所述造影剂通过阴离子交换膜从而将内毒素从造影剂中除去。

CN 101961498 A

1. 一种从造影剂去除内毒素的方法，所述方法包括使所述造影剂通过阴离子交换膜。

2. 权利要求 1 所述的方法，其中所述造影剂是非离子性碘化造影剂。

3. 权利要求 1 所述的方法，其中所述造影剂的粘度为约 20-35mPas。

4. 权利要求 1 所述的方法，其中所述造影剂包含 1,3- 双（甲酰氨基）-N,N′ - 双 [3,5- 双 (2,3- 二羟丙基氨基羰基）-2,4,6- 三碘苯基]-2- 羟基 - 丙烷。

造影剂中内毒素的去除

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 依据美国法典第 35 卷第 119 条第 5 项 (35U.S.C. § 119(e))，本申请要求 2009 年 7 月 21 日提交的美国临时申请号 61/227,107 的优先权，该临时申请的全部公开内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及造影剂的制造，更具体地讲涉及这种造影剂中内毒素的去除。

[0004] 发明背景

[0005] 各种造影剂的生产中的一个普遍问题涉及内毒素的存在，所述内毒素是在处理大量水溶液的过程中由细菌繁殖产生的。虽然细菌本身可在各种灭菌程序中被轻易去除或破坏，但内毒素有时候却仍保持完整。

[0006] 人们已经知道和研究内毒素多年，特别是在动物中的病理生理学反应方面。多年来认为，内毒素物质包含在革兰氏阴性杆菌细胞中，只有细胞壁分解时才释放出来。因此，该物质被称为内毒素。但是，最近的研究提示，内毒素定位于革兰氏阴性杆菌的细胞表面，且可在活细胞和被杀灭的细胞中存在，以及在液体介质中以游离形式存在。

[0007] 已知内毒素会造成几种不同的病理生理学反应，且已被鉴定为造成许多住院患者死亡的直接原因和附带原因。已知内毒素会在动物中引起发烧反应，症状为极度高烧、血管舒张、腹泻等，在极端情况下出现致命性休克。还已知内毒素会造成白细胞增多、碳水化合物和蛋白质代谢的有害变化以及血纤蛋白形成所致的广泛性血管内凝血。

[0008] 由于造影剂常被大量注射入住院患者体内，造影剂必须首先经纯化无内毒素污染。

[0009] 从溶液去除内毒素的普通方法有超滤、吸附基质如色谱树脂和离子交换树脂。已确认这些方法存在几个问题，如过滤器堵塞、物质损失量大和后处理麻烦、费用高且耗时。

[0010] US 5972225 描述了从大批的非离子型碘化造影剂去除内毒素的方法，该方法包括将造影剂溶于起始水溶液中，然后使溶液通过含有活性炭的过滤区。

[0011] 需要快速且性价比高的去除造影剂中内毒素的方法。更具体地讲，需要开发出这样的方法，其能得到小于约 1EU/ml 的内毒素值，且对造影剂的浓度、不同阳离子的含量、制剂的 pH 和离子强度的影响最小。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供通过用阴离子交换膜过滤去除内毒素来纯化造影剂的方法。

[0014] 因此，在一方面看，本发明提供一种从造影剂去除内毒素的方法，其包括使所述造影剂通过阴离子交换膜。

[0015] 根据本发明的方法操作简单，效率高，且对制剂的 pH 和其他参数的影响可忽略不计。

[0016] 发明详述

[0017] 通常，造影剂的制造涉及到生产出化学药物物质（称为一级生产），然后配制成药

物产品（称为二级生产）。

[0018] 提供了从这种造影剂去除内毒素的方法。在这点上，本文所用的术语“造影剂”意指任何用来在医学成像中增强体内的结构或流体的对比度的物质，带负电荷的离子型造影剂除外。造影剂可以是一级生产所得的药物物质溶于起始水溶液制成，但优选的是造影剂是在二级生产中配制后得到的产物。

[0019] 现有技术的一些内毒素去除方法的一个重要问题是，纯化工艺不能处理高粘度的已配制造影剂。还更重要的是，不能在同时不改变造影剂的组成的情况下去除内毒素。

[0020] 为解决这个问题，同时为满足上述标准，本发明提供了从造影剂去除内毒素的方法，其包括使所述造影剂通过阴离子交换膜。

[0021] 根据本发明使用的造影剂优选可为用于磁共振成像 (MRI) 的造影剂，如基于 Gd 的造影剂，或者用于 X 射线成像的造影剂。

[0022] 根据本发明使用的优选 X 射线造影剂是非离子型碘化造影剂。更优选地，所述造影剂高度粘稠，优选粘度为约 20-35mPas。

[0023] 更优选地，非离子型造影剂包含 1,3- 双（甲酰氨基）-N, N′ - 双 [3,5- 双 (2, 3- 二羟丙基氨基羰基)-2,4,6- 三碘苯基]-2- 羟基 - 丙烷。最优选地，非离子型造影剂是 Visipaque™，其为 X 射线诊断方法中最常用的造影剂之一。碘克沙醇是 Visipaque™ 的化学药物物质的非专有名称。

[0024] 有利地，要按照本发明进行处理的溶液会使碘化药物物质以这样的浓度存在，该浓度足以提供约 50 毫克至 500 毫克有机结合碘每毫升溶液 (mg I/ml)，更优选约 100-400mg/I ml。

[0025] 此外，根据本发明，溶液在纯化前其所含内毒素水平通常会超过 0.2EU 每 50mg I(0.2EU/50mg I)，往往超过约 5EU/50mg I。

[0026] 阴离子交换膜能有效且快速地将内毒素从手头的造影剂中去除。分离是由于造影剂中的离子与膜中的反荷离子的选择性交换而发生的。造影剂基本上不表现出对膜的亲和性，因此内毒素得以有效地与造影剂溶液分离。带负电荷的内毒素会吸附到离子交换膜上的带正电荷的基团，从而从溶液中去除。当将交换膜用制剂所用的缓冲剂的相同离子强度平衡时，对于每个被吸附的内毒素分子，将有一个阴性缓冲剂反荷离子被交换。

[0027] 在工业规模上，溶液将优选地以这样的速率通过阴离子交换膜，该速率将不仅能优化从通过该膜的溶液去除的内毒素的量，而且能优化在给定时间量内通过该膜的溶液的体积。对于本发明的方法，典型的流速在 1 至 101/ 分钟之间，更优选 2 至 51/ 分钟之间。

[0028] 系统将优选在 1psig 至 100psig、更优选 5psig 至 15psig、最优选约 10psig 的压力下操作。此外，系统将保持这样的溶液温度，该温度将使所需的分离得以进行，而又低于所涉及的药物物质的分解温度。优选地，本发明的方法将在约室温至约 4℃的溶液温度下操作。

[0029] 将按需让纯化系统在上述参数范围内运行这样一段时间，该时间足以实现将内毒素如所希望地降低到可接受的水平。通常，这样的运行将持续约 0.5 至约 10.0 小时，更优选约 1.5 至约 2.5 小时。可定期采集样品进行测试，以监控内毒素水平，一旦达到可接受的水平，可停止进行该方法。

[0030] 最终产品将由这样的造影剂溶液构成，其基本上含有起始溶液的所有全部造影

剂。产品溶液所含的内毒素水平与起始溶液相比将大大降低，且更优选地将基本上不含内毒素（即所含内毒素水平低于约 1EU/ml）。

[0031] 以下实施例将进一步说明本发明，这些实施例不应被解释为将本发明的范围局限于其中所述的具体方法或产品。

[0032] 由实施例 1 可见，本发明的方法在相对较短的、商业上可行的时间里实现了内毒素水平降低到 1EU/ml 以下。同时，Visipaque™ 和 Prohance™ 的效价保持不变。因此，本发明的方法提供了性价比极高的降低造影剂中内毒素污染的方法。

[0033] 实施例 2 显示了内毒素从包含 1,3- 双（甲酰氨基）-N,N′ - 双 [3,5- 双 (2,3- 二羟丙基氨基羰基)-2,4,6- 三碘苯基]-2- 羟基 - 丙烷的溶液中的去除。可见内毒素的水平急剧下降到 0.5EU/ml 以下的水平，且重要的是还可看出，溶液中的钠离子和钙离子的浓度基本上不变。

实施例

[0034] 实施例 1

[0035] 样品

[0036] a) 碘化的芳族 X 射线化合物 Visipaque™（碘克沙醇，320mg 碘 /ml 于 10mM TRIS 缓冲液 (pH 7.4) 中，重量摩尔渗透压浓度用无菌无内毒素的 NaCl 调至 290mmol/kg，粘度＝ 24mPa)。

[0037] b) 供用于 MR Prohance™ 的基于 Gd 螯合物的造影剂 (Gd-DOTA，0.8M 于 10mM TRIS 缓冲液 (pH 7.4) 中，重量摩尔渗透压浓度用无菌无内毒素的 NaCl 调至 290mmol/kg)。

[0038] 大肠杆菌内毒素原液的制备

[0039] 向一个小瓶 (10mg，10e 7EU，Sigma Corp.，美国) 中加入 9ml 注射用水 (WFI) 和 1ml 乙腈，得到 9.1e6EU/ml ＝ 9.1e3EU/μl 的浓度。

[0040] 大肠杆菌 LPS 工作液的制备

[0041] 将 0.1ml 的原液用 WFI 稀释至 10ml（稀释系数＝ 100)，得到 91EU/μl。

[0042] 用内毒素对制剂进行掺杂

[0043] 向 Visipaque™ 和 Prohance™ 的 10ml 等分试样分别加入 3 和 6μl 大肠杆菌 LPS 工作液至 270 和 550EU 内毒素的最终理论浓度。

[0044] 去热原方法

[0045] a) 过滤器装置 :Sartobind Q15™ 膜，装配成易于使用的单元，孔径大小 3-5μm，由用带正电荷的季铵基团改性的纤维素制成。

[0046] b)Sartobind™Q15 的平衡和灭菌

[0047] 每个过滤器用 50ml 10mM TRIS pH 7.4 洗脱，然后用 5ml 70％乙醇洗脱（让其在过滤器中停留 3 分钟），最后用 50ml10mM TRIS pH7.4（无菌）洗脱。

[0048] c) 内毒素去除

[0049] 使各制剂以每秒约 1-2 滴的流量通过过滤器单元。

[0050] 内毒素分析的采样

[0051] 由于粘度高，制剂在洗脱通过 Sartobind™ Q15 阴离子交换膜后先将其充分混合再采样进行内毒素分析。

[0052] 内毒素含量的分析

[0053] 用来测定内毒素含量的方法是美国和欧洲药典中描述的发色方法，灵敏度为0.005EU/ml。将50μl制剂稀释于9.95ml WFI（注射用水）中制备成1：200稀释液，然后将样品连同阳性对照在动力QCL仪器上进行分析。如果阳性对照为阳性，则认为试验有效，由软件自动计算出结果。无内毒素存在将得出NMT 1EU/ml的结果。

[0054] 内毒素、pH以及碘和钆浓度的结果数值在表1中显示。注意，内毒素的数值为测量值，不同于实验章节中给出的理论值。*参考值为80.4mg Gd/ml；**参考值为320mg I/ml。

[0055] 表1

[0056]

样品	过滤前内毒素 (EU/ml)	过滤后内毒素 (EU/ml)	制剂 pH	Gd 含量 (mg/ml)	碘含量 (mg I/ml)
Visipaque 320 mg I/ml	220	< 0.5	7.2	-	326**
Visipaque 320 mg I/ml	460	< 0.5	7.3	-	318**
Prohance 80.4 mgGd/ml	185	< 0.5	7.2	80.0*	-
Prohance 80.4 mgGd/ml	417	< 0.5	7.2	78.9*	-

[0057] 实施例2

[0058] 如下制备包含1,3-双（甲酰氨基）-N,N′-双[3,5-双(2,3-二羟丙基氨基羰基)-2,4,6-三碘苯基]-2-羟基-丙烷的溶液的样品：将该纯化合物溶于含有10mM tris缓冲液和0.1mg/ml $CaNa_2EDTA$的无菌水中至大约320mg I/ml的浓度。加入氯化钙至以下给出的浓度，并通过加入氯化钠将溶液的重量摩尔渗透压浓度调至等渗(290mOsm/kg)。最后，在120℃下高压灭菌30分钟将溶液进行灭菌。然后如实施例1中那样，将样品制备成含有内毒素并进行纯化，不同的是使用SartobindQ100™。纯化前后的内毒素水平以及Ca^{2+}和Na^{+}水平在表2中显示。

[0059] 表2

[0060]

样品	过滤前内毒素 (EU/ml)	过滤后内毒素 (EU/ml)	过滤前 Ca^{2+} (mM)	过滤后 Ca^{2+} (mM)	过滤前 Na^{+} (mM)	过滤后 Na^{+} (mM)
1	14.80	0.3	0.368	0.353	44.5	45.1
2	19.55	0.7	0.570	0.545	45.5	44.6
3	17.29	1.4	0.946	0.926	44.7	43.8

[0061] 以上讨论和/或引述的所有专利、期刊文章、出版物和其他文献都通过引用并入本文。