



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105175486 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510683711. 8

(22) 申请日 2015. 10. 20

(71) 申请人 上海洲跃生物科技有限公司

地址 201306 上海市浦东新区新城路 2 号 24 幢 N3925 室

(72) 发明人 李春洲

(74) 专利代理机构 上海申汇专利代理有限公司
31001

代理人 吴宝根

(51) Int. Cl.

C07K 1/34(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

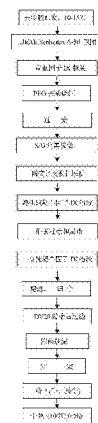
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法

(57) 摘要

本发明一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法, 包括冰冻血浆融化后的低温离心 ;DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附去冷胶血浆中的凝血因子 IX ;聚乙二醇去除溶液中杂蛋白 ;S/D 病毒灭活 ;阴离子交换柱层析得到纯化的凝血因子 IX 溶液 ;再上肝素亲和柱进一步层析得到高纯凝血因子 IX 溶液 ;超滤、透析、浓缩并加入盐酸精氨酸和甘氨酸作为保护剂 ;20 纳米滤芯过滤去除病毒 ;冻干 ;干热病毒灭活。本发明在凝胶吸附、柱层析、超滤透析操作均加入了蛋白保护剂, 降低了 FIX 制品凝血酶激活的概率, 提高了产品的合格率 ;本发明工艺产品得率高, FIX 比活可达 150IU/mg 左右, 远高于传统产品, 且经三步病毒灭活, 产品使用安全可靠。



1. 一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,其特征在于包括如下步骤:

1) 将新鲜冰冻血浆融浆后离心去除冷沉淀,获得去冷胶血浆,然后将去冷胶血浆加热至 10-15℃;

2) 将 DEAE-Sephadex A-50 凝胶置于一个不锈钢树脂桶中,先用温度在 75 ~ 85℃ 的注射用水充分溶胀,再用 10 ~ 20℃ 的注射用水冷却,然后用缓冲液平衡,所述的缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.075M-0.15M,所述的缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,将上述平衡好的凝胶加入到去冷胶血浆中,按照每升去冷胶血浆加入 0.5-1.5 克干凝胶的比例加入平衡好的凝胶,搅拌 0.5-1.5 小时,再静置 10-20 分钟;

3) 过滤去冷胶血浆,收集吸附了凝血因子 IX 的 DEAE Sephadex A-50 凝胶,后用洗涤缓冲液冲洗树脂 4-6 次,所述的洗涤缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的洗涤缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.1M-0.25M,所述的洗涤缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,再用洗脱缓冲液洗脱树脂 2-4 次,所述的洗脱缓冲液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride 和 NaCl 组成,在所述的洗脱缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M、NaCl 的浓度为 0.5M-2.0M,所述的洗脱缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,收集洗脱液,然后用 0.45 μm 或 1.0 μm 滤芯过滤洗脱液,收集滤液,即为凝血因子 IX 粗品溶液;

4) 在过滤后的洗脱液中加入聚乙二醇,加入后的聚乙二醇在洗脱液中的质量百分比浓度为 2-6%,搅拌 0.5-1.5 小时,过滤;

5) 在上述的滤液中加入 Tween80,加入后的 Tween80 在上述滤液中的质量百分比浓度为 1.0%,再加入磷酸三丁酯,加入后的磷酸三丁酯在上述滤液中的质量百分比浓度为 0.3%,搅匀后升温至 24-26℃,后保温 6 ~ 7 小时;

6) 然后降温至 5-15℃,用第一稀释液稀释至电导率不高于 15ms/cm,所述的第一稀释液为 0.01M Na-citrate 溶液,所述的第一稀释液的 PH 6.2-7.20,然后上阴离子交换柱,所述的阴离子交换柱预先用平衡缓冲液充分平衡,所述的平衡缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.1M-0.15M,所述的平衡缓冲液的 PH 为 6.20-7.20;再用洗涤缓冲液洗涤,所述的洗涤缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的洗涤缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.18-0.3M,所述的洗涤缓冲液的 PH 为 6.20-7.20,再用洗脱缓冲液洗脱,所述的洗脱缓冲液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride、和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M、NaCl 的浓度为 0.5M-1.0M,所述的洗脱缓冲液的 PH 为 6.80-7.80,收集洗脱液即为纯化的凝血因子 IX 溶液;

7) 用第二稀释液稀释步骤 6) 的洗脱液至电导率不高于 15ms/cm,所述的第二稀释液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride 组成,在所述的稀释液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M,所述的第二稀释液的 PH 为 6.50-7.50,然后上肝素亲和柱,所述的肝素亲和柱预先用平衡缓冲液充分平衡,所述的平衡缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M-0.02M、NaCl 的浓度为 0.1M-0.15M,所述的平衡缓冲液为 PH 6.50-7.50,再用洗涤缓冲液洗涤,所

述的洗涤缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M-0.02M、NaCl 的浓度为 0.18-0.25M,所述的洗涤缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,再用洗脱缓冲液洗脱,所述的洗脱缓冲液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M-0.02M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M、NaCl 的浓度为 0.4M-1.0M,所述的洗脱缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,收集洗脱液,用 0.45 μm 或 0.22 μm 滤芯过滤以上洗脱液,所得滤液即为高纯凝血因子 IX 溶液;

8) 用 10k 分子量的超滤膜浓缩以上滤液,然后恒体积透析,再浓缩至凝血因子 IX 活力高于 35IU/ml,得到凝血因子 IX 浓缩液;

9) 调节人凝血因子 IX 含量至 20-30IU/ml,然后调 PH 值至 6.50-7.50,并加入肝素钠至 0.1-0.4IU/单位 FIX,加入盐酸精氨酸和甘氨酸,所述的盐酸精氨酸在凝血因子 IX 浓缩液中的质量百分比浓度为 0.5-3%,所述的甘氨酸在凝血因子 IX 浓缩液中的质量百分比浓度为 0.5-3%;

10) 用 20 纳米滤芯进行除病毒过滤;

11) 用 0.22 μm 滤芯对产品进行除菌过滤并分装;

12) 冻干;

13) 在 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活,得到高纯人凝血因子 IX。

2. 根据权利要求 1 所述的一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,其特征在于:步骤 6) 中,所述的阴离子交换柱为 Capto-Q、Q-Sepharose FF、Q-Sepharose 4FF、Q-Sepharose HP、Q-Sepharose XL、DEAE-Sepharose FF、或者 Capto-DEAE 层析柱。

3. 根据权利要求 1 所述的一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,其特征在于:所述的肝素亲和柱为 Heparin Sepharose 6FF、Heparin Sepharose CL-6B。

一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,涉及一种人凝血因子 IX,具体来说是一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法。

背景技术

[0002] 人凝血因子 IX(FIX) 是人体十三种凝血因子中的一种,在人体凝血机制中扮演非常重要的作用。因缺乏凝血因子 IX 而导致凝血障碍即为乙型血友病,该病是一种遗传性疾病,患者以男性为主,发病率约为男性活婴的 1/30000,以自发性或创伤相关的出血为特征,出血部位主要在关节、软组织和肌肉。治疗的延迟或不足会引起各种并发症,包括关节反复出血相关的关节病和滑膜炎,严重时可导致关节畸形和功能障碍。另外,更严重的出血,尤其是颅内出血可能导致死亡。

[0003] 目前治疗乙型血友病唯一有效的方法就是及时注射含凝血因子 FIX 的药物以达到止血的目的,或者规律性注射含凝血因子 IX 的药物预防出血。含凝血因子 FIX 的药物有血浆提取的人凝血因子 FIX、人凝血酶原复合物以及基因重组的人凝血因子 IX 等,国外有冻干人凝血因子 IX 及重组人凝血因子 IX 制品,国内目前只有冻干人凝血酶原复合物品种。临床实践表明,乙型血友病人可以自我注射纯的人凝血因子 IX,通常不会有副作用,是比较安全的,但是注射人凝血酶原复合物却可能产生严重的副作用—血栓症,所以一般乙型血友病人输注该药时需在医院注射,留院观察以防意外。可见,纯化的人凝血因子 FIX 是治疗乙型血友病的首选药物,但传统的纯化人凝血因子 IX 生产工艺,工序较多,成本很高,且在生产过程中易出现凝血酶激活的问题而致产品失败,再加上传统工艺的病毒灭活手段单一,不能完全保证制品的安全,而干热病毒灭活方式往往导致较大的活力损失,所以,长期以来,纯化的人凝血因子 IX 一直未能取代虽有副作用但成本低廉的人凝血酶原复合物,

发明内容

[0004] 针对现有技术中的上述技术问题,本发明提供了一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,所述的这种高纯人凝血因子 IX 的制备方法解决了现有技术中制备人凝血因子 IX 的方法工序复杂、成本高,产品安全性不高的技术问题。

[0005] 本发明提供了一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,包括如下步骤:

[0006] 1) 将新鲜冰冻血浆融浆后离心去除冷沉淀,获得去冷胶血浆,然后将去冷胶血浆加热至 10-15℃;

[0007] 2) 将 DEAE-Sephadex A-50 凝胶置于一个不锈钢树脂桶中,先用温度在 75 ~ 85℃ 的注射用水充分溶胀,再用 10 ~ 20℃ 的注射用水冷却,然后用缓冲液平衡,所述的缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate(柠檬酸钠)的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.075M-0.15M,所述的缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,将上述平衡好的凝胶加入到去冷胶血浆中,按照每升去冷胶血浆加入 0.5-1.5 克干凝胶的比例加入平衡好的凝胶,搅拌 0.5-1.5 小时,再静置 10-20 分钟;

[0008] 3) 过滤去冷胶血浆,收集吸附了凝血因子 IX 的 DEAE-Sephadex A-50 凝胶,后用洗涤缓冲液冲洗树脂 4-6 次,所述的洗涤缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.1M-0.25M,所述的洗涤缓冲液的 PH 为 6.50-7.50;再用洗脱缓冲液洗脱树脂 2-4 次,所述的洗脱缓冲液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride(盐酸精氨酸)和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M、NaCl 的浓度为 0.5M-2.0M,所述的洗脱缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,收集洗脱液,然后用 0.45 μm 或 1.0 μm 滤芯过滤洗脱液,收集滤液,即为凝血因子 IX 粗品溶液;

[0009] 4) 在过滤后的洗脱液中加入聚乙二醇,加入后的聚乙二醇在洗脱液中的质量百分比浓度为 2-6%,搅拌 0.5-1.5 小时,过滤;

[0010] 5) 在上述的滤液中加入 Tween80,加入后的 Tween80 在上述滤液中的质量百分比浓度为 1.0%,再加入磷酸三丁酯,加入后的磷酸三丁酯在上述滤液中的质量百分比浓度为 0.3%,搅匀后升温至 24-26 $^{\circ}\text{C}$,后保温 6~7 小时;

[0011] 6) 然后降温至 5-15 $^{\circ}\text{C}$,用第一稀释液稀释至电导率不高于 15ms/cm,所述的第一稀释液为 0.01M Na-citrate 溶液,所述的第一稀释液的 PH 6.2-7.20,然后上阴离子交换柱,所述的阴离子交换柱预先用平衡缓冲液充分平衡,所述的平衡缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.1M-0.15M,所述的平衡缓冲液的 PH 为 6.20-7.20;再用洗涤缓冲液洗涤,所述的洗涤缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、NaCl 的浓度为 0.18-0.3M,所述的洗涤缓冲液的 PH 为 6.20-7.20,再用洗脱缓冲液洗脱,所述的洗脱缓冲液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.005M-0.015M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M、NaCl 的浓度为 0.5M-1.0M,所述的洗脱缓冲液的 PH 为 6.80-7.80,收集洗脱液即为纯化的凝血因子 IX 溶液;

[0012] 7) 用第二稀释液稀释步骤 6) 的洗脱液至电导率不高于 15ms/cm,所述的第二稀释液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride 组成,在所述的稀释液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M,所述的第二稀释液的 PH 为 6.50-7.50,然后上肝素亲和柱,所述的肝素亲和柱预先用平衡缓冲液充分平衡,所述的平衡缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M-0.02M、NaCl 的浓度为 0.1M-0.15M,所述的平衡缓冲液为 PH 6.50-7.50;再用洗涤缓冲液洗涤,所述的洗涤缓冲液由 Na-citrate 和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M-0.02M、NaCl 的浓度为 0.18-0.25M,所述的洗涤缓冲液的 PH 为 6.50-7.50;再用洗脱缓冲液洗脱,所述的洗脱缓冲液由 Na-citrate、Arginine Hydrochloride、和 NaCl 组成,在所述的缓冲液中,Na-citrate 的浓度为 0.01M-0.02M、Arginine Hydrochloride 的浓度为 0.02M、NaCl 的浓度为 0.4M-1.0M,所述的洗脱缓冲液的 PH 为 6.50-7.50,收集洗脱液,用 0.45 μm 或 0.22 μm 滤芯过滤以上洗脱液,所得滤液即为高纯凝血因子 IX 溶液;

[0013] 8) 用 10k 分子量的超滤膜浓缩以上滤液,然后恒体积透析,再浓缩至凝血因子 IX 活力高于 35IU/ml,得到凝血因子 IX 浓缩液;

[0014] 9) 调节人凝血因子 IX 含量至 20-30IU/ml,然后调 PH 值至 6.50-7.50,并加入肝素

钠至 0.1-0.4IU/单位 FIX,加入盐酸精氨酸和甘氨酸,所述的盐酸精氨酸在凝血因子 IX 浓缩液中的质量百分比浓度为 0.5-3%,所述的甘氨酸在凝血因子 IX 浓缩液中的质量百分比浓度为 0.5-3% ;

[0015] 10) 用 20 纳米滤芯进行除病毒过滤 ;

[0016] 11) 用 0.22 μm 滤芯对产品进行除菌过滤并分装 ;

[0017] 12) 冻干 ;

[0018] 13) 在 100℃沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活,得到高纯人凝血因子 IX。

[0019] 进一步的,步骤 6) 中,所述的阴离子交换柱为 Capto-Q、Q-Sepharose FF、Q-Sepharose 4FF、Q-Sepharose HP、Q-Sepharose XL、DEAE-Sepharose FF、或者 Capto-DEAE 层析柱。

[0020] 进一步的,所述的上肝素亲和柱为 Heparin Sepharose 6FF、Heparin Sepharose CL-6B。

[0021] 本发明采用经典的 DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附,获得富含凝血因子 FIX 的粗品,该凝胶吸附为批处理,对血浆的澄清度无特殊要求,无需过滤,故处理时间短,同时该工序操作简单,凝血因子 IX 损失少;本发明获取 FIX 粗品后,加入 PEG 沉淀剂,使杂蛋白从凝血因子 IX 溶液中沉降、过滤,除掉大部分杂蛋白;同时,PEG 也是蛋白保护剂,在接下来的 S/D 病毒灭活工序可防止凝血因子 IX 变性失活;本发明选用 Capto-Q 新型高效强阴离子填料,分辨率高,压降小,流速快,比传统填料可节省很多操作时间;由此获得纯化的凝血因子 IX;本发明选用 Heparin Sepharose 6FF 亲和填料,对纯化的 FIX 进一步精制,获得最高达 153IU/mg 的比活;本发明在凝胶吸附及后续的两步柱层析操作中,在洗脱缓冲液中均加入了蛋白保护剂精氨酸盐酸盐,中间的超滤透析操作中也加入了精氨酸盐酸盐,大大降低了 FIX 制品凝血酶激活的概率,提高了产品的合格率;本发明的生产流程中共使用了 S/D 病毒灭活、20 纳米膜过滤去病毒及干热病毒灭活三重灭除病毒措施,对脂包膜病毒、非脂包膜病毒及细小病毒进行了有效灭除,极大提高了产品的使用安全性。

[0022] 本发明和已有技术相比,其技术进步是显著的。本发明的一种从去冷胶血浆中制备冻干人凝血因子 FIX 的方法,该工艺流程简洁,操作方便,易于实现工业化,且该工艺具有产品得率高、比活高的优点,产品经三步病毒灭活,使用安全可靠。

附图说明

[0023] 图 1 是本发明的一种制备高纯人凝血因子 IX 的工艺流程框图。

具体实施方式

[0024] 实施例 1

[0025] 一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,包括如下步骤:

[0026] 1) 取冰冻血浆 35 袋,表面用 70%乙醇淋洗并用冷注射用水冲洗后,割袋,倒入不锈钢融浆桶中,在 0-3℃水浴中融化,后精确称取 20kg,离心去除冷沉淀,获得去冷胶血浆 19.8kg,然后置于 15℃水浴中加热去冷胶血浆至 13-15℃ ;

[0027] 2) 称取 20 克 DEAE-Sephadex A-50 凝胶置于凝胶桶中,先用约 2kg 热注射用水(约 80℃)充分溶胀,再用约 2kg 冷注射用水(约 15℃)冲洗冷却,后用约 1kg 缓冲液(PH6.50,

0.01M Na-citrate,0.075M NaCL,15℃)平衡,然后加到去冷胶血浆中,缓慢搅拌1小时,后静置10分钟;

[0028] 3)在凝胶桶中用滤布过滤去冷胶血浆,收集DEAE-Sephadex A-50凝胶,然后在凝胶桶中加入2升洗涤缓冲液(PH6.50,0.01M Na-citrate,0.1M NaCL)搅拌约10分钟,后经滤布过滤后从桶底放掉洗涤液,如此反复冲洗凝胶4次,再用洗脱缓冲液(PH6.50,0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,0.5M NaCL)洗脱凝胶3次,每次2升,收集洗脱液约2005g,用0.45 μm滤芯过滤洗脱液,去除碎胶微粒,得到滤液1950克;

[0029] 4)称取PEG(聚乙二醇)65克,先溶于65克注射用水中,后加入到滤液中,搅拌0.5小时后过滤,收集滤液2036克;

[0030] 5)以上滤液中加入S/D母液(即Tween8010%(wt%),TNBP(磷酸三丁酯)至3%(wt%))225克,搅匀后升温至24-26℃,后保温6小时;

[0031] 6)将S/D后溶液降温至5℃,用稀释液(0.01M Na-citrate溶液,PH6.20)稀释上述溶液至原溶液重量的3.5倍,然后上阴离子交换柱Q-Sepharose FF,层析柱预先用平衡缓冲液(0.01M Na-citrate,0.1M NaCL溶液,PH6.20)充分平衡;上柱结束后用平衡缓冲液冲洗柱子,后用洗涤缓冲液(0.01M Na-citrate,0.18M NaCL溶液,PH6.20)洗涤,再用洗脱缓冲液(0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,0.5M NaCL溶液,PH6.80)洗脱,收集洗脱液用0.45 μm滤芯过滤;

[0032] 7)用稀释液(0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,PH6.50-7.50)稀释以上滤液,然后上Heparin Sepharose 6FF柱,层析柱预先用平衡缓冲液充分平衡,平衡缓冲液为0.01M Na-citrate,0.15M NaCL溶液(PH6.80),后用洗涤缓冲液(0.01M Na-citrate,0.18M NaCL溶液,PH6.80)洗涤,再用洗脱缓冲液(0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,0.5M NaCL溶液,PH6.80)洗脱,收集洗脱液810克,用0.45 μm滤芯过滤洗脱液得到滤液772g;

[0033] 8)用10k分子量的超滤膜(0.1M²)浓缩洗脱液至约300ml,后用1.5升透析液(0.01M Na-citrate,0.1M NaCL溶液,PH7.00)恒体积透析,再次浓缩并移出超滤膜包,得到浓缩液245克,测得FIX活力35.1IU/ml;

[0034] 9)调节人凝血因子IX含量至30IU/ml,根据计算,称取盐酸精氨酸1.5克,甘氨酸8.3克,加入步骤9所述透析液23克,将盐酸精氨酸、甘氨酸加入透析液悬浮,后加到步骤9所述浓缩液中,然后调PH值至7.00,并加入肝素钠至0.15IU/单位九因子;

[0035] 10)用20纳米滤芯进行除病毒过滤;

[0036] 11)用0.22 μm滤芯对产品进行除菌过滤并分装,10ml/瓶;

[0037] 12)冻干;

[0038] 13)在100℃沸水浴中保温30分钟,进行干热病毒灭活;测FIX活力,28.1IU/ml;

[0039] 实施例2

[0040] 一种高纯人凝血因子FIX的制备方法,包括如下步骤:

[0041] 1)同实施例1;

[0042] 2)DEAE-Sephadex A-50凝胶的用量、溶胀与冷却同实施例1,后用约1kg缓冲液(PH7.35,0.01M Na-citrate,0.15M NaCL,15℃)平衡,然后加到去冷胶血浆中,缓慢搅拌1小时,后静置20分钟;

[0043] 3) 在凝胶桶中用滤布过滤去冷胶血浆,收集 DEAE-Sephadex A-50 凝胶,然后在凝胶桶中加入 2 升洗涤缓冲液 (PH7.35,0.015M Na-citrate,0.2M NaCl) 搅拌约 5 分钟,后经滤布过滤后从桶底放掉洗涤液,如此反复冲洗凝胶 6 次;再用洗脱缓冲液 (PH7.35,0.015M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,1.0M NaCl) 洗脱凝胶 4 次,每次 1 升,收集洗脱液约 3988g,用 0.45 μm 滤芯过滤洗脱液,得到滤液 3936 克;

[0044] 4) 称取 PEG(聚乙二醇)260 克,先溶于 260 克注射用水中,后加入到滤液中,搅拌 1.5 小时后过滤,收集滤液 4402 克;

[0045] 5) 以上滤液中加入 S/D 母液(即 Tween8010% (wt%),TNBP(磷酸三丁酯)至 3% (wt%))500 克,搅匀后升温至 24-26°C,后保温 6 小时;

[0046] 6) 将 S/D 后溶液降温至 15°C,用稀释液 (0.01M Na-citrate 溶液,PH7.20) 稀释上述溶液至电导率 13.8ms/cm,然后上 DEAE-Sepharose FF 层析柱,层析柱预先用平衡缓冲液 (0.01M Na-citrate,0.15M NaCl 溶液,PH7.20) 充分平衡;上柱结束后用平衡缓冲液冲洗,后用洗涤缓冲液 (0.01M Na-citrate,0.3M NaCl 溶液,PH7.20) 洗涤,再用洗脱缓冲液 (0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,1.0M NaCl 溶液,PH7.80) 洗脱,收集洗脱液,用 0.45 μm 滤芯过滤;

[0047] 7) 用稀释液 (0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,PH7.50) 稀释以上滤液,然后上 Heparin Sepharose CL-6B 柱,层析柱预先用平衡缓冲液充分平衡,平衡缓冲液为 0.01M Na-citrate,0.15M NaCl 溶液 (PH7.50),后用洗涤缓冲液 (0.01M Na-citrate,0.2M NaCl,PH7.50) 洗涤,再用洗脱缓冲液 (0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,1.0M NaCl,PH7.50) 洗脱,收集洗脱液 764 克,用 0.45 μm 滤芯过滤洗脱液得到滤液 713g;

[0048] 8) 用 10k 分子量的超滤膜 (0.1M²) 浓缩洗脱液至约 300ml,后用 1.5 升透析液 (0.01M Na-citrate,0.1M NaCl 溶液,PH7.50) 恒体积透析,再次浓缩并移出超滤膜包,得到浓缩液 237 克,测得 FIX 活力 36IU/ml;

[0049] 9) 调节人凝血因子 FIX 含量至 30IU/ml,根据计算,称取盐酸精氨酸 8.6 克,甘氨酸 1.5 克,加入步骤 9 所述透析液 48 克,将盐酸精氨酸、甘氨酸加入透析液溶解,后加到步骤 9 所述浓缩液中,然后调 PH 值至 7.00,并加入肝素钠至 0.3IU/单位九因子;

[0050] 10) 用 20 纳米滤芯进行除病毒过滤;

[0051] 11) 用 0.22 μm 滤芯对产品进行除菌过滤并分装,10ml/瓶;

[0052] 12) 冻干;

[0053] 13) 在 100°C 沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活;测 FIX 活力,27.8IU/ml。

[0054] 实施例 3

[0055] 一种高纯人凝血因子 IX 的制备方法,包括如下步骤:

[0056] 1) 同实施例 1;

[0057] 2) DEAE-Sephadex A-50 凝胶的用量、溶胀与冷却同实施例 1,后约 1kg 缓冲液 (PH7.05,0.01M Na-citrate,0.10M NaCl,15°C) 平衡,然后加到去冷胶血浆中,缓慢搅拌 1 小时,后静置 20 分钟;

[0058] 3) 在凝胶桶中用滤布过滤去冷胶血浆,收集 DEAE-Sephadex A-50 凝胶,然后在凝胶桶中加入 2 升洗涤缓冲液 (PH7.05,0.01M Na-citrate,0.15M NaCl) 搅拌约 8 分钟,后

经滤布过滤后从桶底放掉洗涤液,如此反复冲洗凝胶 5 次,再用洗脱缓冲液 (PH7.05,0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,0.65M NaCL) 洗脱凝胶 3 次,每次 1 升,收集洗脱液约 2955g,用 0.45 μ m 滤芯过滤洗脱液,得到滤液 2904 克;

[0059] 4) 称取 PEG(聚乙二醇)130 克,先溶于 130 克注射用水中,后加入到滤液中,搅拌 1 小时后过滤,收集滤液 3108 克;

[0060] 5) 以上滤液中加入 S/D 母液(即 Tween8010% (wt%),TNBP(磷酸三丁酯)至 3% (wt%))350 克,搅匀后升温至 24-26 $^{\circ}$ C,后保温 6 小时;

[0061] 6) 将 S/D 后溶液降温至 10 $^{\circ}$ C,用稀释液(0.01M Na-citrate 溶液,PH7.05)稀释上述溶液,然后上 Capto-Q 层析柱,层析柱预先用平衡缓冲液(0.01M Na-citrate,0.15M NaCL 溶液,PH7.05)充分平衡;上柱结束后用平衡缓冲液冲洗,后用洗涤缓冲液(0.01M Na-citrate,0.25M NaCL 溶液,PH6.20)洗涤,再用洗脱缓冲液(0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,0.6M NaCL 溶液,PH7.05)洗脱,收集洗脱液,用 0.45 μ m 滤芯过滤;

[0062] 7) 用稀释液(0.01M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,PH6.50-7.50)稀释以上洗脱液,然后上 Heparin Sepharose 6FF 柱,层析柱预先用平衡缓冲液充分平衡,平衡缓冲液为 0.01M Na-citrate,0.15M NaCL 溶液 (PH7.15),后用洗涤缓冲液(0.02M Na-citrate,0.25M NaCL 溶液,PH7.15)洗涤,再用洗脱缓冲液(0.02M Na-citrate,0.02M Arginine Hydrochloride,0.65M NaCL 溶液,PH7.15)洗脱,收集洗脱液 739 克,用 0.45 μ m 滤芯过滤洗脱液得到滤液 692g;

[0063] 8) 用 10k 分子量的超滤膜(0.1M²)浓缩洗脱液至约 300ml,后用 1.5 升透析液(0.01M Na-citrate,0.1M NaCL 溶液,PH7.15)恒体积透析,再次浓缩并移出超滤膜包,得到浓缩液 218 克,测得 FIX 活力 38IU/ml;

[0064] 9) 调节人凝血因子 IX 含量至 30IU/ml,根据计算,称取盐酸精氨酸 4.2 克,甘氨酸 4.2 克,加入步骤 9 所述透析液 50 克,将盐酸精氨酸、甘氨酸加入透析液溶解,后加到步骤 9 所述浓缩液中,然后调 PH 值至 7.15,并加入肝素钠至 0.2IU/单位九因子;

[0065] 10) 用 20 纳米滤芯进行除病毒过滤;

[0066] 11) 用 0.22 μ m 滤芯对产品进行除菌过滤并分装,10ml/瓶;

[0067] 12) 冻干;

[0068] 13) 在 100 $^{\circ}$ C 沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活;测 FIX 活力,27.1IU/ml。

[0069] 试制品 FIX 收率及比活一览表

[0070]

	冰冻血浆 重量, kg	去冷胶血浆 FIX 含量, IU/ml	高纯 FIX 原液质量, g	FIX 收率 IU/升血浆	FIX 比活 IU/mg
试制品 1	20	0.79	278	375	153
试制品 2	20	0.81	295	398	135
试制品 3	20	0.77	276	373	141

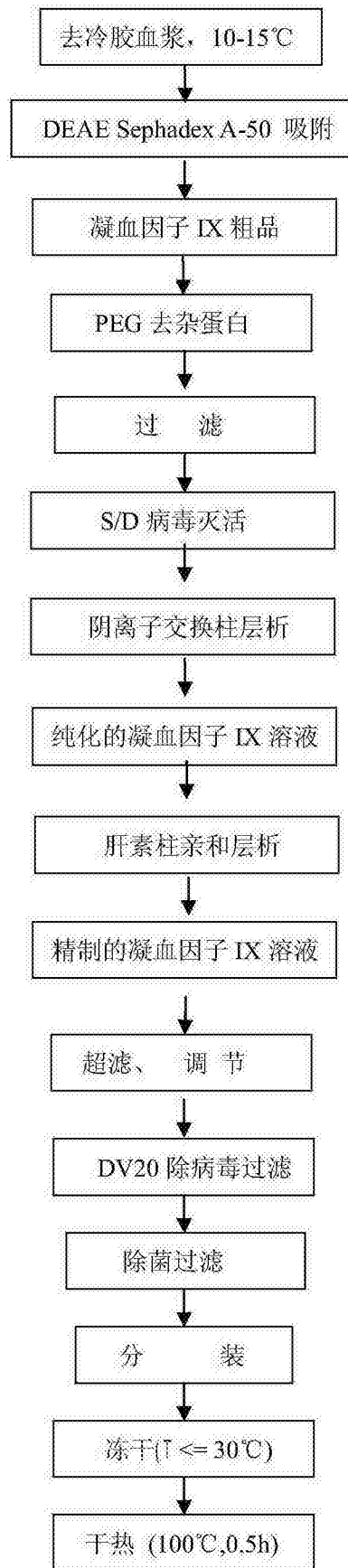


图 1