



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105330736 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201510748336. 0

(22) 申请日 2015. 11. 06

(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

(51) Int. Cl.

C07K 14/745(2006. 01)

C07K 1/36(2006. 01)

C07K 1/30(2006. 01)

C07K 1/34(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

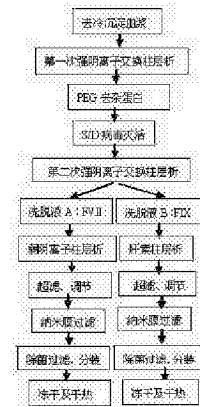
权利要求书3页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,包括如下步骤:(1) 血浆去冷胶;(2) 第一次强阴离子交换柱层析;(3) PEG 沉淀去杂蛋白;(4) S/D 病毒灭活;(5) 第二次强阴离子交换柱层析分别得到 FVII 洗脱液与 FIX 洗脱液;(6) 弱阴离子交换柱层析纯化凝血 FVII;(7) 肝素亲和柱层析纯化凝血 FIX;(8) 超滤;(9) 加稳定剂及调节;(10) 纳米膜除病毒过滤;(11) 除菌过滤并分装;(12) 冻干;(13) 干热病毒灭活。本发明采用 PEG 沉淀去杂蛋白,通过离子交换层析结合亲和层析纯化技术,实现了同时制备高纯 FVII 及 FIX 的目标,工艺流程简单,生产周期短,产品经三步病毒灭除措施,使用安全性高。



1. 一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 去冷胶血浆的制取

将新鲜冰冻血浆融化,在 0-3℃ 下连续离心,去除冷胶,上清即为去冷胶血浆,后用颇尔公司生产的 Supradur 50P 滤板串联 0.45 μ m 滤芯过滤,得到澄清的去冷胶血浆;过滤前,用缓冲液预洗滤芯;缓冲液由柠檬酸钠、氯化钠及水组成,其中柠檬酸钠浓度为 0.01M-0.02M,氯化钠浓度为 0.075M-0.15M 氯化钠,缓冲液 PH 值为 6.50-7.50,温度 10-15℃;

(2) 第一次强阴离子交换柱层析

步骤(1)得到的澄清去冷胶血浆上强阴离子交换柱,柱子预先用平衡缓冲液 1 平衡;上柱过程中收集穿透液于带低温冷媒夹套的坦克中,用于后续血制品的加工生产;上柱结束后,用平衡缓冲液 1 冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 1 洗脱柱子,收集洗脱液,即为富含 FVII 与 FIX 的溶液;

(3) PEG 沉淀去杂蛋白

在步骤(2)收集的洗脱液中加入 50%PEG 溶液使最终 PEG 浓度至 3-6%,搅拌 0.5-1.5 小时,后用 1.0 μ m 滤芯过滤,收集澄清的滤液;

(4) S/D 病毒灭活

在步骤(3)收集的滤液中加入 Tween80 至 1.0% (wt%), TNBP (磷酸三丁酯) 至 0.3% (wt%),搅匀后升温至 24-26℃,后保温 6-7 小时;

(5) 第二次强阴离子柱层析

将上述 S/D 后的溶液用稀释液稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),然后上强阴离子柱,柱子预先用平衡缓冲液 2 平衡;上柱结束后,用平衡缓冲液 2 冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 2A 洗脱柱子,所得洗脱液 A 即为凝血 FVII 粗品;再用洗脱缓冲液 2B 洗脱,收集洗脱液 B 即为凝血 FIX 粗品;

(6) 弱阴离子柱层析纯化凝血 FVII

将上述洗脱液 A 用稀释液稀释到原来的 2-4 倍,然后上弱阴离子柱,柱子预先用平衡缓冲液 3 平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液 3 冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 3 洗脱柱子,所得洗脱液即为精制的凝血 FVII 溶液;用 0.45 μ m 滤芯过滤得到澄清滤液;

(7) 肝素亲和柱层析纯化凝血 FIX

将以上洗脱液 B 用稀释液稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),上肝素亲和柱,柱子预先用平衡缓冲液 4 平衡,后用洗涤缓冲液 4 洗涤,再用洗脱缓冲液 4 洗脱,收集洗脱液,用 0.45 μ m 滤芯过滤,所得滤液即为精制的凝血 FIX 溶液;

(8) 超滤

用 5K~10k 截留分子量的超滤膜包分别浓缩以上 FVII 及 FIX 滤液,并用透析液分别恒体积透析 4-6 倍,后浓缩至所需活力效价后移出超滤膜包;

(9) 加稳定剂及调节

按照所需规格分别调节人凝血 FVII 的效价及 FIX 的效价至所需值(一般为 20-30IU/ml),后分别加入稳定剂并分别调 PH 值至 6.50-7.50;

(10) 纳米膜除病毒过滤

分别用 15-20 纳米滤芯对以上 FVII 及 FIX 溶液进行除病毒过滤；

(11) 除菌过滤并分装

分别用 0.22 μ m 滤芯对以上 FVII 及 FIX 溶液进行

(12) 冻干

分别冻干以上凝血 FVII 及 FIX 原液,得到凝血 FVII 及 FIX 冻干粉；

(13) 干热除病毒过滤

分别或同时将 FVII 及 FIX 冻干品在 100 $^{\circ}$ C 沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活。

2. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(2)所述的强阴离子交换柱层析所用填料为 Capto Q, Q Sepharose FF, Q Sepharose 4FF Q Sepharose HP, Q Sepharose XL 中的任意一种。

3. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(2)所述的柱层析所用的平衡缓冲液 1 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.075M-0.15M 氯化钠, PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 1 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.4M-0.8M 氯化钠, 0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

4. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(6)所述的强阴离子交换柱层析所用填料为 Capto Q, Q Sepharose FF, Q Sepharose 4FF Q Sepharose HP, Q Sepharose XL 中的任意一种;步骤(5)所述的平衡缓冲液 2 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.075M-0.15M 氯化钠, PH6.50-7.50;步骤(5)所述的洗脱缓冲液 2A 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.175M-0.35M 氯化钠, 0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50;步骤(5)所述的洗脱缓冲液 2B 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.5M-1.0M 氯化钠, 0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

5. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(6)所述的弱阴离子交换柱层析所用填料为 DEAE-Sepharose FF 或 Capto DEAE;步骤(6)所述的平衡缓冲液 3 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.075M-0.1M 氯化钠, PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 3 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.15M-0.30M 氯化钠, 0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

6. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(7)所述的肝素亲和柱层析所用填料为 Heparin Sepharose FF 或 Heparin Sepharose CL-6B;步骤(7)所述的平衡缓冲液 4 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.1M-0.15M 氯化钠溶液, PH6.50-7.50;所述的洗涤缓冲液 4 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.15-0.25M 氯化钠溶液, PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 4 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸, 0.4M-1.0M 氯化钠溶液, PH6.50-7.50。

7. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(5)~(7)所述的稀释液组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠, 0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

8. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(8)所述的透析液组成为 0.01M 柠檬酸钠, 0.075 M -0.125M 氯化钠, PH6.50-7.50;该透析液对 FVII 及 FIX 均适合。

9. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,

其特征在于：步骤(9)所述的稳定剂，对于 FVIII 而言，稳定剂是精氨酸盐酸盐与甘氨酸，其中精氨酸盐酸盐加至 0.5-3%，甘氨酸加至 0.5-3%；对于 FIX 而言，稳定剂是组氨酸与甘氨酸，其中组氨酸加至 0.5-3%，甘氨酸加至 0.5-3%。

10. 根据权利要求 1-9 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法，其特征在于：FVII 冻干制剂与 FIX 冻干制剂均经历了 S/D 病毒灭活、纳米膜除病毒过滤及干热病毒灭活三个步骤。

一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法

技术领域

[0001] 本发明属生物制药领域,涉及血液制品的制备,具体讲是涉及一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法。

背景技术

[0002] 人凝血因子 VII(FVII)与人凝血因子 IX(FIX)均是肝脏合成的维生素 K 依赖的凝血因子,前者由 406 个氨基酸残基组成,分子量约 50KD, 等电点 4.9, 血浆中浓度为 0.5-2mg/L, 后者由 416 个氨基酸残基所组成,分子量约 57KD,血浆中浓度为 5mg/L 左右。两种凝血因子在凝血过程中均发挥着非常重要的作用。其中 FVII 是机体外源凝血途径的始动因子,无论是原发性的还是继发性的 F VII 缺乏,都有可能造成出血,甚至危及生命,故对于 F VII 缺乏的患者,输注浓缩的纯化 F VII, 可以纠正其出血倾向,恢复正常的凝血机能。

[0003] 近年来,重组活化人凝血 VIIa 对血小板减少症和血小板功能障碍、严重创伤、大面积外科手术的血具有令人满意的治疗效果,也成为带有凝血因子 VIII 或 IX 抑制物的先天性 A 型或 B 型血友病人的替代疗法。可见人凝血因子 VII 的临床需求是十分巨大的。而人体因缺乏凝血 FIX 则会导致凝血障碍即为乙型血友病,该病是一种遗传性疾病,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。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 FIX 的药物以达到止血的目的,或者定期注射含凝血 FIX 的药物预防出血。含凝血 FIX 的药物有血浆提取的高纯人凝血 FIX、人凝血酶原复合物(PCC)以及基因重组人凝血 FIX(辉瑞公司生产的“贝赋”)等,国内目前只有冻干人凝血酶原复合物(PCC)品种。临床实践表明,乙型血友病人注射高纯人凝血 FIX 很安全,而注射人凝血酶原复合物却可能产生严重的副作用—血栓症,所以高纯人凝血 FIX 是治疗乙型血友病的首选药物,但传统的高纯人凝血 FIX 生产工艺,工序复杂,在制备 FIX 过程中,将宝贵的 FVII 当作杂质去除,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。

[0004] 针对这一现状,本发明开发了一种从去冷胶血浆中同时制备高纯 FVII 及 FIX 的方法,本发明采用离子交换层析结合亲和层析技术及 PEG 沉淀去杂,实现了纯化、精制 FVII 及 FIX 的目标,流程简单,生产周期短,FVII 与 FIX 的收率均超过 50%。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种工艺稳定、产品质量好、得率高、成本低及生产效率高的能同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法。

[0006] 1. 一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 去冷胶血浆的制取

将新鲜冰冻血浆融化,在 0-3℃ 下连续离心,去除冷胶,上清即为去冷胶血浆,后用颇尔公司生产的 Supradur 50P 滤板串联 0.45 μ m 滤芯过滤,得到澄清的去冷胶血浆;过滤前,用缓冲液预洗滤芯;缓冲液由柠檬酸钠、氯化钠及水组成,其中柠檬酸钠浓度为 0.01M-0.02M,氯化钠浓度为 0.075M-0.15M 氯化钠,缓冲液 PH 值为 6.50-7.50,温度 10-15℃;

(2) 第一次强阴离子交换柱层析

步骤(1)得到的澄清去冷胶血浆上强阴离子交换柱,柱子预先用平衡缓冲液 1 平衡;上柱过程中收集穿透液于带低温冷媒夹套的坦克中,用于后续血制品的加工生产;上柱结束后,用平衡缓冲液 1 冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 1 洗脱柱子,收集洗脱液,即为富含 FVII 与 FIX 的溶液;

(3) PEG 沉淀去杂蛋白

在步骤(2)收集的洗脱液中加入 50%PEG 溶液使最终 PEG 浓度至 3-6%,搅拌 0.5-1.5 小时,后用 1.0 μ m 滤芯过滤,收集澄清的滤液;

(4) S/D 病毒灭活

在步骤(3)收集的滤液中加入 Tween80 至 1.0% (wt%), TNBP (磷酸三丁酯) 至 0.3% (wt%),搅匀后升温至 24-26℃,后保温 6-7 小时;

(5) 第二次强阴离子柱层析

将上述 S/D 后的溶液用稀释液稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),然后上强阴离子柱,柱子预先用平衡缓冲液 2 平衡;上柱结束后,用平衡缓冲液 2 冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 2A 洗脱柱子,所得洗脱液 A 即为凝血 FVII 粗品;再用洗脱缓冲液 2B 洗脱,收集洗脱液 B 即为凝血 FIX 粗品;

(6) 弱阴离子柱层析纯化凝血 FVII

将上述洗脱液 A 用稀释液稀释到原来的 2-4 倍,然后上弱阴离子柱,柱子预先用平衡缓冲液 3 平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液 3 冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 3 洗脱柱子,所得洗脱液即为精制的凝血 FVII 溶液;用 0.45 μ m 滤芯过滤得到澄清滤液;

(7) 肝素亲和柱层析纯化凝血 FIX

将以上洗脱液 B 用稀释液稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),上肝素亲和柱,柱子预先用平衡缓冲液 4 平衡,后用洗涤缓冲液 4 洗涤,再用洗脱缓冲液 4 洗脱,收集洗脱液,用 0.45 μ m 滤芯过滤,所得滤液即为精制的凝血 FIX 溶液;

(8) 超滤

用 5K~10k 截留分子量的超滤膜包分别浓缩以上 FVII 及 FIX 滤液,并用透析液分别恒体积透析 4-6 倍,后浓缩至所需活力效价后移出超滤膜包;

(9) 加稳定剂及调节

按照所需规格分别调节人凝血 FVII 的效价及 FIX 的效价至所需值(一般为 20-30IU/ml),后分别加入稳定剂并分别调 PH 值至 6.50-7.50;

(10) 纳米膜除病毒过滤

分别用 15-20 纳米滤芯对以上 FVII 及 FIX 溶液进行除病毒过滤;

(11) 除菌过滤并分装

分别用 0.22 μ m 滤芯对以上 FVII 及 FIX 溶液进行

(12) 冻干

分别冻干以上凝血 FVII 及 FIX 原液,得到凝血 FVII 及 FIX 冻干粉;

(13) 干热除病毒过滤

分别或同时将 FVII 及 FIX 冻干品在 100℃沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活。

[0007] 2. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(2)所述的强阴离子交换柱层析所用填料为 Cpto Q, Q Sepharose FF, Q Sepharose 4FF Q Sepharose HP, Q Sepharose XL 中的任意一种。

[0008] 3. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(2)所述的柱层析所用的平衡缓冲液 1 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.075M-0.15M 氯化钠,PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 1 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.4M-0.8M 氯化钠,0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

[0009] 4. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(6)所述的强阴离子交换柱层析所用填料为 Cpto Q, Q Sepharose FF, Q Sepharose 4FF Q Sepharose HP, Q Sepharose XL 中的任意一种;步骤(5)所述的平衡缓冲液 2 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.075M-0.15M 氯化钠, PH6.50-7.50;步骤(5)所述的洗脱缓冲液 2A 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.175M-0.35M 氯化钠,0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50;步骤(5)所述的洗脱缓冲液 2B 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.5M-1.0M 氯化钠,0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

[0010] 5. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(6)所述的弱阴离子交换柱层析所用填料为 DEAE-Sepharose FF 或 Cpto DEAE;步骤(6)所述的平衡缓冲液 3 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.075M-0.1M 氯化钠, PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 3 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.15M-0.30M 氯化钠,0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

[0011] 6. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(7)所述的肝素亲和柱层析所用填料为 Heparin Sepharose FF 或 Heparin Sepharose CL-6B;步骤(7)所述的平衡缓冲液 4 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.1M-0.15M 氯化钠溶液, PH6.50-7.50;所述的洗涤缓冲液 4 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.15-0.25M 氯化钠溶液, PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 4 组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.02M 盐酸精氨酸,0.4M-1.0M 氯化钠溶液, PH6.50-7.50。

[0012] 7. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(5)~(7)所述的稀释液组成为 0.01M-0.02M 柠檬酸钠,0.02-0.04M 盐酸精氨酸, PH6.50-7.50。

[0013] 8. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(8)所述的透析液组成为 0.01M 柠檬酸钠,0.075 M -0.125M 氯化钠, PH6.50-7.50;该透析液对 FVII 及 FIX 均适合。

[0014] 9. 根据权利要求 1 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在于:步骤(9)所述的稳定剂,对于 FVIII 而言,稳定剂是精氨酸盐酸盐与甘氨酸,其中精氨酸盐酸盐加至 0.5-3%,甘氨酸加至 0.5-3%;对于 FIX 而言,稳定剂是组氨酸与甘氨酸,其中组氨酸加至 0.5-3%,甘氨酸加至 0.5-3%。

[0015] 10. 根据权利要求 1-9 所述的一种从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的方法,其特征在於:FVII 冻干制剂与 FIX 冻干制剂均经历了 S/D 病毒灭活、纳米膜除病毒过滤及干热病毒灭活三个步骤。

[0016] 本发明的优越性

1,本发明采用离子交换填料及肝素亲和填料从血浆中同时制备高纯人凝血 FVII 及凝血 FIX,流程简洁,技术成熟,血浆利用率高;

2,采用 PEG 沉淀去除杂蛋白,大大减轻了后续柱层析的纯化压力,提高了终产品的比活;

3,PEG 的引入,在 S/D 过程中起蛋白保护作用,防止蛋白变性及凝血因子失活;

4,在柱层析操作中,在洗脱缓冲液中均加入了蛋白保护剂,大大降低了制品被激活的概率;

5,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病三重灭除病毒措施,对脂包膜病毒、非脂包膜病毒及细小病毒进行了有效灭除,大大提高了产品的使用安全性。

附图说明

[0017] 图 1 是从去冷胶血浆中同时制备人凝血因子 IX 及 VII 的工艺流程图。

具体实施方式

下面结合附图及实施例对本发明做进一步的说明,不能认为本发明的实施方式仅限于此,对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下所做出的若干简单的改变或替换,都应视为属于本发明权利要求书确定的专利保护范围。

[0018] 实施例一

1,去冷胶血浆的制备:取冰冻血浆 35 袋,用 70% 乙醇消毒并用注射用水冲洗后割袋,在夹套坦克中将冰冻血浆融化,称取 20kg,在 0-3℃ 下连续离心,去除冷胶,收集上清,后用颇尔公司生产的 Supradur 50P 滤板串联 0.45μm 滤芯过滤,得到澄清的去冷胶血浆;过滤前,用缓冲液(PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠)预洗滤芯;

2,第一次强阴离子交换柱层析:将步骤 1 得到的澄清去冷胶血浆上 Q Sepharose 4FF 柱,柱子预先用平衡缓冲液(PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液(PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.8M 氯化钠,0.04M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,收集洗脱液;

3,PEG 沉淀去杂蛋白:以上洗脱液中加入 50%PEG 溶液使最终 PEG 浓度至 3%,搅拌 1.5 小时,后用 1.0μm 串联 0.45μm 滤芯过滤,得到澄清的滤液;

4,S/D 病毒灭活:以上滤液中加入 Tween80 至 1.0%(wt%),TNBP(磷酸三丁酯)至 0.3%(wt%),搅匀后升温至 24-26℃,后保温 6 小时;

5,第二次强阴离子柱层析:将上述 S/D 后的溶液用稀释液(PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.04M 盐酸精氨酸)稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),然后上 Q Sepharose 4FF 柱,柱子预先用平衡缓冲液(PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.15M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液洗涤柱子,然后用洗脱缓冲液 A (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸

钠, 0.25M 氯化钠, 0.04M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,收集洗脱液 A (凝血七因子粗品);再用洗脱缓冲液 B (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.5M 氯化钠, 0.04M 盐酸精氨酸)洗脱,收集洗脱液 B (凝血 FIX 粗品),置于 2-8℃;

6, 弱阴离子柱层析纯化凝血 FVII: 将上述洗脱液 A 用稀释液 (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.04M 盐酸精氨酸)稀释到原来的 2.5 倍,然后上 DEAE-Sepharose FF 柱,柱子预先用平衡缓冲液 (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液洗涤柱子,然后用洗脱缓冲液 (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.2M 氯化钠, 0.04M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,得到精制的凝血七因子溶液;用 0.45 μ m 滤芯过滤得到澄清滤液,置于 2-8℃;

7, 肝素亲和柱层析纯化凝血 FIX: 将步骤 5 得到的洗脱液 B 用稀释液 (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.04M 盐酸精氨酸)稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),上 Heparin Sepharose 6FF 柱,柱子预先用平衡缓冲液平衡,平衡缓冲液为 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10),后用洗涤缓冲液 (0.02M 柠檬酸钠, 0.175M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10)洗涤,再用洗脱缓冲液 (0.02M 柠檬酸钠, 0.04M 盐酸精氨酸, 0.5M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10)洗脱,收集洗脱液,用 0.45 μ m 滤芯过滤以上洗脱液,得到精制的凝血 FIX 溶液;

8, 用 10k 分子量的超滤膜包分别浓缩步骤 6, 7 得到的凝血 FVII 及 FIX 滤液,并用透析液 (0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10)分别透析,后浓缩至所需活力效价后移出超滤膜包,分别得到凝血 FVII 及凝血 FIX 浓缩液 205 克, 231 克,活力分别为 39.7IU/ml, 36.4IU/ml;

9, 按照 30IU/ml 的规格分别调节人凝血 FVII 溶液及 FIX 溶液的活力,后分别调 PH 值至 6.90-7.10,在 FVII 溶液中加入精氨酸盐酸盐至 0.5%,甘氨酸至 3%,做为稳定剂;在 FIX 溶液中加入组氨酸 0.5%,甘氨酸至 3%,做为稳定剂;

10, 分别用 20 纳米滤芯对以上凝血 FVII 及 FIX 溶液进行除病毒过滤;

11, 分别用 0.22 μ m 滤芯对以上凝血 FVII 及 FIX 溶液进行除菌过滤并分装;

12, 将以上分装好的样品放入两台冻干机分别冻干,得到凝血 FVII 及 FIX 冻干品;

13, 同时将 FVII 及 FIX 冻干品在 100℃沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活。

[0019] 实施例二

1, 去冷胶血浆的制备:同实施例一;

2, 第一次强阴离子交换柱层析: 将步骤 1 得到的澄清去冷胶血浆上 Capto-Q 柱,柱子预先用平衡缓冲液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.8M 氯化钠, 0.02M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,收集洗脱液(富含凝血 FVII 与 FIX);

3, PEG 沉淀去杂蛋白: 以上洗脱液中加入 50%PEG 溶液使最终 PEG 浓度至 6%, 搅拌 0.5 小时,后用 1.0 μ m 串联 0.45 μ m 滤芯过滤,得到澄清的滤液;

4, S/D 病毒灭活:同实施例一;

5, 第二次强阴离子柱层析:将上述 S/D 后的溶液用稀释液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸)稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),然后上 Capto-Q 柱,柱子预先用平衡缓冲液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.15M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用

以上平衡缓冲液洗涤柱子,然后用洗脱缓冲液 A (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠,0.3M 氯化钠, 0.02M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,收集洗脱液 A (凝血七因子粗品);再用洗脱缓冲液 B (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠,1.0M 氯化钠, 0.02M 盐酸精氨酸)洗脱,收集洗脱液 B (凝血九因子粗品);得到凝血 FIX 粗品,置于 2-8℃;

6,弱阴离子柱层析纯化凝血 FVII:将上述洗脱液 A 用稀释液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸)稀释到原来的 3 倍,然后上 DEAE-Sepharose FF 柱,柱子预先用平衡缓冲液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液洗涤柱子,然后用洗脱缓冲液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠,0.3M 氯化钠,0.02M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,得到精制的凝血七因子溶液;用 0.45 μ m 滤芯过滤得到澄清滤液,置于 2-8℃;

7,肝素亲和柱层析纯化凝血 FIX:将步骤 5 得到的洗脱液 B 用稀释液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸)稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),上 Heparin Sepharose CL-6B 柱,柱子预先用平衡缓冲液(0.02M 柠檬酸钠,0.15M 氯化钠溶液, PH7.30-7.40)平衡,,后用洗涤缓冲液(0.02M 柠檬酸钠,0.25M 氯化钠溶液, PH7.30-7.40)洗涤,再用洗脱缓冲液(0.02M 柠檬酸钠, 0.04M 盐酸精氨酸, 1.0M 氯化钠溶液, PH7.30-7.40)洗脱,收集洗脱液,用 0.45 μ m 滤芯过滤以上洗脱液得到精制的凝血 FIX 溶液;

8,用 10k 分子量的超滤膜包分别浓缩步骤 6,7 得到的凝血 FVII 及 FIX 滤液,并用透析液(0.02M 柠檬酸钠,0.1M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10)分别透析,后浓缩至所需活力效价后移出超滤膜包,分别得到凝血 FVII 及凝血 FIX 浓缩液 196 克,219 克,活力分别为 41.1IU/ml, 38.2IU/ml;

9~13,同实施例一。

[0020] 实施例三

1,去冷胶血浆的制备:同实施例一;

2,第一次强阴离子交换柱层析:将步骤 1 得到的澄清去冷胶血浆上 Capto-Q 柱,柱子预先用平衡缓冲液 (PH6.50-6.60, 0.02M 柠檬酸钠, 0.15M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液冲洗柱子,然后用洗脱缓冲液 (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠, 0.6M 氯化钠,0.02M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,收集洗脱液(富含凝血 FVII 与 FIX);

3,PEG 沉淀去杂蛋白:以上洗脱液中加入 50%PEG 溶液使最终 PEG 浓度至 4%,搅拌 1 小时,后用 1.0 μ m 串联 0.45 μ m 滤芯过滤,得到澄清的滤液;

4,S/D 病毒灭活:同实施例一;

5,第二次强阴离子柱层析:将上述 S/D 后的溶液用稀释液 (PH6.50-6.60, 0.02M 柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸)稀释到电导率小于 15ms/cm(25℃),然后上 Capto-Q 柱,柱子预先用平衡缓冲液 (PH6.50-6.60, 0.02M 柠檬酸钠, 0.15M 氯化钠,)平衡;上柱结束后,用以上平衡缓冲液洗涤柱子,然后用洗脱缓冲液 A (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠,0.25M 氯化钠, 0.02M 盐酸精氨酸)洗脱柱子,收集洗脱液 A (凝血七因子粗品);再用洗脱缓冲液 B (PH7.30-7.40, 0.02M 柠檬酸钠,0.7M 氯化钠, 0.02M 盐酸精氨酸)洗脱,收集洗脱液 B (凝血 FIX 粗品),置于 2-8℃;

6,弱阴离子柱层析纯化凝血 FVII:将上述洗脱液 A 用稀释液 (PH6.50-6.60, 0.02M 柠

柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸) 稀释到原来的 2 倍, 然后上 DEAE-Sepharose FF 柱, 柱子预先用平衡缓冲液 (PH6.50-6.60, 0.02M 柠檬酸钠, 0.1M 氯化钠,) 平衡; 上柱结束后, 用以上平衡缓冲液洗涤柱子, 然后用洗脱缓冲液 (PH6.50-6.60, 0.02M 柠檬酸钠, 0.25M 氯化钠, 0.02M 盐酸精氨酸) 洗脱柱子, 得到精制的凝血七因子溶液; 用 0.45 μ m 滤芯过滤得到澄清滤液, 置于 2-8 $^{\circ}$ C;

7, 肝素亲和柱层析纯化凝血 FIX: 将步骤 5 得到的洗脱液 B 用稀释液 (PH6.90-7.10, 0.02M 柠檬酸钠, 0.02M 盐酸精氨酸) 稀释到电导率小于 15ms/cm (25 $^{\circ}$ C), 上 Heparin Sepharose 6FF 柱, 柱子预先用平衡缓冲液 (0.02M 柠檬酸钠, 0.15M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10) 平衡, 后用洗涤缓冲液 (0.02M 柠檬酸钠, 0.25M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10) 洗涤, 再用洗脱缓冲液 (0.02M 柠檬酸钠, 0.04M 盐酸精氨酸, 0.6M 氯化钠溶液, PH6.90-7.10) 洗脱, 收集洗脱液, 用 0.45 μ m 滤芯过滤以上洗脱液得到精制的凝血 FIX 溶液;

8, 同实施例一, 最后分别得到凝血 FVII 及凝血 FIX 浓缩液 219 克, 242 克, 活力分别为 37.8IU/ml, 36.7IU/ml;

9~13, 同实施例一。

[0021] 附表 试制品 FVII 及 FIX 收率及比活一览表

	冰冻血浆重量, kg	去冷胶血浆中 FVII/FIX 含量, IU/ml	精制 FVII 原液质量, g	精制 FIX 原液质量, g	FVII/FIX 收率, IU/升血浆	FVII/FIX 比活, IU/mg
试制品 1	20	0.75/0.77	272	283	408/425	1528/156
试制品 2	20	0.77/0.79	368	279	402/418	1598/141
试制品 3	20	0.73/0.75	276	296	413/443	1608/147

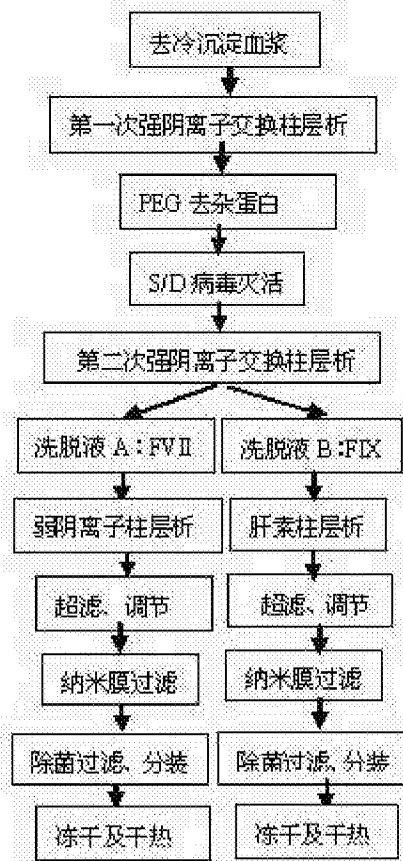


图 1