



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114306578 A

(43) 申请公布日 2022.04.12

(21) 申请号 202011084566.9 *A61K 47/18* (2006.01)

(22) 申请日 2020.10.12 *A61K 47/26* (2006.01)

(71) 申请人 华兰生物工程股份有限公司 *A61P 7/04* (2006.01)

地址 453003 河南省新乡市华兰大道甲1号 *F26B 5/06* (2006.01)

申请人 华兰生物工程重庆有限公司

(72) 发明人 安文琪 王满满 毕利利 王斌  
李学琴 马小伟

(74) 专利代理机构 北京市中联创和知识产权代  
理有限公司 11364

代理人 王铮 康秀敏

(51) Int. Cl.

*A61K 38/36* (2006.01)

*A61K 9/19* (2006.01)

*A61K 47/02* (2006.01)

*A61K 47/10* (2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54) 发明名称

一种含有人凝血因子IX的药物组合物及其  
制备方法

(57) 摘要

本发明提供一种含有人凝血因子IX的药物组合物及其制备方法,所述药物组合物包括活性单位为50~200IU/ml的凝血因子IX、浓度为50~120mM结构保护剂和浓度为30~65mM冻干保护剂,并用缓冲液调节pH为6.5~7.5。本发明的含有人凝血因子IX的药物组合物稳定性提高,冷冻干燥后具有良好的冻干外观,且能保护人凝血因子IX的蛋白活性。复融时间短,有利于作为冻干粉制剂。

1. 一种含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物包括活性单位为50~200IU/ml的人凝血因子IX和浓度为50~120mM结构保护剂,所述结构保护剂选自氯化钠、蔗糖、甘露醇、甘油的至少一种。

2. 根据权利要求1所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述结构保护剂为氯化钠。

3. 根据权利要求1所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包括浓度为30~65mM的冻干保护剂,所述冻干保护剂为氨基酸及其盐类。

4. 根据权利要求3所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述氨基酸及其盐类选自甘氨酸、脯氨酸、组氨酸、精氨酸、盐酸组氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸中的至少一种。

5. 根据权利要求4所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物的结构保护剂为氯化钠,冻干保护剂为盐酸精氨酸和/或盐酸赖氨酸。

6. 根据权利要求1所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物还包括缓冲液,所述缓冲液为乙酸/乙酸盐、琥珀酸/琥珀酸盐、枸橼酸/枸橼酸盐、磷酸/磷酸盐、Tris/盐酸盐中的至少一种,所述缓冲液的加入使所述药物组合物的pH值为6.5~7.5。

7. 根据权利要求6所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述缓冲液为枸橼酸/枸橼酸盐。

8. 根据权利要求7所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,其特征在于,所述枸橼酸/枸橼酸盐缓冲液的加入使所述药物组合物的pH值为 $7.25 \pm 0.05$ 。

9. 一种制备如权利要求1~8任一项所述含有人凝血因子IX的药物组合物的制备方法,其特征在于,方法如下:

S1. 按比例称取处方量的结构保护剂和冻干保护剂;

S2. 在配制容器中加入所述结构保护剂、冻干保护剂和注射用水,搅拌至完全溶解,再加入缓冲液,调节pH至设定值,定容后作为溶液A;

S3. 使用超滤法将纯化后的人凝血因子IX样品超滤换液至溶液A中,并作为溶液B;

S4. 将溶液A和溶液B混合后作为溶液C,所述溶液C经0.22 $\mu$ m滤膜过滤后,通N<sub>2</sub>灌装并分装;

S5. 分装后进行真空冷冻干燥,冻干完成后进行干热病毒灭活,得到高纯人凝血因子IX药物组合物。

10. 根据权利要求9所述的一种人凝血因子IX的药物组合物的制备方法,其特征在于,步骤S5中,所述真空冷冻干燥的条件为:

| 冷冻干燥参数设定    | 制品冻结 |     |     | 一次干燥 |     |     |     | 二次干燥 |     |
|-------------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
| 冷媒设定温度 (°C) | -2   | -40 | -45 | -40  | -30 | -20 | 10  | 34   | 34  |
| 设定时间 (min)  | 1    | 20  | 1   | 10   | 300 | 300 | 360 | 300  | 1   |
| 持续时间 (min)  | 120  | 80  | 300 | 120  | 120 | 900 | 180 | 300  | 480 |
| 真空度 (Pa)    | 无    | 无   | 无   | 30   | 30  | 30  | 30  | 30   | ≤7  |

。

## 一种含有人凝血因子IX的药物组合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及一种含有人凝血因子IX的药物组合物及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 凝血因子是参与血液凝固过程的各种蛋白质组分。其生理作用是,在血管出血时被激活,和血小板粘连在一起并且堵塞血管上的创口。按凝血因子被发现的先后次序用罗马数字编号,有凝血因子I, II, III, IV, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII等。凝血因子是治疗血友病的特效药物,目前凝血因子VII, VIII, IX和凝血酶原复合物(主要还有凝血因子II, VII, IX, X)已经开发成药物,用于甲型或乙型血友病(也称作Christmas病)的治疗。

[0003] 乙型血友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。

[0004] 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IX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。人凝血因子IX(FIX)是由肝细胞合成并分泌到血液中,并在凝血反应中发挥活性。它是相对分子质量约为57000的单链糖蛋白,由415个氨基酸残基组成,含多糖17%左右。含凝血因子IX的药物有血浆提取的人凝血因子IX、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,纯度高的人凝血因子IX是治疗乙型血友病的首选药物。因此从凝血酶原复合物中获得高纯度及高活性的凝血因子IX,具有临床应用价值。

### 发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明旨在提出一种含有人凝血因子IX的药物组合物,能有效保护高纯度的凝血因子IX在冷冻干燥过程中凝血因子蛋白活性,减少凝血因子的活性损失,且具有良好的冻干外观。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0007] 一种含有人凝血因子IX的药物组合物,所述药物组合物包括活性单位为50~200IU/ml的人凝血因子IX和浓度为50~120mM结构保护剂,所述结构保护剂选自氯化钠、蔗糖、甘露醇、甘油的至少一种。

[0008] 进一步的,所述人凝血因子IX的活性单位为80~150IU/ml。

[0009] 进一步的,所述人凝血因子IX的活性单位为100IU/ml。

[0010] 进一步的,所述结构保护剂为氯化钠。

[0011] 进一步的,所述药物组合物还包括浓度为30~65mM的冻干保护剂,所述冻干保护剂为氨基酸及其盐类。

[0012] 进一步的,所述氨基酸及其盐类选自甘氨酸、脯氨酸、组氨酸、精氨酸、盐酸组氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸中的至少一种。

[0013] 进一步的,所述药组组合物的结构保护剂为氯化钠,冻干保护剂为甘氨酸、盐酸赖氨酸、盐酸精氨酸中的至少一种。

[0014] 进一步的,所述药组组合物的结构保护剂为氯化钠,冻干保护剂为盐酸精氨酸和/或盐酸赖氨酸。

[0015] 进一步的,所述药组组合物还包括缓冲液,所述缓冲液为乙酸/乙酸盐、琥珀酸/琥珀酸盐、枸橼酸/枸橼酸盐、磷酸/磷酸盐、Tris/盐酸盐中的至少一种,所述缓冲液的加入使所述药物组合物的pH值为6.5~7.5。

[0016] 进一步的,所述缓冲液为枸橼酸/枸橼酸盐。

[0017] 进一步的,所述枸橼酸/枸橼酸盐缓冲液的加入使所述药物组合物的pH值为7.25±0.05。

[0018] 本发明还提供一种含有人凝血因子IX的药物组合物的制备方法,包括如下步骤:

[0019] S1.按比例称取处方量的结构保护剂和冻干保护剂于配制容器中;

[0020] S2.在配制容器中加入注射用水搅拌至溶解,再加入缓冲液,调节pH至设定值,定容后作为溶液A;

[0021] S3.使用超滤法将纯化后的人凝血因子IX样品超滤换液至溶液A中,作为溶液B;

[0022] S4.将溶液A和溶液B混合后作为溶液C,所述溶液C经0.22μm滤膜过滤后,通N<sub>2</sub>灌装并分装;

[0023] S5.分装后进行真空冷冻干燥,冻干完成后进行干热病毒灭活,得到高纯人凝血因子IX药物组合物。

[0024] 进一步的,步骤S5中,所述真空冷冻干燥的条件为:

| [0025]    | 冷冻干燥参数设定   |    |     | 制品冻结 |     |     | 一次干燥 |     |     | 二次干燥 |  |
|-----------|------------|----|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|--|
|           | 冷媒设定温度(°C) | -2 | -40 | -45  | -40 | -30 | -20  | 10  | 34  | 34   |  |
| 设定时间(min) | 1          | 20 | 1   | 10   | 300 | 300 | 360  | 300 | 1   |      |  |
| 持续时间(min) | 120        | 80 | 300 | 120  | 120 | 900 | 180  | 300 | 480 |      |  |
| 真空度(Pa)   | 无          | 无  | 无   | 30   | 30  | 30  | 30   | 30  | ≤7  |      |  |

[0026] 相对于现有技术,本发明所述的含有人凝血因子IX的药物组合物及其制备方法具有以下优势:

[0027] (1) 本发明所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,加入结构保护剂和冻干保护剂,经过冷冻干燥后,对人凝血因子IX蛋白活性有保护作用,蛋白活性回收率高,稳定性好,大大降低了活性损失,具有广阔的市场应用前景;

[0028] (2) 本发明所述的含有人凝血因子IX的药物组合物,热稳定性好,颗粒尺寸细小且均一;

[0029] (3) 本发明所述的含有人凝血因子IX的药物组合物具有良好的冻干外观,冷冻干

燥后活性回收率高,复融时间短,复融外观也符合要求。

### 具体实施方式

[0030] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。首先应说明的是,下述实验例中的数据是由发明人通过大量实验获得,限于篇幅,在说明书中只展示其中的一部分,且本领域普通技术人员可以在此数据下理解并实施本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些改动或修改同样落于本申请所保护的范围内。

[0031] 实验例1缓冲液对人凝血因子IX的影响

[0032] 在其他参数及工艺条件相同,且取中间值的情况下,采用nanoDSF观察人凝血因子IX在不同缓冲液类型及pH下的表现,检测各样品的热稳定性,实现快速筛选适用缓冲液。具体结果如表1-2所示。

[0033] 采用微流成像颗粒分析系统(MFI)对不同缓冲液中人凝血因子IX样品进行检测,可以对样品的每个颗粒进行分析,检测颗粒的数量、尺寸等。并将各样品于37℃放置一周检测。进一步判断不同缓冲液类型及pH条件对人凝血因子IX的影响。具体结果如表3所示。

[0034] 表1人凝血因子IX在不同缓冲液中的热稳定性

| 序号       | 缓冲液类型                    | 加入缓冲液后<br>样品 pH | Tm onset (°C) | Tm 1 (°C) |
|----------|--------------------------|-----------------|---------------|-----------|
| 1        | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐            | 6.5             | 40.1          | 50.2      |
| 2        | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐            | 7.0             | 39.3          | 48.8      |
| 3        | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐            | 7.5             | 40.0          | 47.6      |
| 4        | 20mM 磷酸/磷酸盐              | 6.5             | 39.3          | 49.3      |
| 5        | 20mM 磷酸/磷酸盐              | 7.0             | 38.1          | 47.2      |
| 6        | 20mM 磷酸/磷酸盐              | 7.5             | 37.3          | 46.2      |
| [0035] 7 | 20mM Tris-HCl            | 6.5             | 35.8          | 50.6      |
| 8        | 20mM Tris-HCl            | 7.0             | 34.3          | 45.0      |
| 9        | 20mM Tris-HCl            | 7.5             | 35.8          | 45.8      |
| 10       | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐和<br>磷酸/磷酸盐 | 6.5             | 39.6          | 48.7      |
| 11       | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐和<br>磷酸/磷酸盐 | 7.0             | 38.6          | 47.2      |
| 12       | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐和<br>磷酸/磷酸盐 | 7.5             | 37.4          | 45.8      |

[0036] 注:“Tm onset”表示蛋白起始变性温度;“Tm 1”表示蛋白去折叠化一半时的温度。

[0037] 表1的DSF检测结果显示,人凝血因子IX在缓冲液为20mM枸橼酸/枸橼酸盐的 $T_m$  onset和 $T_m$  1值均较高, $T_m$  onset值高达39.3-40.1℃, $T_m$  1值高达47.6-50.2℃。根据DSF检测结果可知,人凝血因子IX在枸橼酸/枸橼酸盐缓冲液中相对较稳定。选用枸橼酸/枸橼酸盐作为人凝血因子IX的缓冲液,进一步调节pH值,结果如表2~3所示。

[0038] 表2人凝血因子IX在枸橼酸/枸橼酸盐缓冲液中的热稳定性

| [0039] | 序号 | 缓冲液类型         | 加入缓冲液  | $T_m$ onset (°C) | $T_m$ 1 (°C) |
|--------|----|---------------|--------|------------------|--------------|
|        |    |               | 后样品 pH |                  |              |
|        | 13 | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐 | 6.5    | 40.7             | 50.1         |
|        | 14 | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐 | 6.75   | 41.0             | 49.6         |
| [0040] | 15 | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐 | 7.0    | 40.8             | 48.9         |
|        | 16 | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐 | 7.25   | 40.7             | 48.4         |
|        | 17 | 20mM 枸橼酸/枸橼酸盐 | 7.5    | 40.1             | 48.0         |

[0041] 表3人凝血因子IX在枸橼酸/枸橼酸盐缓冲液中的MFI检测结果

| [0042] | 序号 | 条件    | ECD > 1 $\mu$ m<br>-Avg.ECD | ECD > 10 $\mu$ m<br>-Avg.ECD | ECD > 25 $\mu$ m<br>-Avg.ECD |
|--------|----|-------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
|        | 13 | 0天    | 3879-1.93                   | 280-13.78                    | 8-38.62                      |
|        |    | 25℃一周 | 4100-1.99                   | 495-17.49                    | 12-42.21                     |
|        | 14 | 0天    | 9131-1.92                   | 113-14.33                    | 4-27.12                      |
|        |    | 25℃一周 | 9659-2.04                   | 321-15.42                    | 24-31.44                     |
|        | 15 | 0天    | 5401-1.99                   | 638-15.83                    | 55-33.21                     |
|        |    | 25℃一周 | 5657-2.15                   | 1008-19.00                   | 196-35.72                    |
|        | 16 | 0天    | 6825-1.92                   | 145-15.91                    | 12-29.91                     |
|        |    | 25℃一周 | 6869-1.98                   | 150-15.96                    | 18-36.98                     |
|        | 17 | 0天    | 6450-2.08                   | 123-16.24                    | 14-29.68                     |
|        |    | 25℃一周 | 6524-2.33                   | 351-19.66                    | 33-35.13                     |

[0043] 注:“ECD > 1 $\mu$ m”表示粒径 > 1 $\mu$ m的数量,“Avg.ECD”表示平均粒径,且单位为 $\mu$ m。另外表3中序号13~17的样品同表2中序号13~17的样品。

[0044] 结合表1和2可知,当缓冲液为枸橼酸/枸橼酸盐时,人凝血因子IX的热稳定性差别不大。进一步结合表3MFI检测结果可知,人凝血因子IX在缓冲液为枸橼酸/枸橼酸盐、pH为7.25(允许 $\pm$ 0.05的误差)时,大颗粒量较少。在25℃存放一周后,粒径变化也较少,制备的药物稳定性好,不易受外界的影响。因此,可以采用枸橼酸/枸橼酸盐作为缓冲液,并调节pH

至7.25。

[0045] 实验例2不同结构保护剂和冻干保护剂对人凝血因子IX的影响

[0046] 在实验例1的基础上,选择缓冲液为枸橼酸/枸橼酸盐,并调节pH为7.25。其他参数及工艺条件相同,且取中间值的情况下,采用nanoDSF检测在人凝血因子IX中加入不同结构保护剂和/或冻干保护剂时,各样品的热稳定性,具体结果如表4所示。

[0047] 表4不同保护剂对人凝血因子IX的影响

[0048]

| 序号  | 甘油 | 甘露醇 | 蔗糖  | 氯化钠 | L-组氨酸 | 脯氨酸 | 甘氨酸 | 盐酸精氨酸 | 盐酸赖氨酸 | Tm onset | Tm1  |
|-----|----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-------|----------|------|
| 单位  | mM | mM  | mM  | mM  | mM    | mM  | mM  | mM    | mM    | °C       | °C   |
| 对照组 | 0  | 0   | 0   | 0   | 0     | 0   | 0   | 0     | 0     | 39.8     | 47.9 |
| F1  | 0  | 50  | 0   | 50  | 30    | 0   | 0   | 0     | 0     | 43.5     | 55.6 |
| F2  | 0  | 0   | 50  | 50  | 30    | 0   | 0   | 0     | 0     | 43.6     | 55.6 |
| F3  | 0  | 0   | 0   | 80  | 30    | 0   | 0   | 0     | 0     | 45.2     | 55.9 |
| F4  | 0  | 0   | 0   | 80  | 0     | 0   | 0   | 0     | 0     | 45.6     | 56.0 |
| F5  | 50 | 0   | 0   | 80  | 0     | 0   | 0   | 0     | 0     | 44.8     | 55.8 |
| F6  | 0  | 100 | 0   | 0   | 0     | 50  | 0   | 0     | 0     | 40.9     | 49.3 |
| F7  | 0  | 0   | 100 | 0   | 0     | 50  | 0   | 0     | 0     | 41.1     | 49.4 |
| F8  | 0  | 0   | 0   | 80  | 0     | 50  | 0   | 0     | 0     | 45.2     | 55.9 |
| F9  | 0  | 0   | 0   | 80  | 0     | 0   | 50  | 0     | 0     | 44.9     | 56.1 |
| F10 | 0  | 0   | 0   | 80  | 0     | 0   | 0   | 50    | 0     | 49.3     | 57.1 |
| F11 | 0  | 0   | 0   | 80  | 0     | 0   | 0   | 0     | 50    | 48.3     | 56.7 |
| F12 | 0  | 0   | 0   | 0   | 0     | 0   | 50  | 50    | 0     | 44.2     | 55.6 |
| F13 | 0  | 0   | 0   | 0   | 0     | 0   | 50  | 0     | 50    | 44.6     | 55.3 |
| F14 | 0  | 0   | 0   | 0   | 0     | 0   | 30  | 30    | 30    | 45.1     | 55.4 |

[0049] 由表4可知,对照组不加入任何保护剂,人凝血因子IX样品的Tm onset为39.8°C, Tm1为47.9°C。实验组F1~F14样品加入结构保护剂(氯化钠、蔗糖、甘露醇或甘油中的至少一种)和/或冻干保护剂(L-组氨酸、脯氨酸、甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸中的至少一种),Tm onset和Tm1均有所提高,说明加入所述结构保护剂和/或冻干保护剂后,人凝血因子IX稳定性比对照组好。

[0050] 对比实验组F1(加入甘露醇、氯化钠、L-组氨酸)、F2(加入蔗糖、氯化钠、L-组氨酸)和F3(加入氯化钠、L-组氨酸)样品发现,F1、F2的Tm onset和Tm1值与F3组差别不大,可见在氯化钠存在的情况下,甘露醇或蔗糖的添加对样品稳定性的影响没有进一步的促进作用。蔗糖、甘油和甘露醇的羟基可能与蛋白形成氢键,增加蛋白稳定性,从各实验组和对对照组就可以说明加入蔗糖、甘油和甘露醇作为结构保护剂,能提高人凝血因子IX样品的稳定性。但是在实验的过程中意外的发现,加入氯化钠却能比含有羟基的蔗糖、甘油和甘露醇,更有助于提高样品稳定性。

[0051] 对比实验组F3(加入氯化钠、L-组氨酸)、F4(加入氯化钠)和F5(加入氯化钠、甘油)



样品发现,在氯化钠存在的情况下,甘油、L-组氨酸的添加对样品稳定性的影响也没有促进作用。

[0052] 对比实验组F8 (加入氯化钠、脯氨酸) 和F4 (加入氯化钠) 样品,发现在氯化钠存在的情况下,脯氨酸的添加对样品稳定性基本无影响。

[0053] 对比实验组F9 (加入氯化钠、甘氨酸)、F10 (加入氯化钠、盐酸精氨酸)、F11 (加入氯化钠、盐酸赖氨酸) 和F4 (加入氯化钠) 样品,  $T_m$  值均比对照组高。与F4样品仅添加氯化钠相比,F9、F10和F11这三组稳定性更好,可知甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸的加入对样品稳定性提高有增强作用,并且这4组均含有氯化钠。而实验组F6样品 (加入甘露醇、脯氨酸)、F7样品 (加入蔗糖、脯氨酸),和对照组样品相比,  $T_m$  值有所提高,但是低于F4样品 (加入氯化钠),再次确认氯化钠的添加能提高其稳定性。

[0054] 对比实验组F12 (加入甘氨酸、盐酸精氨酸)、F13 (加入甘氨酸、盐酸赖氨酸)、F14 (加入甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸) 样品,仅添加氨基酸类,发现其  $T_m$  值高于无任何添加的对照组,却低于仅添加氯化钠的组别。可知氨基酸类的加入需与氯化钠同时添加效果明显。

[0055] 因此,在氯化钠作为结构保护剂存在的情况下,同时加入冻干保护剂:甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸中的至少一种,对样品稳定性提高的效果最好。

[0056] 实验例3冻干工艺曲线

[0057] 在实验例1~2的基础上,选用枸橼酸/枸橼酸盐为缓冲液,并调节人凝血因子IX样品的pH为7.25,进一步优化冻干工艺参数,如表5所示。

[0058] 表5冻干工艺参数

| [0059] | 冷冻干燥参数设定    | 制品冻结 |     |     | 一次干燥 |     |     |     | 二次干燥 |     |
|--------|-------------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|------|-----|
|        | 冷媒设定温度 (°C) | -2   | -40 | -45 | -40  | -30 | -20 | 10  | 34   | 34  |
|        | 设定时间 (min)  | 1    | 20  | 1   | 10   | 300 | 300 | 360 | 300  | 1   |
|        | 持续时间 (min)  | 120  | 80  | 300 | 120  | 120 | 900 | 180 | 300  | 480 |
|        | 真空度 (Pa)    | 无    | 无   | 无   | 30   | 30  | 30  | 30  | 30   | ≤7  |

[0060] 通过优化冻干工艺参数,使制备的人凝血因子IX具有合格的理化性质和生物学活性,使复融外观良好,且活性回收率高。冻干完成后,在100°C沸水中保温30min进行干热病毒灭活,得到高纯人凝血因子IX的药剂组合物。所述药物组合物在冻干后外观较好,成白色块状,干热后块状松散,符合药典要求。

[0061] 实验例4不同结构保护剂和冻干保护剂对冷冻干燥后人凝血因子IX的影响

[0062] 在实验例1~3的基础上,按照表6称取各组分,并检测样品干热灭活后的生物活性,通过干热活性回收率来检测不同结构保护剂和冻干保护剂对冷冻干燥后人凝血因子IX的活性回收率的影响。

[0063] 表6冷冻干燥后人凝血因子IX的活性回收率

| 序号        | 氯化钠<br>(mM) | 甘氨酸<br>(mM) | 盐酸精氨酸<br>(mM) | 盐酸赖氨酸<br>(mM) | 干热活性回<br>收率 (%) |
|-----------|-------------|-------------|---------------|---------------|-----------------|
| [0064] 18 | 65          | 25          | 25            | 25            | 102.45          |
| 19        | 80          | 0           | 50            | 0             | 95.97           |
| 20        | 80          | 50          | 0             | 0             | 91.62           |
| 21        | 50          | 50          | 0             | 50            | 95.81           |
| 22        | 80          | 0           | 0             | 50            | 96.35           |
| [0065] 23 | 50          | 0           | 50            | 50            | 106.34          |
| 24        | 50          | 50          | 50            | 0             | 94.19           |
| 25        | 50          | 0           | 0             | 0             | 105.49          |
| 26        | 80          | 50          | 50            | 50            | 100.15          |

[0066] 表7冷冻干燥后人凝血因子IX的热稳定性

| 序号        | Tmonset (°C) | Tm1 (°C) |
|-----------|--------------|----------|
| [0067] 18 | 49.3         | 57.1     |
| 19        | 49.5         | 57.0     |
| 20        | 46.5         | 57.0     |
| 21        | 48.2         | 57.2     |
| 22        | 49.2         | 57.0     |
| 23        | 49.3         | 57.0     |
| 24        | 48.0         | 57.1     |
| 25        | 43.0         | 56.5     |
| 26        | 49.7         | 57.1     |

[0068] 表8冷冻干燥后人凝血因子IX的外观

| 序号        | 冻干后外观       | 复融时间                  | 复融外观      |
|-----------|-------------|-----------------------|-----------|
| [0069] 18 | 融化, 不合格     | 10min 速<br>融, 无区<br>别 | 澄清, 微乳光   |
| 19        | 块状完整        |                       | 澄清透明, 微乳光 |
| 20        | 部分塌陷, 块状有缺陷 |                       | 乳光        |
| 21        | 融化, 不合格     |                       | 澄清透明      |
| 22        | 块状完整        |                       | 澄清透明, 微乳光 |
| 23        | 融化, 不合格     |                       | 澄清透明      |
| 24        | 融化, 不合格     |                       | 澄清, 微乳光   |
| 25        | 块状完整, 有部分塌陷 |                       | 乳光        |

|        |    |         |      |
|--------|----|---------|------|
| [0070] | 26 | 融化, 不合格 | 澄清透明 |
|--------|----|---------|------|

[0071] 由表6可知,当加入氯化钠作为结构保护剂,氨基酸及其盐类作为冻干保护剂时,经过冷冻干燥后人凝血因子IX的活性回收率高达91.62%~106.34%。实验组23(加入氯化钠、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸)样品活性回收率最高为106.34%。实验组20(只加入氯化钠、甘氨酸)样品活性回收率最低为91.62%。由表7DSF检测结果可知,实验组18(加入氯化钠、甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸组)样品,实验组19(加入氯化钠、盐酸精氨酸)样品,实验组22(加入氯化钠、盐酸赖氨酸组)样品、实验组23(加入氯化钠、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸组)样品以及实验组26(加入氯化钠、甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸),热稳定性均相对较好, $T_m$  onset和 $T_m$  1均较高。

[0072] 表8外观检测结果显示,实验组19(加入氯化钠、盐酸精氨酸)、实验组22(加入氯化钠、盐酸精氨酸)样品,在冷冻干燥后外观最好,并具有较好的复融外观。其次是实验组25(加入氯化钠组)。而实验组18(加入氯化钠、甘氨酸、盐酸精氨酸、盐酸赖氨酸组)样品在冷冻干燥过程中出现严重的起泡融化现象。对比其他实验组可以发现,整体结果呈现出较好外观的实验组,添加结构保护剂和冻干保护剂的种类较少,而外观差的组别添加保护剂的种类多,推测可能是添加的种类越多,会打破原组分间的平衡。实验组18~26的样品在10min内都可以速融,符合要求。

[0073] 结合表6~8的实验结果可知,结构保护剂选用氯化钠,冻干保护剂选用盐酸精氨酸和/或盐酸赖氨酸,人凝血因子IX的干热活性回收率、热稳定性和冷冻干燥后的外观都最好。

[0074] 实施例1~5人凝血因子IX药组组合物的制备

[0075] 实施例1

[0076] 人凝血因子IX药组组合物的制备方法:

|        |    |       |
|--------|----|-------|
| [0077] | 组份 | 各组分含量 |
|--------|----|-------|

|        |       |      |
|--------|-------|------|
| [0078] | 氯化钠   | 50mM |
|        | 盐酸精氨酸 | 30mM |

[0079] (1) 按上表比例称取处方量的氯化钠、盐酸精氨酸;

[0080] (2) 在配置容器中加入步骤(1)中的原料,加入注射用水,搅拌溶解后加入pH调节剂——枸橼酸、枸橼酸钠并调pH至7.25,加入注射用水定容后,作为溶液A;

[0081] (3) 使用超滤法将纯化后的人凝血因子IX样品超滤换液至溶液A中,并作为溶液B,使用膜包超滤换液法较透析法速率快,使用溶液少,换液彻底。具体的超滤法的操作过程为:使用的膜包规格为0.1 $\mu$ m<sup>2</sup>、10KD,流速为50rpm(使用泵为WATSON MARLOW的520S),进口压力 $\leq$ 1bar。通过检测超滤换液时透过液的pH和电导率确认换液是否完成。透过液pH为溶液A的pH $\pm$ 0.05,透过液电导率为溶液A电导率 $\pm$ 0.2mS/cm,同时达到这两个条件即为换液完成。超滤换液时使用溶液A的量一般为 $\geq$ 6倍\*纯化转交样品量;

[0082] (4) 按配方计算量将溶液A、B混合,混合后作为溶液C,所述溶液C中人凝血因子IX

为50IU/ml。经0.22μm滤膜过滤后,通N<sub>2</sub>灌装、分装;

[0083] (5) 将分装后的样品按照表5的工艺进行真空冷冻干燥和干热灭菌即得人凝血因子IX药组组合物。所述人凝血因子IX药组组合物为冻干制剂,通过静脉注射形式给药。

[0084] 实施例2

[0085] 按下表的比例制备人凝血因子IX的药组组合物,具体制备方法同实施例1。

| 组份    | 各组分含量 |
|-------|-------|
| 氯化钠   | 100mM |
| 盐酸精氨酸 | 65mM  |

[0087] 实施例3

[0088] 按下表的比例制备人凝血因子IX的药组组合物,具体制备方法同实施例1。

| 组份    | 各组分含量 |
|-------|-------|
| 氯化钠   | 70mM  |
| 盐酸赖氨酸 | 40mM  |

[0090] 实施例4

[0091] 按下表的比例制备人凝血因子IX的药组组合物,具体制备方法同实施例1。

| 组份    | 各组分含量 |
|-------|-------|
| 氯化钠   | 120mM |
| 盐酸精氨酸 | 30mM  |
| 盐酸赖氨酸 | 30mM  |

[0093] 实施例5

[0094] 按下表的比例制备人凝血因子IX的药组组合物,具体制备方法同实施例1。

| 组份    | 各组分含量 |
|-------|-------|
| 氯化钠   | 80mM  |
| 盐酸精氨酸 | 50mM  |

[0096] 对比例1

[0097] 对比例1中人凝血因子IX的药组组合物的制备方法同实施例1,不同之处在于冷冻干燥的时候只采用一次干燥。

[0098] 对比例2

[0099] 对比例2中人凝血因子IX的药组组合物的制备方法同实施例1,不同之处在于冷冻干燥中的工艺参数如表9所示,即制品在冻结过程中时,由-2℃直接降温冷冻至-45℃。

[0100] 表9

| 冷冻干燥参数设定 | 制品冻结 | 一次干燥 | 二次干燥 |
|----------|------|------|------|
|          |      |      |      |

|        |             |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| [0102] | 冷媒设定温度 (°C) | -2  | -40 | -40 | -30 | -20 | 10  | 34  | 34  |
|        | 设定时间 (min)  | 1   | 20  | 10  | 300 | 300 | 360 | 300 | 1   |
|        | 持续时间 (min)  | 120 | 380 | 120 | 120 | 900 | 180 | 300 | 480 |
|        | 真空度 (Pa)    | 无   | 无   | 30  | 30  | 30  | 30  | 30  | ≤7  |

[0103] 对比例3

[0104] 按照CN108048433A中实施例1中的透析液：柠檬酸钠为0.012mol/L、氯化钠0.1mol/L、pH为6.8，甘氨酸为18g/L对人凝血因子IX进行超滤并透析，得灭活液，在灭活液中添加蔗糖+甘氨酸混合溶液使蛋白最终浓度为1.5%，加入S/D灭活剂，100°C下恒温30min，降温即得。

[0105] 将实施例1~5和对比例1~3的人凝血因子IX的药组组合物在25±2°C条件下放置12个月进行加速实验，采用nanoDSF检测稳定性，并检测人凝血因子IX的活性单位，结果如表10所示。

[0106] 表10

| 组别   | 0天            |           |              | 加速12个月        |           |              |
|------|---------------|-----------|--------------|---------------|-----------|--------------|
|      | Tm onset (°C) | Tm 1 (°C) | 活性单位 (IU/ml) | Tm onset (°C) | Tm 1 (°C) | 活性单位 (IU/ml) |
| 实施例1 | 49.5          | 58.0      | 50           | 49.0          | 57.6      | 50           |
| 实施例2 | 49.8          | 57.9      | 150          | 49.2          | 57.4      | 148          |
| 实施例3 | 49.3          | 57.3      | 80           | 49.0          | 56.5      | 75           |
| 实施例4 | 49.6          | 57.0      | 100          | 49.2          | 56.5      | 97           |
| 实施例5 | 50.2          | 58.1      | 200          | 49.9          | 57.7      | 198          |
| 对比例1 | 39.5          | 46.8      | 48           | 33.0          | 42.2      | 42           |
| 对比例2 | 40.6          | 45.8      | 35           | 32.6          | 38.1      | 30           |
| 对比例3 | 46.5          | 55.1      | 39           | 42.3          | 50.4      | 31           |

[0108] 将实施例1~5和对比例1~3的人凝血因子IX的药组组合物，用灭菌注射用水复融，观察复融时间、外观和人凝血因子IX的回收率，具体结果如表11所示。

[0109] 表11复融效果实验

| 实验组  | 复融时间 (min) | 复融后外观 | 人凝血因子IX回收率 |
|------|------------|-------|------------|
| 实施例1 | <4min      | 符合规定  | 99.41%     |
| 实施例2 | <4min      | 符合规定  | 99.55%     |
| 实施例3 | <4min      | 符合规定  | 99.63%     |

|      |       |        |        |
|------|-------|--------|--------|
| 实施例4 | <4min | 符合规定   | 99.50% |
| 实施例5 | <4min | 符合规定   | 99.82% |
| 对比例1 | 17min | 有细小絮状物 | 80.56% |
| 对比例2 | 11min | 符合规定   | 81.62% |
| 对比例3 | 9min  | 符合规定   | 85.00% |

[0111] 由表10可知,本申请实施例1~5的人凝血因子IX的药组组合物T<sub>m</sub>值高于对比例1~3,热稳定好。且从外观上颗粒更细小均一,更适于作为冻干粉制剂。实施例1~5的蛋白浓度高达50~200IU/ml,高于对比例1~32。在25±2℃的环境下加速12个月后,实施例1~5的T<sub>m</sub>值和活性单位改变较小,而对比例1~3样品的T<sub>m</sub>值和活性单位改变较多,稳定性较差。说明本申请实施例1~5的药组组合物更适合作为药组制剂。

[0112] 由表11可知,本申请实施例1~5的人凝血因子IX的药组组合物,复融时间低于4min,复融后的外观也符合规定,且回收率高达99.41~99.82%。对比例1的复融时间过长,不适宜作为药物制剂。对比例2的复融时间为11min,对比例3复融时间为9min,复融后外观也符合规定,但二者回收率仅为81.62%和85.00%,低于实施例1~5。

[0113] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。