



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103087184 B

(45) 授权公告日 2014. 04. 02

(21) 申请号 201310012434. 9

(22) 申请日 2013. 01. 14

(73) 专利权人 山西康宝生物制品股份有限公司
地址 046011 山西省长治市太行北路 69 号

(72) 发明人 周满祥 杨向有 申云飞 张慧兰

(74) 专利代理机构 太原华弈知识产权代理事务所 14108

代理人 李毅

(51) Int. Cl.

C07K 14/765 (2006. 01)

C07K 1/22 (2006. 01)

审查员 王岩

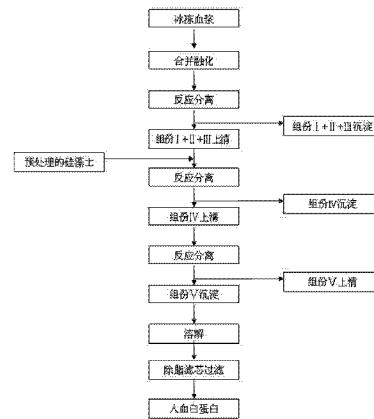
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法

(57) 摘要

本发明涉及人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法,包括在低温乙醇法分离制备人血白蛋白的过程中增加:1) 在从组分 I + II + III 上清液中分离组分 IV 的步骤中加入经枸橼酸钠预处理的活化硅藻土,对凝血因子 XII 进行吸附,以降低凝血因子 XII 含量;2) 将超滤透析纯化后的组分 V 通过带正电荷的除脂滤芯,吸附除去残留在人血白蛋白溶液中的活化因子 XII α 片段;通过以上两步工艺降低人血白蛋白制品中的激肽释放酶原激活剂含量,同时对蛋白分子活性、各项理化指标及蛋白收率均无影响,为患者安全用药提供了可靠保证。



1. 人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法,包括在低温乙醇法分离制备人血白蛋白的工艺中,其特征是在低温乙醇法分离制备人血白蛋白的过程中增加下述两步工艺:

1)、在从组分 I + II + III 上清液中分离组分 IV 的步骤中加入经枸橼酸钠预处理的活化硅藻土,对凝血因子 XII 进行吸附,以降低凝血因子 XII 含量;

其中,所述的经枸橼酸钠预处理的活化硅藻土采用以下步骤制备:

a)、将硅藻土加入 2g/L 的枸橼酸钠水溶液中,搅拌 5 ~ 10 分钟,混悬,静置 3 ~ 5 分钟,去除悬浮物和上清;

b)、用不加枸橼酸钠的水重复上述操作,反复抽干,至洗液 pH 值呈中性;

c)、再加入体积百分浓度 0.025% 的冰醋酸水溶液,搅拌 5 ~ 10 分钟,混悬,静置 3 ~ 5 分钟,抽干得固体;

d)、用水反复洗涤固体,至洗液 pH 值呈中性,抽干得到活化硅藻土,冷藏保存;

以上使用的水均为 20 ~ 30°C 的注射用水;

2)、将超滤透析纯化后的组分 V 通过带正电荷的除脂滤芯,吸附除去残留在人血白蛋白溶液中的活化因子 XII a 片段;

通过以上两步工艺,降低人血白蛋白制品中的激肽释放酶原激活剂含量。

2. 根据权利要求 1 所述的人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法,其特征是所述从组分 I + II + III 上清液中分离组分 IV 的分离条件为:pH 值 5.91 ~ 5.94,蛋白质质量浓度 1.0 ~ 1.5%,离子强度 0.1,温度 -4 ~ -5°C,乙醇体积浓度 40 ~ 42%,加入活化硅藻土使其在上清液中的浓度为 5 ~ 8g/L,以 60 ~ 120 转 / 分的速度搅拌 30 ~ 60 分钟。

3. 根据权利要求 1 所述的人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法,其特征是将所述带正电荷的除脂滤芯先以注射用水预洗 15 分钟,再用体积浓度 12% 的乙醇溶液冲洗,吹干后使用。

4. 根据权利要求 1 所述的人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法,其特征是将纯化后的组分 V 以 0 ~ 2.0bar 的压力通过所述带正电荷的除脂滤芯。

人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人血白蛋白制品的制备方法,具体是涉及一种人血白蛋白生产过程中激肽释放酶原激活剂(PKA)含量的控制方法。

背景技术

[0002] 人血白蛋白是以经乙型肝炎疫苗免疫的健康人血浆为原料,经低温乙醇法分离而成。健康人血浆是一种极为复杂的蛋白混合物,其中,血浆中的凝血因子XII是以无活性的酶原形式存在的,血管内皮细胞受损时,露出的带负电荷的胶原纤维可以激活凝血因子XII变成活化因子XII α ,活化因子XII α 能激活激肽释放酶原(PK)生成激肽释放酶(K_K), K_K 使激肽原释放出缓激肽,这些活化的因子片段被称为激肽释放酶原激活剂(PKA)。人血白蛋白制品的反复融化和冰冻会导致制品中蛋白组份变性,可使PKA升高。

[0003] 当含有PKA较多的人血白蛋白制品用于人体静脉快速输注时,PKA可以激活人体内的前激肽释放酶,生成激肽释放酶,导致激肽产生,引起毛细血管通透性增加、血管舒张、血压下降、面色潮红、头疼、心悸、呼吸困难等不良反应。因此,检测血液制品中的PKA含量,并规定其限量是很有必要的。《中国药典》中规定了人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂(PKA)的含量应不高于35IU/ml。

[0004] 现通行的血浆低温乙醇法分离工艺为:1)、原料血浆合并融化;2)、调整蛋白浓度 $4.0\pm 0.5\%$ 、乙醇含量 $20\pm 1\%$ 、pH值 6.80 ± 0.10 、温度 $-4.5\pm 0.5^\circ\text{C}$,搅拌,压滤分离,收集组分I+II+III沉淀;3)、分离沉淀后的组分I+II+III上清液调整蛋白浓度 $1.25\sim 1.50\%$ 、乙醇含量 $40\pm 1\%$ 、pH值 5.85 ± 0.05 、温度 $-4.5\pm 0.5^\circ\text{C}$;搅拌,压滤分离,收集组分IV沉淀;4)、分离沉淀后的组分IV上清液调整蛋白浓度 $1.0\sim 1.2\%$ 、乙醇含量 $40\pm 1\%$ 、pH值 4.80 ± 0.10 、温度 $-8.0\pm 0.5^\circ\text{C}$;搅拌,压滤分离,收集组分V沉淀;5)、将组分V沉淀以 $6\sim 8$ 倍沉淀体积的 $2\sim 4^\circ\text{C}$ 10%乙醇溶液搅拌溶解,过滤,滤液应澄清,无纤维等异物;6)、透析脱醇、浓缩、配液, $60\pm 0.5^\circ\text{C}$ 、10小时病毒灭活处理。

[0005] 现有的血浆低温乙醇分离方法因原料血浆保存不当等其他原因,容易出现人血白蛋白制品中PKA过高的现象,常规的方法是将制品反复加热,对PKA进行灭活。然而,反复的加热过程对人血白蛋白制品造成了潜在的威胁。

发明内容

[0006] 本发明的目的是针对目前人血白蛋白制品分离过程中容易出现激肽释放酶原激活剂过高的问题,提供一种人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法。

[0007] 本发明人血白蛋白制品中激肽释放酶原激活剂的控制方法包括在低温乙醇法分离制备人血白蛋白的工艺中,所述人血白蛋白低温乙醇法分离制备工艺为常规工艺,本发明是在低温乙醇法分离制备人血白蛋白的过程中增加下述两步工艺:

[0008] 1)、利用活化硅藻土对凝血因子XII的吸附作用,在从组分I+II+III上清液中分离组分IV的步骤中加入经枸橼酸钠预处理的活化硅藻土,对凝血因子XII进行吸附,以降低凝

血因子XII含量；

[0009] 2)、将超滤透析纯化后的组分V通过带正电荷的除脂滤芯，静电吸附除去残留在人血白蛋白溶液中的活化因子XII α 片段；

[0010] 通过以上两步工艺，降低人血白蛋白制品中的激肽释放酶原激活剂含量。

[0011] 其中，所述经枸橼酸钠预处理的活化硅藻土采用以下步骤制备：

[0012] 1)、将硅藻土加入 2g/L 的枸橼酸钠水溶液中，搅拌 5 ~ 10 分钟，混悬，静置 3 ~ 5 分钟，去除悬浮物和上清；

[0013] 2)、用不加枸橼酸钠的水重复上述操作，反复抽干，至洗液 pH 值呈中性；

[0014] 3)、再加入体积百分浓度 0.025% 的冰醋酸水溶液，搅拌 5 ~ 10 分钟，混悬，静置 3 ~ 5 分钟，抽干得固体；

[0015] 4)、用水反复洗涤固体，至洗液 pH 值呈中性，抽干得到活化硅藻土，冷藏保存。

[0016] 以上使用的水均为 20 ~ 30℃ 的注射用水。

[0017] 进而，本发明从组分 I + II + III 上清液中分离组分 IV 的具体分离条件为：调整上清液的 pH 值 5.91 ~ 5.94，蛋白质量浓度 1.0 ~ 1.5%，离子强度 0.1，温度 -4 ~ -5℃，乙醇体积浓度 40 ~ 42%，加入活化硅藻土，使其在上清液中的浓度为 5 ~ 8g/L，以 60 ~ 120 转/分的速度搅拌 30 ~ 60 分钟。

[0018] 本发明将上述上清液以滤板压滤分别得到组分 IV 沉淀和组分 IV 上清液。其中，压滤采用 pa11 公司的 50P 滤板，所需滤板面积为 5 ~ 8 平方米/吨血浆，过滤压力控制在 0 ~ 3.0bar。

[0019] 具体地，本发明纯化后的组分 V 是以 0 ~ 2.0bar 的压力通过所述带正电荷的除脂滤芯。所述带正电荷的除脂滤芯先以注射用水预洗 15 分钟，再用体积浓度 12% 的乙醇溶液冲洗，吹干后使用。

[0020] 本发明控制方法中，所使用的硅藻土助滤剂通过预处理去除了其中的微小颗粒，去除了热原，并对硅藻土进行了活化，不会对人血白蛋白制品造成不利影响。

[0021] 本发明的控制方法对蛋白分子活性、各项理化指标及蛋白收率均无影响，通过本发明方法进行控制后的人血白蛋白制品中，PKA 含量得以大大降低，为患者安全用药提供了可靠保证。

附图说明

[0022] 图 1 是采用本发明控制方法的低温乙醇法分离制备人血白蛋白工艺流程图。

具体实施方式

[0023] 实施例 1

[0024] 1、硅藻土活化预处理

[0025] 取 100g 枸橼酸钠溶解在 50L 20 ~ 30℃ 注射用水中，加入 5kg 硅藻土，搅拌 5 分钟，混悬，静置 5 分钟，去除悬浮物和上清；

[0026] 以不加枸橼酸钠的注射用水重复上述操作，反复抽干，至洗液 pH 值呈中性；

[0027] 将 25mL 冰醋酸溶解在 10L 20 ~ 30℃ 注射用水中，加入上述抽干固体，搅拌 5 分钟，混悬，静置 3 分钟，抽干得固体；

[0028] 用注射用水反复洗涤固体,至洗液 pH 值呈中性,抽干,得到活化硅藻土,置于冷操作间待用。

[0029] 2、凝血因子XII吸附

[0030] 取低温乙醇法分离制备人血白蛋白过程中得到的组分 I + II + III 上清液 100L, 该上清液已经被调节至 pH 值 5.91, 蛋白浓度 1.2%, 离子强度为 0.1, 温度 -4.4℃, 乙醇浓度 40.2%。向上清液中加入上述预处理的活化硅藻土 0.5kg, 以 60 转 / 分的速度搅拌 30 分钟后, 上滤板压滤, 分别得到组分 IV 沉淀和组分 IV 上清液。压滤过程采用 pa11 公司的 50P 滤板, 所需滤板面积为 5 ~ 8 平方米 / 吨血浆, 过滤压力控制在 0 ~ 3.0bar。

[0031] 3、PKA 静电吸附

[0032] 在过滤器中安装带正电荷的 ZETAPLUS 除脂滤芯, 用冷注射用水预洗过滤器 15 分钟, 再用 12% 的乙醇溶液 (pH 值 4.56) 约 50L 冲洗过滤器, 吹干。

[0033] 取低温乙醇法分离制备人血白蛋白过程中纯化后的组分 V, 以 0 ~ 2.0bar 的压力通过上述过滤器进行过滤。

[0034] 实施例 2

[0035] 1、硅藻土活化预处理

[0036] 取 100g 枸橼酸钠溶解在 50L 20 ~ 30℃ 注射用水中, 加入 5kg 硅藻土, 搅拌 8 分钟, 混悬, 静置 4 分钟, 去除悬浮物和上清;

[0037] 以不加枸橼酸钠的注射用水重复上述操作, 反复抽干, 至洗液 pH 值呈中性;

[0038] 将 25mL 冰醋酸溶解在 10L 20 ~ 30℃ 注射用水中, 加入上述抽干固体, 搅拌 8 分钟, 混悬, 静置 4 分钟, 抽干得固体;

[0039] 用注射用水反复洗涤固体, 至洗液 pH 值呈中性, 抽干, 得到活化硅藻土, 置于冷操作间待用。

[0040] 2、凝血因子XII吸附

[0041] 取低温乙醇法分离制备人血白蛋白过程中得到的组分 I + II + III 上清液 100L, 该上清液已经被调节至 pH 值 5.93, 蛋白浓度 1.4%, 离子强度为 0.1, 温度 -4.3℃, 乙醇浓度 40.8%。向上清液中加入上述预处理的活化硅藻土 0.7kg, 以 90 转 / 分的速度搅拌 45 分钟后, 上滤板压滤, 分别得到组分 IV 沉淀和组分 IV 上清液。压滤过程采用 pa11 公司的 50P 滤板, 所需滤板面积为 5 ~ 8 平方米 / 吨血浆, 过滤压力控制在 0 ~ 3.0bar。

[0042] 3、PKA 静电吸附

[0043] 在过滤器中安装带正电荷的 ZETAPLUS 除脂滤芯, 用冷注射用水预洗过滤器 15 分钟, 再用 12% 的乙醇溶液 (pH 值 4.62) 约 50L 冲洗过滤器, 吹干。

[0044] 取低温乙醇法分离制备人血白蛋白过程中纯化后的组分 V, 以 0 ~ 2.0bar 的压力通过上述过滤器进行过滤。

[0045] 实施例 3

[0046] 1、硅藻土活化预处理

[0047] 取 100g 枸橼酸钠溶解在 50L 20 ~ 30℃ 注射用水中, 加入 5kg 硅藻土, 搅拌 10 分钟, 混悬, 静置 5 分钟, 去除悬浮物和上清;

[0048] 以不加枸橼酸钠的注射用水重复上述操作, 反复抽干, 至洗液 pH 值呈中性;

[0049] 将 25mL 冰醋酸溶解在 10L 20 ~ 30℃ 注射用水中, 加入上述抽干固体, 搅拌 10 分

钟,混悬,静置 5 分钟,抽干得固体;

[0050] 用注射用水反复洗涤固体,至洗液 pH 值呈中性,抽干,得到活化硅藻土,置于冷操作间待用。

[0051] 2、凝血因子XII吸附

[0052] 取低温乙醇法分离制备人血白蛋白过程中得到的组分 I + II + III 上清液 100L,该上清液已经被调节至 pH 值 5.94,蛋白浓度 1.4%,离子强度为 0.1,温度 -4.9℃,乙醇浓度 42.0%。向上清液中加入上述预处理的活化硅藻土 0.8kg,以 90 转 / 分的速度搅拌 60 分钟后,上滤板压滤,分别得到组分 IV 沉淀和组分 IV 上清液。压滤过程采用 pall 公司的 50P 滤板,所需滤板面积为 5 ~ 8 平方米 / 吨血浆,过滤压力控制在 0 ~ 3.0bar。

[0053] 3、PKA 静电吸附

[0054] 在过滤器中安装带正电荷的 ZETAPLUS 除脂滤芯,用冷注射用水预洗过滤器 15 分钟,再用 12% 的乙醇溶液(pH 值 4.69)约 50L 冲洗过滤器,吹干。

[0055] 取低温乙醇法分离制备人血白蛋白过程中纯化后的组分 V,以 0 ~ 2.0bar 的压力通过上述过滤器进行过滤。

[0056] 在低温乙醇法分离人血白蛋白过程中采用本发明工艺。上述实施例各进行 10 批试验,实施前后产品 PKA 检测结果比较见表 1。

[0057]

表 1 实施前后产品 PKA 检测结果

批次	实施前 PKA	实施例 1	实施例 2	实施例 3
1	25.6	4.5	3.9	4.4
2	28.5	3.6	5.8	3.0
3	18.6	2.7	6.6	5.1
4	24.1	1.0	10.3	3.9
5	20.7	9.7	2.1	1.5
6	21.9	12.1	3.3	7.9
7	26.6	4.7	1.8	8.6
8	23.6	3.1	2.5	9.5
9	30.1	1.9	7.9	3.8
10	22.4	7.2	3.5	1.6
平均值	24.2	5.0	4.8	4.9

[0058] 从表 1 中可以看出,实施前平均 PKA 含量为 24.2 IU/mL,实施后分别降低为 4.8IU/mL、4.9IU/mL 和 5.0 IU/mL。通过以上数据可以证明,采用本发明工艺可以有效降低人血白蛋白制品中 PKA 含量,其含量远远低于《中国药典》中不高于 35IU/mL 的要求,确保了制品的安全性。

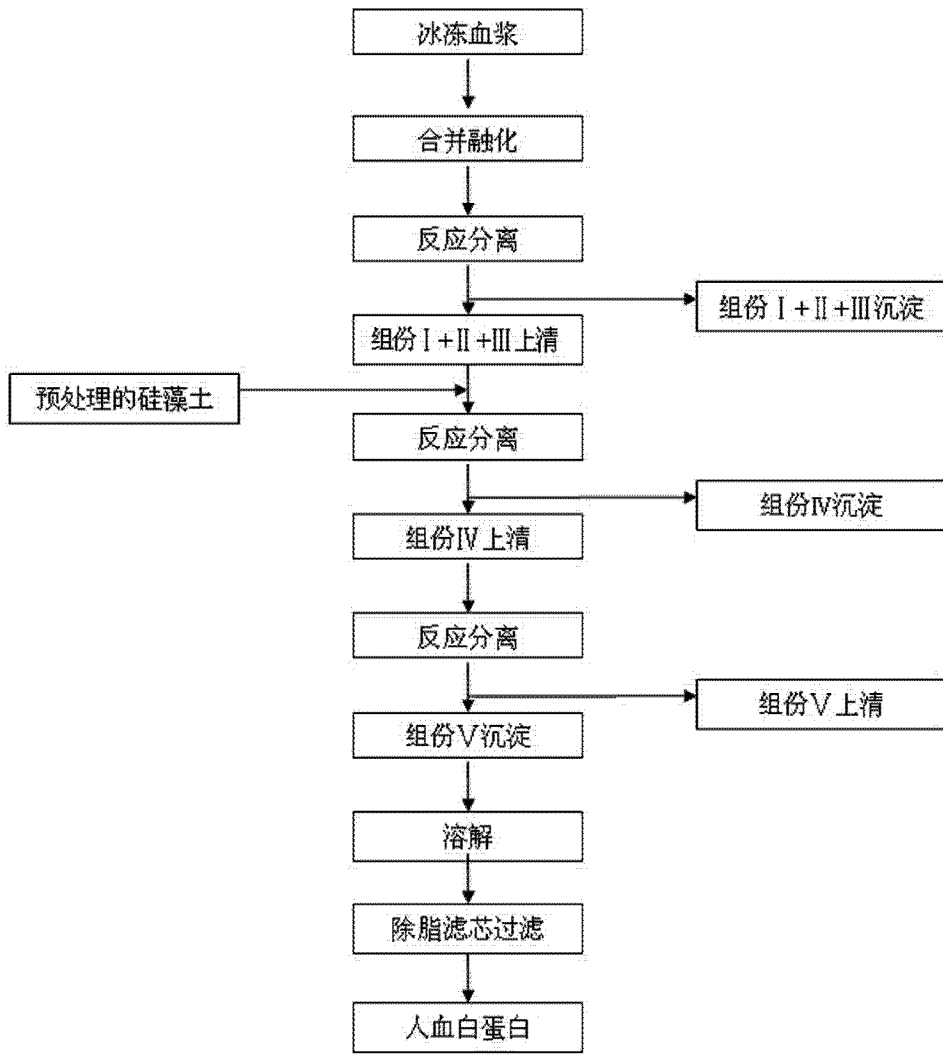


图 1