



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105541997 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 04

(21) 申请号 201610077518. 4

(22) 申请日 2016. 02. 04

(71) 申请人 江西博雅生物制药股份有限公司  
地址 344000 江西省抚州市高新技术产业园  
区惠泉路 333 号

(72) 发明人 杨笃才 梁小明 何淑琴 杨智  
刘宇良 匡青芬

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有  
限公司 36115

代理人 薛端石

(51) Int. Cl.  
C07K 14/745(2006. 01)  
C07K 1/34(2006. 01)  
C07K 1/22(2006. 01)  
C07K 1/18(2006. 01)

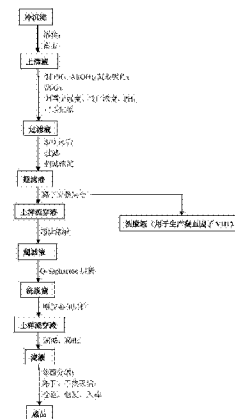
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺

(57) 摘要

本发明公开了一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,收集冷沉淀提取凝血因子VIII的废料即在冷沉淀提取凝血因子VIII的制备中层析柱流出来的液体作为原料;在血管性血友病因子的制备工艺中,对经层析后的蛋白液在层析缓冲液中加入甘氨酸保护 vWF 活性;优选层析后冻干前的蛋白液中加入赖氨酸、甘氨酸和白蛋白作为冻干保护剂,保护 vWF 活性;本发明获得高纯度的血管性血友病因子,质量可靠,可满足临床上血管性血友病人急需的治疗用药需求。同时对于冷沉淀的综合利用,间接节约稀缺血浆资源具有十分重要的意义。



1. 一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,收集冷沉淀提取凝血因子VIII的废料即在冷沉淀提取凝血因子VIII的制备中经层析柱流出来的液体作为原料;在血管性血友病因子的制备工艺中,对经层析后的蛋白液在层析缓冲液中加入甘氨酸保护vWF活性;优选层析后冻干前的蛋白液中加入赖氨酸、甘氨酸和白蛋白作为冻干保护剂,保护vWF活性;优选层析缓冲液中甘氨酸质量浓度0.6%~1%,冻干保护剂中赖氨酸质量浓度2~3%,甘氨酸质量浓度0.2%,白蛋白质量浓度0.8~1.3%。

2. 根据权利要求1所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,用一步Q-Sepharose阴离子交换层析及一步亲和层析纯化得到纯度较高的vWF:收集冷沉淀提取凝血因子VIII的废料即在冷沉淀提取凝血因子VIII的制备中经层析柱流出来的液体作为原料;通过Q-Sepharose离子交换柱层析后,收集洗脱液,再经明胶亲和层析,去除残余的纤维结合蛋白及杂质,得到血管性血友病因子。

3. 根据权利要求1所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,冷沉淀提取凝血因子VIII的的制备工艺包括:冷沉淀溶解、2%氢氧化铝凝胶吸附、调节离子强度、串联过滤、S/D灭活、离子交换层析;离子交换层析收集洗脱液,洗脱液经超滤、透析、过滤,用于凝血因子VIII的生产。

4. 根据权利要求1、2或3所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,

(1)通过调整洗涤缓冲液B和洗脱缓冲液B中的盐浓度;采用Q-Sepharose柱层析法去除纤维蛋白原和纤维结合蛋白及其它杂蛋白;

(2)经Q-Sepharose柱层析后的洗脱液,再经明胶层析,通过调整洗脱缓冲液B和透析液的盐浓度,去除残余的纤维结合蛋白及杂质,即得含高纯度vWF的流穿液。

5. 根据权利要求3所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,S/D灭活前串联过滤使用的滤芯尺寸为1.0 $\mu$ m和0.45 $\mu$ m的滤芯。

6. 根据权利要求3所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,离子交换层析流穿液收集后,先浓缩一倍,再用洗涤缓冲液B等体积超滤6次,再经Q-Sepharose层析柱,用洗脱缓冲液B收集洗脱下来的蛋白液。

7. 根据权利要求4所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,所述的洗涤缓冲液B的配方:4g枸橼酸钠,11.4g氯化钠,3g氯化钙,6g甘氨酸,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节pH为5.8~6.8。

8. 根据权利要求4所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,所述的洗脱缓冲液B配方:4g枸橼酸钠,16.38g氯化钠,3g氯化钙,6g甘氨酸,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节pH为5.8~6.8。

9. 根据权利要求4所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,所述的透析液配方:2.94g枸橼酸钠,25g氯化钠,0.111g氯化钙,30g甘氨酸,2g盐酸赖氨酸,人血白蛋白8g,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节pH为6.8~7.2。

10. 根据权利要求1所述的一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,其特征在于,制备工艺如下:

(1)收集冷沉淀;

(2)将步骤(1)的冷沉淀加入3IU/ml肝素钠溶液中,搅拌至冷沉淀完全溶解,循环水的

温度控制在28~37℃;开始离心,收集上清液,称重;

(3)将步骤(2)的制得物上清液用1mol/L HCL调节pH至6.0~7.0;加入2%氢氧化铝凝胶,搅拌;开始离心,收集上清液,称重;

(4)按“调节离子强度缓冲液W=上清液重量/10”计算,称取计算量的调节离子强度缓冲液至步骤(3)的制得物上清液中;调节上清液pH至6.0~7.0;用调节蛋白浓度缓冲液调节蛋白浓度不大于10g/L;用1.0μm的滤芯和0.45μm的滤芯串联过滤,收集过滤液,称重;

(5)按步骤(4)的制得物过滤液体积的1/10加入S/D溶液,搅拌均匀,温度控制在24~26℃,连续保温6小时;0.45μm滤芯过滤;过滤液用30KD超滤膜浓缩至蛋白浓度2%,然后用蛋白液重量的2倍以上洗涤缓冲液A恒体积超滤,得超滤液,称重;

(6)将步骤(5)的制得物超滤液用离子交换柱进行层析纯化,用洗涤缓冲液A洗涤柱子直至成基线,用洗脱缓冲液A洗脱,收集洗脱液;

(7)收集步骤(6)经层析柱流出来的液体,浓缩一倍,洗涤缓冲液B等体积超滤6次,得超滤液,称重;

(8)将步骤(7)的制得物超滤液用Q-Sepharose阴离子交换层析柱进行层析纯化,用洗涤缓冲液B洗涤柱子直至成基线,用洗脱缓冲液B洗脱,收集洗脱液,称重;

(9)将步骤(8)的制得物洗脱液明胶亲和层析进行纯化,用洗脱缓冲液B洗涤柱子直至成基线,收集上样后经层析柱流出来的液体,用透析液透析、稀释至效价100IU/ml,得蛋白液,称重;

(10)将步骤(9)的制得物蛋白液经0.2μm除菌滤芯过滤分装;分装好的制品传入冻干柜进行冷冻干燥;出柜扎盖;99~100℃、30分钟干热病毒灭活;送检,检验合格后包装、入库;

所述百分数除有限定之外,其余为质量百分数;

优选:步骤(4)所述的调节离子强度缓冲液的配方:离子强度缓冲液的配制方法:48.5g三羟甲基氨基甲烷,10g氯化钙,100g氯化钠,28.1g甘氨酸,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节pH为6.0~7.0;蛋白浓度缓冲液的配制方法:量取0.05L调节离子强度缓冲液,加注射用水至1L,调节pH为6.0~7.0;

优选:步骤(5)所述的洗涤缓冲液A的配方:2.5g三羟甲基氨基甲烷,10g氯化钙,25g氯化钠,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节pH为6.0~7.0;

优选:步骤(6)所述的洗脱缓冲液A配方:2.5g三羟甲基氨基甲烷,15g氯化钙,40.9g氯化钠,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节pH为6.0~7.0。

## 一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种从人血浆冷沉淀提取凝血因子VIII的废料中提取人血管性血友病因子的制备工艺,特别涉及一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺,属于生物制药领域。

### 背景技术

[0002] vWF是一种具有多聚体的血浆糖蛋白,其分子量从250kDa到2千万kDa不等,形成血浆中已知的最大分子量可溶性蛋白。血浆中小分子量vWF主要是二聚体形式,分子量约500kDa。大小不等的多聚体,对维持vWF正常生物活性具有重要意义。

[0003] 血浆vWF在原发性止血中起着重要作用,其负责血小板与受损伤血管表面的粘附,并因此形成血小板栓子,有助于纤维蛋白交联的形成。另外,血浆vWF起着凝血因子VIII的运输剂和稳定剂的作用。

[0004] 血管性血友病(vWD)是最常见的遗传性出血性疾病,患者von Willebrand因子(von Willebrand factor,vWF)基因突变或调控异常导致血浆vWF数量减少或质量异常。vWD临床特征主要为皮肤黏膜出血,2N型和3型患者还可发生与血友病A相似的关节腔出血和肌肉血肿。据国外报道,vWD发病率(2.3~11.0)/10万人口,一般认为在遗传性出血性疾病中,vWD居第二位。

[0005] 临床上vWF的活性用瑞斯托霉素辅因子活性(vWF:RCo)来表征,主要用于治疗先天性、获得性血管性血友病(vWD),一般以20~60U vWF:RCo/kg剂量来给药。

[0006] 研究表明冷沉淀中富含vWF等凝血因子类物质。在血浆原料日趋紧缺的今天,通过冷沉淀来制备vWF,对冷沉淀的综合利用,节约稀缺血浆资源,提高市场竞争力具有重大意义。

[0007] 现有技术中,较早的工艺使用vWF的抗体偶联到琼脂糖凝胶上,通过免疫亲和层析纯化vWF,但其抗体制备周期长,凝胶载量低,不合作大规模制备,如《Purification of von Willebrand Factor solutions using gel permeation chromatography》(UP 4774323)。

[0008] 有专利用DEAE Fractogel TSK 650M(Merck)纯化vWF因子组分,纯度高,但是工艺比较复杂,需要两步离子交换和一步亲和层析,如《Process for an industrial-scale preparation of a standardized human von Willebrand factor concentrate of very high purity and suitable for therapeutic use》(US 5408039)。也有报道CHT层析结合PH5.4酸沉淀分离vWF组分的,其比活不高,且酸沉淀去除纤维结合蛋白的同时,可能影响vWF的生物学活性,如《Production of a von willebrand factor preparation having a great specific activity》(US20070135619A1)。

[0009] 另外还有一些工艺用EMD Fractogel TMAE(Merck)来纯化VIII/vWF因子复合物,但是都无法单独得到高纯度的vWF,治疗针对性不强,如《具有止血活性的含有vWF的制剂及其制备方法》(CN1425024A),《A Process for recovering a high-purity virus-

inactivated factor VIII by anion exchanger chromatography》(US 5714590)。

[0010] 还有一些公司用基因重组的方法(猴肾细胞或CHO细胞)纯化vWF,他们通过阴离子交换层析法从动物细胞培养液中进行提纯,但是由于动物原性抗原的存在,人体对其可能有排斥作用,如《Method for isolation of highly pure von Willebrand Factor》(US 5854403)。

[0011] 另有采用两步层析法纯化制备vWF的报道,但其纯度不高,比活相对较低,仅50IU/mg,如《Process for manufacturing von Willebrand factor》(US 5252710)。

[0012] 可见,现有的vWF纯化工艺仍存在问题:(1)制备周期长,不适应于大规模制备,尤其是采用免疫亲和层析法纯化时,其抗体制备周期长,凝胶载量低。(2)VIII/vWF复合物产品在较难控制工艺稳定性;(3)重组方法所得vWF产品可能存在异质抗原;(4)分离纯化工艺繁琐。

[0013] 目前,血管性血友病可用冷沉淀、VIII/vWF因子复合物和DDAVP(1-去氨基-8-D-精氨酸加压素)治疗,但针对性不强,更纯的vWF因子可专一性治疗各种类型的血管性血友病,与前几种方法比有较大优势。

## 发明内容

[0014] 本发明的目的在于提供一种高纯度和高活性血管性血友病因子的制备工艺。

[0015] 本发明的主要技术构思如下:

[0016] 本发明对经层析后的蛋白液在层析缓冲液中加入甘氨酸保护vWF活性;优选层析后冻干前的蛋白液中加入赖氨酸、甘氨酸和白蛋白作为冻干保护剂,保护vWF活性;优选层析缓冲液中甘氨酸质量浓度0.6%~1%,冻干保护剂中赖氨酸质量浓度2~3%,甘氨酸质量浓度0.2%,白蛋白质量浓度0.8~1.3%。

[0017] 本发明于S/D病毒灭活前优化添加2%氢氧化铝凝胶进行吸附去除II、VII、IX、X因子;S/D灭活前串联过滤使用的滤芯尺寸为1.0 $\mu$ m和0.45 $\mu$ m的滤芯。

[0018] 本发明用一步Q-Sepharose阴离子交换层析及一步亲和层析纯化得到纯度较高的vWF。即收集冷沉淀提取凝血因子VIII的废料即在冷沉淀提取凝血因子VIII的制备中经层析柱流出来的液体作为原料;通过Q-Sepharose离子交换柱层析后,收集洗脱液,再经明胶亲和层析,去除残余的纤维结合蛋白及杂质,得到血管性血友病因子。

[0019] 本发明的制备工艺中:

[0020] (1)通过调整洗涤缓冲液B和洗脱缓冲液B中的盐浓度;采用Q-Sepharose柱层析法去除纤维蛋白原和纤维结合蛋白及其它杂蛋白;

[0021] (2)经Q-Sepharose柱层析后的洗脱液,再经明胶层析,通过调整洗脱缓冲液B和透析液的盐浓度,去除残余的纤维结合蛋白及杂质,即得含高纯度vWF的流穿液。

[0022] 本发明的制备工艺,它依次包括:冷沉淀溶解、2%氢氧化铝凝胶吸附、调节离子强度、串联过滤、S/D病毒灭活、离子交换层析;离子交换层析得收集洗脱液,洗脱液经超滤、透析、过滤,用于凝血因子VIII的生产,再从冷沉淀提取凝血因子VIII的废料即收集经层析柱流穿出的液体中提取vWF;Q-Sepharose阴离子交换层析、明胶亲和层析、除菌过滤分装、冷冻干燥、干热灭活。离子交换层析流穿液收集后,先浓缩一倍,再用洗涤缓冲液B等体积超滤6次,再经Q-Sepharose层析柱,用洗脱缓冲液B收集洗脱下来的蛋白液。

[0023] 本发明是这样来实现的,其具体工艺方案如下:

[0024] (1)检疫期检疫合格的人血浆领取后,75%乙醇擦拭血浆袋表面,用注射用水冲洗,合并到融浆罐中,用30~35℃以下循环水融化,血浆温度控制不高于4℃;待融化后,离心,出液温度控制在0~4℃,收集冷沉淀;

[0025] (2)将步骤(1)的制得物加入3IU/ml肝素钠溶液中,搅拌至冷沉淀完全溶解,循环水的温度控制在28~37℃;开始离心,收集上清液,称重;

[0026] (3)将步骤(2)的制得物上清液用1mol/L盐酸调节PH至6.0~7.0;加入2%氢氧化铝凝胶,搅拌;开始离心,收集上清液,称重;

[0027] (4)按“W(离子强度缓冲液)=上清液重量/10”计算,称取计算量的离子强度缓冲液至步骤(3)的制得物上清液中;调节上清液PH至6.0~7.0;用蛋白浓度缓冲液调节蛋白浓度不大于10g/L;用1.0μm的滤芯过滤,收集过滤液,称重;

[0028] (5)按步骤(4)的制得物过滤液体积的1/10加入S/D溶液,搅拌均匀,温度控制在24~26℃,连续保温6小时;0.45μm滤芯过滤;过滤液用30KD超滤膜浓缩至蛋白浓度2%,然后用蛋白液重量的2倍以上洗涤缓冲液A恒体积超滤,得超滤液,称重;

[0029] (6)将步骤(5)的制得物超滤液用离子交换柱进行层析纯化,用洗涤缓冲液A洗涤柱子直至成基线,用洗脱缓冲液A洗脱,收集洗脱液(洗脱液经超滤、透析、过滤,用于凝血因子VIII的生产)。

[0030] (7)收集步骤(6)经层析柱流出来的液体,浓缩一倍,洗涤缓冲液B等体积超滤6次,得超滤液,称重。

[0031] (8)将步骤(7)的制得物超滤液用Q-Sepharose阴离子交换层析柱进行层析纯化,用洗涤缓冲液B洗涤柱子直至成基线,用洗脱缓冲液B洗脱,收集洗脱液,称重。

[0032] (9)将步骤(8)的制得物洗脱液明胶亲和层析进行纯化,用洗脱缓冲液B洗涤柱子直至成基线,收集上样后经层析柱流出来的液体,用透析液透析、稀释至效价100IU/ml,得蛋白液,称重。

[0033] (10)将步骤(9)的制得物蛋白液经0.2μm除菌滤芯过滤分装;分装好的制品传入冻干柜进行冷冻干燥;出柜扎盖;99~100℃、30分钟干热病毒灭活;送检,检验合格后包装、入库。

[0034] 离子强度缓冲液的配制方法:48.5g三羟甲基氨基甲烷,10g氯化钙,100g氯化钠,28.1g甘氨酸,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节PH为6.0~7.0;蛋白浓度缓冲液的配制方法:量取0.05L调节离子强度缓冲液,加注射用水至1L,调节PH为6.0~7.0。

[0035] 洗涤缓冲液A配方:2.5g三羟甲基氨基甲烷,10g氯化钙,25g氯化钠,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节PH为6.0~7.0。

[0036] 洗脱缓冲液A配方:2.5g三羟甲基氨基甲烷,15g氯化钙,40.9g氯化钠,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节PH为6.0~7.0。

[0037] 洗涤缓冲液B的配方:4g枸橼酸钠,11.4g氯化钠,3g氯化钙,6g甘氨酸,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节PH为5.8~6.8。

[0038] 洗脱缓冲液B配方:4g枸橼酸钠,16.38g氯化钠,3g氯化钙,6g甘氨酸,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节PH为5.8~6.8。

[0039] 透析液的配方:2.94g枸橼酸钠,25g氯化钠,0.111g氯化钙,30g甘氨酸,2g盐酸赖

氨酸,人血白蛋白8g,加适量注射用水充分溶解,补加注射用水至1L,调节PH为6.8~7.2。

[0040] 所述百分数除有限定之外,其余为质量百分数。

[0041] 本发明的积极效果:

[0042] 1、在血浆原料日趋紧缺的今天,通过冷沉淀来制备vWF,对冷沉淀的充分利用,提高市场竞争力有着重大意义,另外也能间接节约稀缺血浆资源。

[0043] 2、在离子交换层析提纯vWF的过程中,用适当洗脱液洗脱下来的溶液,再经超滤、透析、过滤等工序,可用于生产凝血因子VIII。

[0044] 本发明相比于传统vWF的制备工艺,创新点在于:

[0045] 1.充分利用血浆资源,用凝血因子VIII离子交换的流穿废液制备高纯度vWF。生产凝血因子VIII时会产生废料如vWF、纤维蛋白原等,将废料中的组分分离出来,变废为宝,最大限度利用紧缺的血浆资源,提高血浆利用率。

[0046] 2、对层析缓冲液加入甘氨酸,层析后冻干前的蛋白液中加入赖氨酸、甘氨酸和白蛋白,保护vWF活性。层析缓冲液中加入甘氨酸可以在层析分离纯化过程中,减少vWF的活性损失。在蛋白透析液中加入白蛋白、赖氨酸、甘氨酸作为冻干保护剂,可稳定vWF分子。白蛋白是优良蛋白稳定剂,同时可以有效蛋白质表面的吸附。赖氨酸、甘氨酸为小分子氨基酸,可以保护蛋白质结构,能升高成品的塌陷温度,阻止冻干过程中因塌陷导致的蛋白质损伤。保持生物学活性。

[0047] 3、离子交换层析分离vWF的最关键因素是洗涤液和洗脱液的盐离子浓度。洗涤液盐浓度过低会导致纤维蛋白原、纤维结合蛋白等杂质残存,洗涤液盐浓度过高,将导致vWF的回收率降低,洗脱得到的vWF量减少。在多次试验后发现,195mM(11.4g/L)氯化钠为最佳洗涤液盐浓度。另外洗脱液盐浓度也需在适宜范围内,过高过低也不利于vWF的获得,我们通过试验确定为280mM(16.38g/L)。这两种盐浓度的配比可以兼顾vWF的活性和比活,是一对最好的配比浓度。

[0048] 4、本工艺采用一步离子交换和一步亲和层析工艺,既能保证vWF的纯度和收率,也可简化生产工艺,充分降低人力和时间成本。离子交换层析起到初步纯化的作用,亲和层析填料具有特异性结合蛋白的特点,进一步对蛋白进行精细纯化。

[0049] 5、采用人源性的冷沉淀作为起始原料,避免了重组蛋白的异质抗原排斥反应的发生,提高了临床使用安全性。

## 附图说明

[0050] 图1为本发明工艺流程图。

[0051] 具体实施案例

[0052] 本发明通过下面的实施例可以对本发明作进一步的描述,然而,本发明的范围并不限于下述实施例。

[0053] 以6000L血浆为例,具体制备工艺如下:

[0054] (1)检疫期检疫合格的人血浆领取后,75%乙醇擦拭血浆袋表面,用注射用水冲洗,合并到融浆罐中,用30~35℃以下循环水融化,血浆温度控制不高于4℃;待融化后,离心,出液温度控制在0~4℃,收集得冷沉淀45.2kg;

[0055] (2)将步骤(1)的制得物冷沉淀加入3IU/ml肝素钠溶液中,搅拌至冷沉淀完全溶

解,循环水的温度控制在28~37℃;开始离心,收集上清液,称重得169.5kg;

[0056] (3)将步骤(2)的制得物上清液用1mol/L HCL调节PH至6.0~7.0;加2%氢氧化铝凝胶,搅拌;开始离心,收集上清液,称重得178.6kg;

[0057] (4)按“W(离子强度缓冲液)=上清液重量/10”计算,称取计算量的离子强度缓冲液至步骤(3)的制得物上清液中;调节上清液PH至6.0~7.0;用蛋白浓度缓冲液调节蛋白浓度不大于10g/L;用1.0μm的滤芯和0.45μm的滤芯串联后过滤,收集过滤液,称重得189.9kg;

[0058] (5)按步骤(4)的制得物过滤液体积的1/10加入S/D溶液,搅拌均匀,温度控制在24~26℃,连续保温6小时;0.45μm滤芯过滤;过滤液用30KD超滤膜浓缩至蛋白浓度约2%,然后用蛋白液重量的2倍以上洗涤缓冲液A恒体积超滤,即超滤液,称重得201.4L;

[0059] (6)将步骤(5)的制得物超滤液用离子交换柱进行层析纯化,用洗涤缓冲液A洗涤柱子直至成基线,用洗脱缓冲液A洗脱,收集洗脱液。

[0060] (7)收集步骤(6)经层析柱流出来的液体,浓缩一倍,洗涤缓冲液B等体积超滤6次,得超滤液,称重得120.5L;

[0061] (8)将步骤(7)的制得物超滤液用Q-Sepharose阴离子交换层析柱进行层析纯化,用洗涤缓冲液B洗涤柱子直至成基线,用洗脱缓冲液B洗脱,收集洗脱液,称重得48.5L;

[0062] (9)将步骤(8)的制得物洗脱液明胶亲和层析进行纯化,用洗脱缓冲液B洗涤柱子直至成基线,收集上样后经层析柱流出来的液体,超滤浓缩至5L,透析6遍,得超滤液,称重得5.2L;按效价100IU/ml稀配至6.1L;

[0063] (10)将步骤(9)的制得物滤液经0.2μm除菌滤芯过滤分装,分装装量为每瓶5mL,分装数量为1196瓶;分装好的制品传入冻干柜进行冷冻干燥;出柜扎盖;99~100℃、30分钟干热病毒灭活;送检,检验合格后包装、入库;

[0064] 所述百分数除有限定外,其余为质量百分数。

[0065] 本发明方法制备的产品与《欧洲药典中》描述的vWF关键质量指标的对比如下表1。

[0066] 表1:

[0067]

项目	本发明	《欧洲药典》
PH	6.8~7.2	6.5~7.5
活性	应≥100IU/ml	≥1IU/ml
比活	应≥200IU/mg	≥20IU/mg
凝血因子VIII含量	每100IU vWF:RCo中VIII:C 2~4IU/ml	每100IUvWF:RCo中VIII:C ≤10IU/ml
渗透压摩尔浓度	240~1000mOsmol/kg	应不低于240mOsmol/kg

[0068] 本发明方法制备的产品中,不同的离子交换盐浓度对产品质量的影响的小试研究,如下表2。

[0069] 表2:

[0070]



洗涤液 B 盐浓度 (mM)	洗脱液 B 盐浓度 (mM)	vWF:RCo 活性 (IU/ml)	蛋白含量 (mg/ml)	比活 (IU/mg)
175	240	102.06	4.18	94.26
	280	103.82	4.94	81.12
195	240	95.76	1.824	202.67
	280	103.32	1.9	209.92
215	240	55.44	1.14	187.6
	280	63	1.52	160

[0071] 说明:阴离子交换过程中,vWF和纤维结合蛋白在150mM NaCl到300mM NaCl这个盐浓度区间,对盐浓度即离子强度非常敏感,经试验对比分析,筛选得到两种主要杂质(纤维结合蛋白和纤维蛋白原)最少的层析缓冲液配方。优选洗涤液为195mM NaCl(11.4g/L)和洗脱液为280mM NaCl(16.38g/L),可得到活性和比活均较高的vWF。

[0072] 本发明方法制备的产品中,层析缓冲液中甘氨酸对产品的影响,如表3。

[0073] 表3:

[0074]

甘氨酸浓度(%)	洗涤液B盐浓度(%)	洗脱液B盐浓度(%)	vWF:RCo活性(IU/ml)
0	195	280	101.5
0.2	195	280	102.1
0.6	195	280	104.8
1.0	195	280	104.81

[0075] 说明:层析缓冲液中的甘氨酸能在层析过程中,保护vWF中的作用,质量浓度0.6%~1%,此范围的甘氨酸浓度对层析过程vWF的保护作用相差不大,选择较低的即可,最佳的是0.6%。

[0076] 本发明方法制备的产品中,透析液(冻干保护液)各种不同成分对产品的影响,如表4。

[0077] 表4:

[0078]

甘氨酸浓度(%)	赖氨酸浓度(%)	白蛋白浓度(%)	外观	vWF:RCo 活性 (IU/ml)
0	0	0	可见萎缩,有明显乳光	95.2
1	0.2	0.8	略有萎缩,有轻微乳光	99.15
1	0.2	1.3	略有萎缩,有轻微乳光	102.7
2	0.2	0.8	略有萎缩,有轻微乳光	102.9
2	0.2	1.3	略有萎缩,有轻微乳光	103.2
3	0.2	0.8	无萎缩,无乳光	104.3
3	0.2	1.3	无萎缩,无乳光	104.6

[0079] 说明:甘氨酸质量浓度2~3%,赖氨酸质量浓度0.2%,白蛋白质量浓度0.8~1.3%,为较好的适用范围,外观略微或无萎缩,且有轻微或无乳光,活性亦得到较好保护。赖氨酸的质量浓度的差别对冻干保护影响较小,选择0.2%即可。最佳的透析缓冲液(冻干保护液)配方为甘氨酸浓度为3%,白蛋白浓度为0.8%,外观和活性均为最佳。

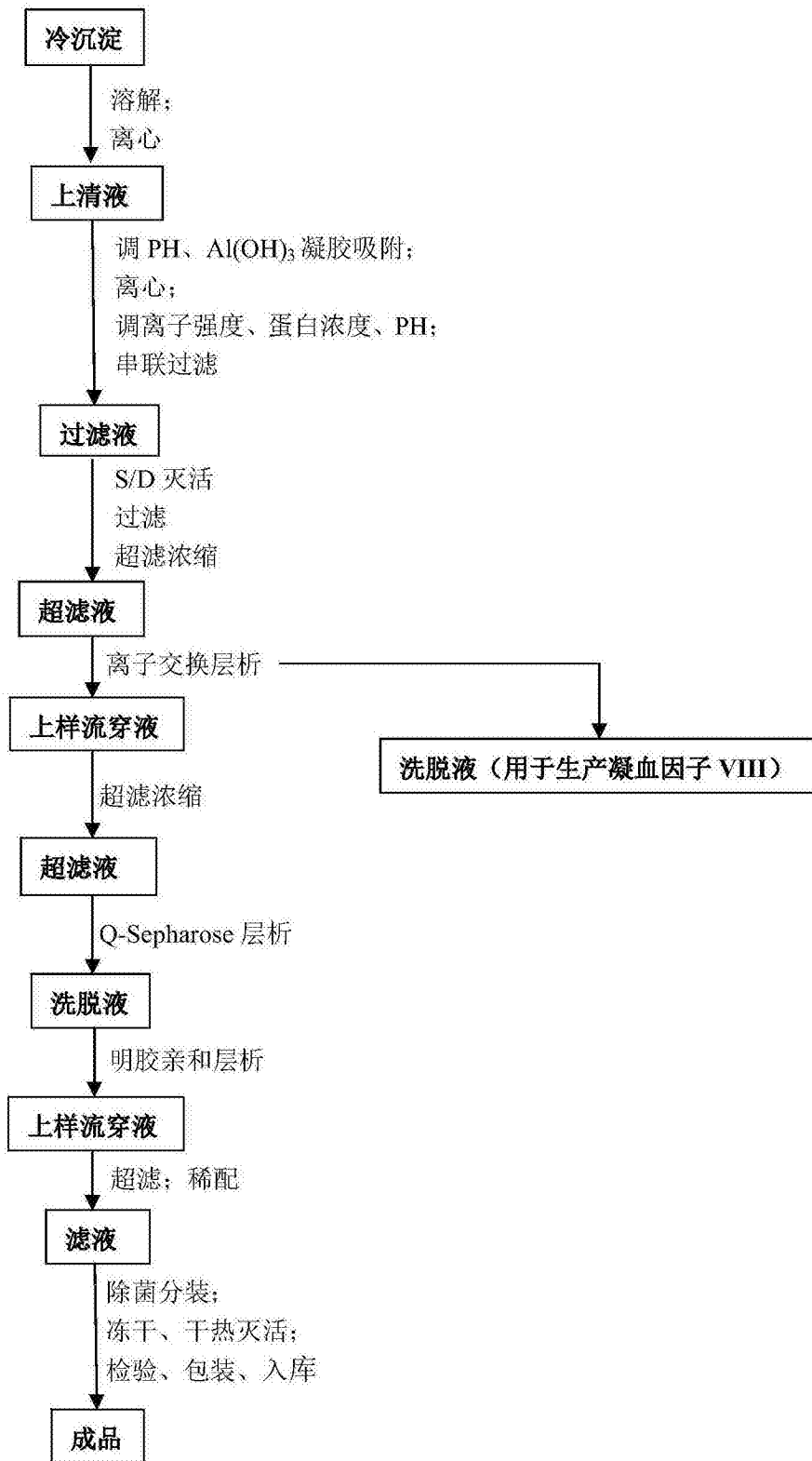


图1