



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101974070 B

(45) 授权公告日 2012.06.20

(21) 申请号 201010534827.2

(22) 申请日 2010.11.08

(73) 专利权人 江西博雅生物制药股份有限公司
地址 344000 江西省抚州市赣东大道 161 号

(72) 发明人 廖昕晰 邓志华 徐建新 梁小明
何淑琴

(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 施秀瑾

(51) Int. Cl.

C07K 1/36(2006.01)

C07K 1/34(2006.01)

C07K 1/16(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1475569 A, 2004.02.18, 全文.

刘欣晏等. 采用两步凝胶吸附法制备人凝血酶原复合物的工艺研究. 《中国生化药物杂志》. 2008, 第 29 卷 (第 01 期), 26-29.

邱家山等. 人凝血酶原复合物分离纯化工艺的研究进展. 《生物技术通报》. 2006, (第 02

期), 17-24.

焦丽华等. 凝血酶原复合物的制备及其临床应用进展. 《中国输血杂志》. 2008, 第 21 卷 (第 09 期), 737-741.

余蓉等. 改良凝胶吸附法制备的凝血酶原复合物. 《中国输血杂志》. 1997, 第 10 卷 (第 02 期), 63-66, 118.

余蓉等. 批式吸附法制备人凝血因子 IX 复合物 (英文). 《中国现代应用药理学》. 2003, 第 20 卷 (第 06 期), 450-452.

审查员 张小勇

权利要求书 2 页 说明书 4 页

(54) 发明名称

一种人凝血酶原复合物的制备工艺

(57) 摘要

本发明涉及一种人凝血酶原复合物的制备工艺,属于生物制药领域,制备工艺包括对血浆进行吸附、洗涤、洗脱及澄清过滤;病毒灭活(S/D法);再吸附纯化;分装;冻干;干热灭活;本发明采取凝胶直接从血浆吸附人凝血酶原复合物,在提取整个过程只用凝胶层析技术,简化了生产步骤,减少了各种因素对产品生产过程中的污染,同时产品的得率提高 25-30%。此外生产过程中采用 S/D 法去除脂包膜病毒及 99.5±0.5℃干热法去除非脂包膜病毒,经过这 2 次病毒灭活步骤显著提高了临床用药的安全性。

1. 一种人凝血酶原复合物的制备工艺,其特征是制备工艺如下:

(1)、吸附

将符合药典要求的去除冷沉淀的血浆升温至 8-10℃,按该血浆量的 0.8-1.5% 加入用平衡液预平衡的 A-50 凝胶,搅拌吸附 45 分钟以上,收集凝胶,上清液并入血浆罐中;

(2)、洗涤

用每次不少于步骤(1)得的凝胶量的 1 倍体积的洗涤液洗涤该凝胶 2-3 次,每次搅拌均匀后放干,收集洗涤液并入血浆罐中;

(3)、洗脱

用每次不少于步骤(2)得的洗涤后的凝胶量的 1 倍体积的洗脱液洗脱该凝胶 3 次,每次搅拌 10 分钟放干,收集洗脱后的蛋白洗脱液于干净的容器中;用 0.45-1.0 滤芯的澄清滤器过滤蛋白洗脱液,收集过滤后的蛋白过滤液;

(4)、超滤

进行 3 次以上超滤透析,每次用与步骤(3)得的蛋白过滤液等体积透析液进行超滤透析,浓缩收集浓缩液,使透析出液电导值低于 15ms,效价在 20-50IU/ml,称重浓缩液量,PH 在 6.5-7.5;

(5)、用 S/D 法病毒灭活

按步骤(4)的浓缩液总量的 10% 加入 11%S/D 溶液搅拌均匀,得蛋白混合液,把蛋白混合液转移至灭活罐;搅拌升温至 24-26℃连续保温 6 小时,每半小时记录蛋白混合液温度一次;

(6)、再吸附纯化

①凝胶柱及 A-50 凝胶处理:使用 0.5mol/LNaOH 涂抹凝胶柱,A-50 凝胶使用 0.5mol/LNaOH 浸泡 2 小时;

②超滤机用注射用水冲洗至中性;

③吸附:将 S/D 灭活后的蛋白混合液,搅拌,按血浆量的 1.0-1.5% 加入用平衡液预平衡好的 A-50 凝胶,吸附 45 分钟以上,收集凝胶,流出液弃;

④洗涤:用每次不少于步骤③得的凝胶量的 1 倍体积的 S/D 洗涤液洗涤该凝胶 10 次,每次搅拌均匀后放干,洗涤流出液弃;

⑤洗脱:用每次不少于步骤④得的洗涤后的凝胶量的 1 倍体积的洗脱液洗脱该凝胶 3 次,每次搅拌 20 分钟放干,收集洗脱后的蛋白洗脱液于干净的容器中;

⑥用 0.45-1.0 滤芯的澄清滤器过滤步骤⑤得的蛋白洗脱液,收集过滤后的蛋白过滤液;

⑦超滤:进行 3 次以上超滤透析,每次用与步骤⑥得的蛋白过滤液等体积透析液进行超滤透析,使透析出液电导值低于 10 ms,开始进行浓缩,浓缩液效价在 30IU/ml 以上,浓缩后把浓缩液转入配制罐,称重浓缩液量,调整 PH 为 6.5-7.5,搅拌均匀后取 20ml,3 瓶样品做原液检定;根据检定结果配液,以总效价的 0.2 倍加入肝素钠,最终按制品重量加入甘氨酸,使甘氨酸含量为 2%;

(7)、分装;

(8)、冻干;

①制品常温进柜,

- ②隔板 10 分钟从常温降至 0°C, 保持 30 分钟;
- ③隔板 30 分钟从 0°C 降到 -40°C, 在 -40°C 保持 1.5 小时;
- ④开真空泵到真空达到 0.3mbar 稳定;
- ⑤ 1 小时隔板升温到 -33°C, 保持 1 小时;
- ⑥ 5 小时隔板升温到 0°C, 保持 30 小时;
- ⑦ 2 小时隔板升温到 10°C, 保持 6 小时;
- ⑧ 2 小时隔板升温到 35°C, 保持 6 小时;
- ⑨ 1 小时使真空到 0.05mbar, 保持 1 小时;

(9)、干热灭活;

其中

平衡液含 0.08mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三钠, 余量为水, PH 在 6.8-7.2;

洗涤液含 0.14 mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三钠, 余量为水, PH 在 6.8-7.2;

S/D 洗涤液含 0.05 mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三钠, 余量为水, PH 在 6.8-7.2;

洗脱液含 2mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三钠, 余量为水;

透析液含 0.01mol/L 柠檬酸三钠, 余量为水, PH 在 6.8-7.2;

11%S/D 溶液按 110ml 吐温 -80 和 33ml TNBP 加水至 1L 的方法制备;

以上百分比除特别说明, 其余均为重量百分比。

一种人凝血酶原复合物的制备工艺

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人凝血酶原复合物的制备工艺,属于生物制药领域。

背景技术

[0002] 人凝血酶原复合物含有维生素 K 依赖其在肝脏合成的四种凝血因子 II、VII、IX、X。维生素 K 缺乏和严重肝脏疾患均可造成这四个因子的缺乏。而上述任何一个因子的缺乏都可导致凝血障碍。输注人凝血酶原复合物能提高血液中凝血因子 II、VII、IX、X 的浓度。因此,主要用于治疗先天性和获得性凝血因子 II、VII、IX、X 缺乏症。标准的制法为:取健康献血员的新鲜分离液体血浆、冰冻血浆,用直接凝胶吸附法或低温乙醇和聚乙二醇法自血浆中分离蛋白并用国家认可的方法提纯。经灭活病毒后配制成规定浓度的溶液,加适量稳定剂,除菌滤过,无菌灌装,及时冷冻干燥制成。现有技术中如公开号 CN 1475569A,发明名称《冻干人凝血酶原复合物的生产方法》,它包括有以下工序:以 F I I I 沉淀为原料经溶解→低温离心分离、过滤→凝胶吸附→洗涤、洗脱凝胶→超滤浓缩→S / D 灭活病毒→二次凝胶吸附→洗涤和洗脱凝胶→超滤透析→微孔膜除菌过滤分装→冷冻干燥,将冻干人凝血酶原复合物置于 9 8 - 1 0 0 °C 的沸水浴中进行干热灭活 3 0 分钟。该冻干人凝血酶原复合物具有 I X 因子含量大于 2 0 1 0 / m l , I X 因子比活性大于 0 . 6 1 0 / a g 蛋白的欧洲药典标准及病毒灭活更彻底,使用更安全的优点。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种采取凝胶直接从血浆吸附人凝血酶原复合物,在提取整个过程只采用凝胶层析技术,简化了生产步骤,减少了各种因素对产品生产过程中的污染,同时产品的得率提高,经过二次病毒灭活显著提高了临床用药的安全性的人凝血酶原复合物的制备工艺。

[0004] 本发明的目的是这样实现的,其制备工艺如下:

[0005] (1)、吸附

[0006] 将符合药典要求的去除冷沉淀的血浆升温至 8-10°C,按该血浆量的 0.8-1.5% 加入用平衡液预平衡的 A-50 凝胶,搅拌吸附 45-60 分钟以上,收集凝胶,上清液并入血浆罐中;

[0007] (2)、洗涤

[0008] 用每次不少于步骤(1)得的凝胶量的 1 倍体积的洗涤液洗涤该凝胶 2-3 次,每次搅拌均匀后放干,收集洗涤液并入血浆罐中;

[0009] (3)、洗脱

[0010] 用每次不少于步骤(2)得的洗涤后的凝胶量的 1 倍体积的洗脱液洗脱该凝胶 3 次,每次搅拌 10 分钟放干,收集洗脱后的蛋白洗脱液于干净的容器中;用 0.45-1.0 滤芯的澄清过滤器过滤收集的过滤后的蛋白过滤液;

[0011] (4)、超滤

[0012] 进行 3 次以上超滤透析,每次用与步骤(3)得的蛋白过滤液等体积透析液进行超滤透析,浓缩收集浓缩液,使透析出液电导值低于 15ms,效价在 20-50IU/ml,称重浓缩液量,PH 在 6.5-7.5;

[0013] (5)、用 S/D 法病毒灭活

[0014] 按步骤(4)的浓缩液总量的 10% 加入 11%S/D 溶液搅拌均匀,得蛋白混合液,把蛋白混合液转移至灭活罐;搅拌升温至 24-26℃连续保温 6 小时,每半小时记录蛋白混合液温度一次;

[0015] (6)、再吸附纯化

[0016] ①凝胶柱及 A-50 凝胶处理:使用 0.5mol/LNaOH 涂抹凝胶柱,A-50 凝胶使用 0.5mol/LNaOH 浸泡 2 小时;

[0017] ②超滤机用注射用水冲洗至中性;

[0018] ③吸附:将 S/D 灭活后的蛋白混合液,搅拌,按血浆量的 1.0-1.5% 加入用平衡液预平衡好的 A-50 凝胶,吸附 45 分钟以上,收集凝胶,流出液弃;

[0019] ④洗涤:用每次不少于步骤③得的凝胶量的 1 倍体积的 S/D 洗涤液洗涤该凝胶 10 次,每次搅拌均匀后放干,洗涤流出液弃;

[0020] ⑤洗脱:用每次不少于步骤④得的洗涤后的凝胶量的 1 倍体积的洗脱液洗脱该凝胶 3 次,每次搅拌 20 分钟放干,收集洗脱后的蛋白洗脱液于干净的容器中;

[0021] ⑥用 0.45-1.0 滤芯的澄清滤器过滤步骤⑤得的蛋白洗脱液,收集的过滤后的蛋白过滤液;

[0022] ⑦超滤:进行 3 次以上超滤透析,每次用与步骤⑥得的蛋白过滤液等体积透析液进行超滤透析,使透析出液电导值低于 10 ms,开始进行浓缩,浓缩液效价在 30IU/ml 以上,浓缩后把浓缩液转入配制罐,称重浓缩液量,调整 PH 为 6.5-7.5,搅拌均匀后取 20ml,3 瓶样品做原液检定;根据检定结果配液,以总效价的 0.2 倍加入肝素钠,最终按制品重量加入甘氨酸,使甘氨酸含量为 2%;

[0023] (7)、分装;

[0024] 根据稀配液效价,确定分装量,用 0.2 滤芯(PVDF)除菌分装;

[0025] (8)、冻干;

[0026] ①制品常温进柜,

[0027] ②隔板 10 分钟从常温降至 0℃,保持 30 分钟;

[0028] ③隔板 30 分钟从 0℃降到 -40℃,在 -40℃保持 1.5 小时;

[0029] ④开真空泵到真空达到 0.3mbar 稳定;

[0030] ⑤ 1 小时隔板升温到 -33℃,保持 1 小时;

[0031] ⑥ 5 小时隔板升温到 0℃,保持 30 小时;

[0032] ⑦ 2 小时隔板升温到 10℃,保持 6 小时;

[0033] ⑧ 2 小时隔板升温到 35℃,保持 6 小时;

[0034] ⑨ 1 小时使真空到 0.05mbar,保持 1 小时;

[0035] (9)、干热灭活;

[0036] 用 99.5±0.5℃水浴干热灭活 30 分钟;

[0037] 其中

- [0038] 平衡液含 0.08mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;
- [0039] 洗涤液含 0.14 mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;
- [0040] S/D 洗涤液含 0.05 mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;
- [0041] 洗脱液含 2mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水 ;
- [0042] 透析液含 0.01mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;
- [0043] 11%S/D 溶液按 110ml 吐温 -80 和 33ml TNBP 加水至 1L 的方法制备 ;
- [0044] 以上百分比除特别说明,其余均为重量百分比。
- [0045] 本发明使用先进的层析技术,采取凝胶直接从血浆吸附人凝血酶原复合物,在提取整个过程只是采用先进的凝胶层析技术,简化了生产步骤,减少了各种因素对产品生产过程中的污染,同时产品的得率提高 25-30%。此外生产过程中采用 S/D 法去除脂包膜病毒及 99.5±0.5℃干热法去除非脂包膜病毒,经过这 2 次病毒灭活步骤显著提高了临床用药的安全性。

具体实施方式

[0046] 实施例 :

[0047] 一、基本要求 :

[0048] 1、原料血浆的采集和质量应符合血液制品生产用人血浆的规定 ;

[0049] 2、血浆应无凝块,无纤维蛋白析出,无溶血等 ;

[0050] 3、血浆去除冷沉淀,凝血因子八等 ;

[0051] 4、生产设备管线器具应清洁消毒等。

[0052] 二、主要试剂配制 :

[0053] 配制平衡液含 0.08mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;

[0054] 配制洗涤液含 0.14 mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;

[0055] 配制 S/D 洗涤液含 0.05 mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;

[0056] 配制洗脱液含 2mol/L NaCl 和 0.02mol/L 柠檬酸三纳,余量为水 ;

[0057] 配制透析液含 0.01mol/L 柠檬酸三纳,余量为水,PH 在 6.8-7.2 ;

[0058] 11%S/D 配方 :110ml 吐温 -80+TNBP33ml 加水至 1L ;

[0059] 2mol/L 冰乙酸配比 :1200ml 冰乙酸至 10000ml 注射用水 ;

[0060] 0.5mol/LNaOH 配比 :200gNaOH 至 10000ml 注射用水 ;

[0061] 0.1mol/LNaOH 配比 :40gNaOH 至 10000ml 注射用水 ;

[0062] 三、本发明具体实施方式在发明内容中得以体现,发明内容可以直接用于实施例。

[0063] 制备工艺如发明内容中所述的对血浆进行吸附、洗涤、洗脱及澄清过滤 ;病毒灭活 (S/D 法) ;再吸附纯化 ;分装 ;冻干 ;干热灭活。

[0064] 在配液中加入肝素钠,按效价的 0.2 加肝素钠的量的计算方法为 :

[0065] 加入肝素钠的量 = 蛋白浓缩液总量_____(L) × 效价_____(IU/ml) × 0.2 × 1000 =

IU