

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2021年7月8日(08.07.2021)

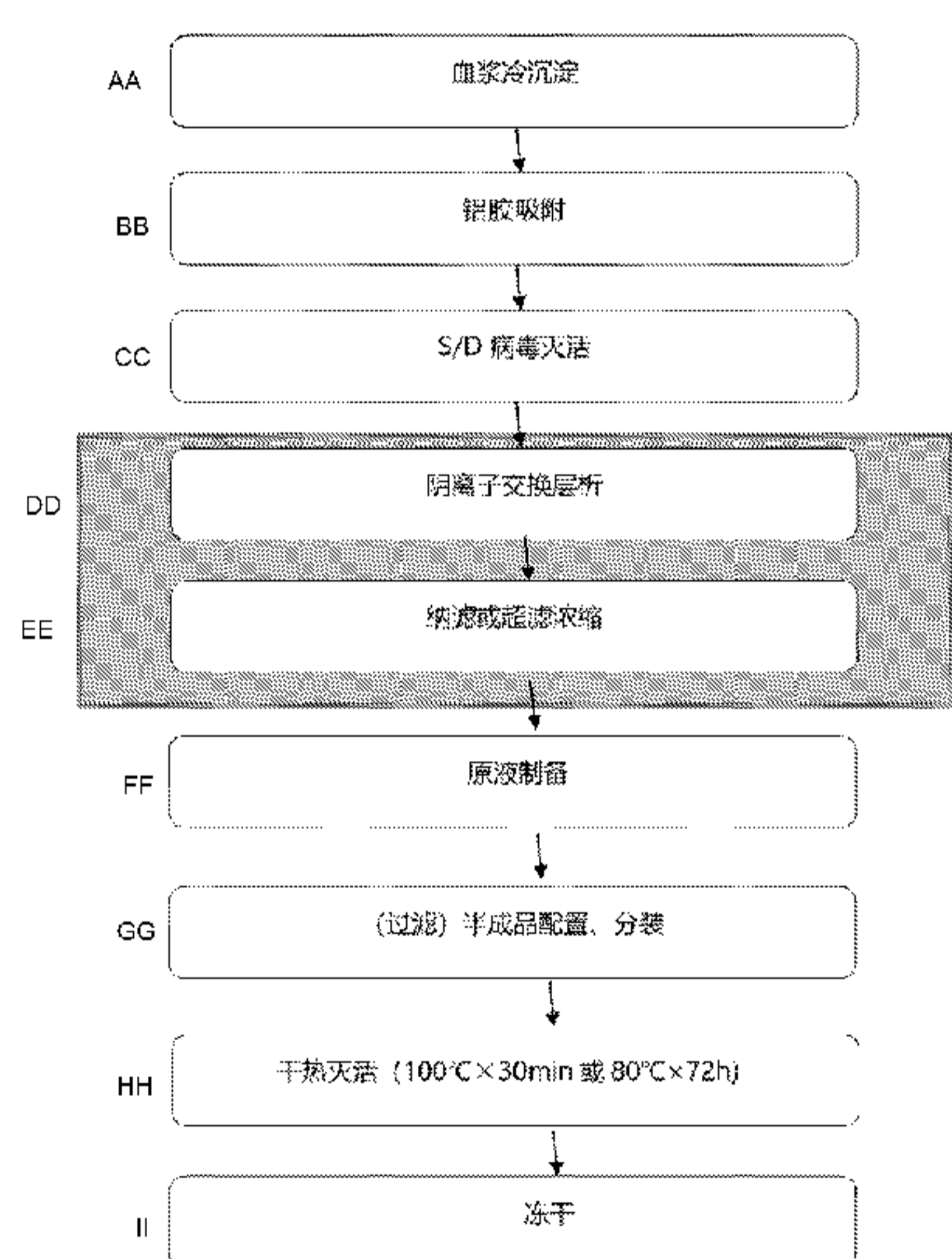


(10) 国际公布号
WO 2021/134180 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/755 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01) C07K 1/14 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/129854
- (22) 国际申请日: 2019年12月30日(30.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人: 四川远大蜀阳药业有限责任公司 (SICHUAN YUANDA SHUYANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国四川省成都市高新区中和镇姐儿垭, Sichuan 610000 (CN)。
- (72) 发明人: 冉曙光(RAN, Shuguang); 中国四川省成都市高新区中和镇姐儿垭, Sichuan 610000 (CN)。王强(WANG, Qiang); 中国四川省成都市高新区中和镇姐儿垭, Sichuan 610000 (CN)。蒋德席(JIANG, Dexi); 中国四川省成都市高新区中和镇姐儿垭, Sichuan 610000 (CN)。
- (74) 代理人: 深圳市韦恩肯知识产权代理有限公司(WAYNE INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国广东省深圳市宝安区前进二路智汇创新中心A座715室黄昌平, Guangdong 518126 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

(54) Title: METHOD FOR CRYOPRESERVING BLOOD COAGULATION FACTOR VIII INTERMEDIATE PRODUCT

(54) 发明名称: 一种凝血因子VIII中间品的冻存方法



AA Plasma cryoprecipitation
 BB Aluminum glue adsorption
 CC S/D virus inactivation
 DD Anion exchange chromatography
 EE Nanofiltration or ultrafiltration concentration
 FF Stock solution preparation
 GG (Filtration) semi-product configuration and package
 HH Dry-heating inactivation
 II Cryopreservation

(57) Abstract: The present invention relates to the field of blood products, and disclosed is a method for cryopreserving a blood coagulation factor VIII (FVIII) intermediate product. The blood coagulation FVIII intermediate product is taken from an FVIII concentrated solution or an FVIII chromatographic eluent before stock solution preparation or before ultrafiltration concentration or after ultrafiltration concentration in a preparation process of a blood coagulation FVIII preparation, and a combination or transformation thereof. Further disclosed in the present invention are use of the cryopreservation method in preparation of the blood coagulation FVIII preparation, reduction of impurity precipitation of a blood coagulation FVIII product, and improvement of long-term stability of the blood coagulation FVIII product, etc. The FVIII intermediate product is cryopreserved by means of the method of the present invention, so that it is ensured that the activity of FVIII is maintained or even improved, and the FVIII intermediate product can be prepared to a final product satisfying Chinese pharmacopoeia requirements by means of subsequent processes. The method for cryopreserving the blood coagulation FVIII intermediate product disclosed in the present invention improves the flexibility of an FVIII production process, and is favorable for productivity expansion and large-scale production of FVIII preparations.

(57) 摘要: 本发明公开了一种凝血因子VIII中间品的冻存方法, 属于血液制品领域。所述凝血因子VIII中间品取自凝血因子VIII制剂制备过程中原液制备前或超滤浓缩前或超滤浓缩后的FVIII浓缩液或FVIII层析洗脱液以及它们的组合或变形。本发明还公开了上述冻存方法在制备凝血因子VIII制剂、减少凝血因子VIII制品杂质析出、提高凝血因子VIII制品长期稳定性等方面的用途。FVIII中间品经本发明公开的方法冻存处理, 可以确保FVIII活性维持而比活性提升, 同时经后续工艺可制成符合中国药典要求的终产品。本发明公开的凝血因子VIII中间品的冻存方法增加了FVIII生产工艺的灵活性, 利于扩大产能、大规模生产FVIII制剂。

CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

一种凝血因子VIII中间品的冻存方法

技术领域

本发明属于血液制品技术领域，具体涉及凝血因子VIII中间品的冻存方法，以及包含凝血因子VIII中间品冻存方法的凝血因子VIII制剂的制备工艺。

背景技术

凝血因子VIII制剂（以下简称FVIII制剂）是防治甲型血友病人出血的特效血液制剂。甲型血友病患者输注凝血因子VIII制剂可以直接补充其血浆中的FVIII水平，从而治疗或预防出血并改善症状。甲型血友病是一种伴性遗传疾病，人群中甲型血友病的发病率约1/5000。临床表现以关节、肌肉、内脏和深部组织自发性或轻微外伤后出血难止，常在儿童期起病，反复关节出血导致患儿逐渐出现关节活动障碍而残疾。甲型血友病患者由于凝血机制缺陷，受伤后流血不止，需要输用足量的FVIII制剂。虽然FVIII制剂止血效果显著，但是在体内不能持久，再次出血需要再次输注。如果采用为患者定期输注浓缩FVIII的预防疗法，即使是重度血友病患者，也可以过上和正常人几乎一样的生活。因此，甲型血友病病人的总数虽然不多，但对FVIII制剂的需求量却很大。

凝血因子替代治疗仍然是目前血友病最有效的急性出血的止血措施，治疗原则是早期、足量、足疗程。替代治疗剂量和疗程应考虑出血部位和出血严重程度。急性出血时要按需治疗：可选基因重组FVIII制剂或者病毒灭活的血源性FVIII制剂，无条件者可选用冷沉淀或新鲜冰冻血浆，但有输血传播病毒感染风险，儿童血友病应尽量避免使用。

临床使用FVIII重组产品遇到的问题：大剂量反复使用基因重组的高纯

FVIII，抑制物即 FVIII抑制性抗体产生风险更高（SFDA. EMEA 警告重组人凝血因子VIII产生抗体的风险. 药物警戒快讯，2006, 3（3）：187），而 FVIII抑制性抗体很难自动清除，进而造成非控制性出血、住院率提高以及关节损害等，最终导致发病率和死亡率升高。而相对基因重组的高纯 FVIII，反复使用血源性 FVIII后产生 FVIII抑制性抗体的程度要低，尤其对于儿童甲型血友病患者。因此对于需要长期输注 FVIII的甲型血友病患者来说，血源性 FVIII抑制性抗体安全性更高，同时价格更低，医药负担更轻。因此，存在进一步开发优化血浆来源的人 FVIII产品工艺路线的需求，以满足甲型血友病患者对预防/治疗用药的可及性和临床用药的选择性。

酸沉淀法结合柱层析纯化法是制备血源性 FVIII的经典方法之一，其原理是：FVIII具有低温不溶解性，血浆中约 50%的 FVIII随冷沉淀而沉淀，以血浆冷沉淀为原料溶解液经铝凝胶吸附维生素 K 依赖性凝血因子，使凝血链打断，以使制造过程 FVIII不被激活而失去活性，根据纤维蛋白原（Fg）蛋白分子氨基酸残基特性，在偏酸性 pH 条件沉淀去除 Fg，同时大部分 FVIII保留在上清液中。由于受前端纯化工艺步骤处理能力的限制，FVIII制剂大规模生产存在困难。各血液制品企业面临的现实情况是，相比于静注人免疫球蛋白、人血白蛋白等产品，血液制品企业每批次血浆投浆量对应能获得的 FVIII成品产量有限，相比分装冻干等工艺步骤的处理能力，前端纯化工艺步骤比如原液除菌过滤前的工艺步骤的处理能力小很多。因此，FVIII制剂的生产规模一定程度上受制于原料血浆冷沉淀制备规模和原液除菌过滤前中间品的制备规模，但是血液制品企业又无法简单地通过加大投浆量来解决上述问题。原因在于，FVIII的生产线是基于人免疫球蛋白、人血白蛋白等重要血液制品的生产线开

发的，因此血液制品企业每批次投浆量对应能获得的 FVIII 成品产量有限；对于血液制品企业来说，生产线建成后，每批次的投浆量也即固定，未经药品监督管理部门的批准，不能随意变更生产线。通常为了扩大产能，施以平行的方式以在相同的时间内以期获得更大产能，但是这对资金、组织和基础设施都提出了更高更大的要求。综上所述，不管血液制品企业生产规模是大是小，FVIII 制剂生产工艺前后端生产规模不匹配的矛盾总是存在。

因此，一方面为了满足甲型血友病患者对预防/治疗用药的可及性和临床用药的选择性的需求，另一方面，为了解决血液制品企业扩大 FVIII 产品产能难的问题，亟需开发利于大规模生产的、可灵活应用的 FVIII 产品生产工艺。

发明内容

为解决以上技术问题，本发明提供了一种凝血因子 VIII 中间品的冻存方法，帮助灵活实现大规模生产 FVIII 制剂。

本发明是采用如下方案实现的：

一方面，本发明公开一种凝血因子 VIII 中间品的冻存方法，所述凝血因子 VIII 中间品任选自凝血因子 VIII 制剂制备过程中原液制备前或超滤浓缩前或超滤浓缩后的 FVIII 浓缩液或 FVIII 层析洗脱液以及它们的组合或变形。

当本发明所述的“FVIII 中间品”特指 FVIII 层析纯化洗脱液时。进一步地，可选 FVIII 肝素亲和层析纯化洗脱液或 FVIII 阴离子层析纯化洗脱液。

当本发明所述的“FVIII 中间品”特指原液制备前 FVIII 浓缩液时，优选原液制备前的除菌过滤前的 FVIII 浓缩液；优选原液制备前的纳米膜过滤前的 FVIII 浓缩液；优选原液制备前的超滤前的 FVIII 浓缩液。

在一种实施方式中，本发明所述的“FVIII 中间品”的变形，可以是 FVIII 层

析纯化洗脱液经过透析和/或缓冲液调节浓度后的FVIII浓缩液。进一步地，本发明所称“FVIII中间品”还可以上述FVIII浓缩液经超滤得到的FVIII超滤浓缩液。进一步地，本发明所称“FVIII中间品”还可以是上述FVIII超滤浓缩液经缓冲液调节浓度后原液配制前的样品溶液。

在一种实施方式中，本发明所述的“FVIII中间品”的变形，可以是FVIII层析纯化洗脱液经过病毒灭活后的FVIII浓缩液。

在一种实施方式中，本发明所述的“FVIII中间品”的变形，可以是添加了FVIII活性保护剂的层析纯化洗脱液。

进一步的，所述凝血因子VIII中间品的冷冻速率不低于 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，并在 $-15^{\circ}\text{C}\sim-196^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存。

进一步的，所述冷冻速率是 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

更进一步的，所述冷冻速率是 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

更进一步的，所述冷冻速率是 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

在一种具体地实施方式中，所述冷冻速率是 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

进一步的，所述凝血因子VIII中间品在 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存。

更进一步的，所述凝血因子VIII中间品在 $-20^{\circ}\text{C}\sim-55^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存。

进一步的，凝血因子VIII中间品使用液氮或干冰储存。

上述凝血因子VIII制剂中间品的比活性为： $\geq 1\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 10\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 50\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 70\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 100\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 200\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 1000\text{IU}/\text{mg}$ 。

所述凝血因子VIII制剂中间品的溶液的pH为6.5-7.5。

另一方面，本发明提供一种包含上述凝血因子VIII制剂中间品的冻存方法的凝血因子VIII制剂的制备工艺。

再一方面，本发明提供一种减少凝血因子VIII制品杂质析出的方法，所述方法包括在凝血因子VIII制品制备过程中，按上所述冻存方法对凝血因子VIII中间品进行冻存。

再一方面，本发明提供一种提高凝血因子VIII制品长期稳定性的方法，所述方法包括在凝血因子VIII制品制备过程中，按上所述冻存方法对凝血因子VIII中间品进行冻存。

再一方面，本发明提供根据上述方法制备得到的产品。

进一步的，所述产品是FVIII制剂或FVIII和vWF的复合物。

本发明取得的有益技术效果：

在本发明中，将FVIII中间品溶液在不低于1°C/min的冻存速率冻结，并在-15°C~-196°C的条件下长期冻存。试验结果证实，FVIII中间品经本发明公开的方法冻存处理，可以确保FVIII活性维持不变而比活性提升。进一步地，本发明的FVIII中间品冻存方法能一定程度上提高FVIII中间品稳定性。

冻存后的凝血因子VIII制剂中间品溶液可进一步作为FVIII后续生产工艺原液及成品制备用原料，用于制备符合2015版《中国药典》要求的合格FVIII成品。对FVIII成品的稳定性考察结果证明：上述FVIII成品在2~8°C条件下冷藏，48个月内性能稳定。

综上所述，在保证FVIII活性回收率和比活回收率不降低的前提下，在不牺牲FVIII制剂长期保存稳定性的前提下，本发明公开的凝血因子VIII制剂中间品溶液的冻存方法增加了FVIII生产工艺的灵活性，利于扩大产能，大规模生产FVIII制剂。

附图说明

图 1 为一种 FVIII 成品制备工艺流程图, 阴影区域为可制得本发明所称“凝血因子 VIII 中间品”的工艺步骤。

具体实施方式

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白, 以下结合具体实施例, 对本发明进行进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

如本领域技术人员普遍知晓的行业公知, 血源 FVIII 产品当前产业化生产采用的工艺或者进一步开发优化的工艺都是连续不间断进行的。因为血清中 FVIII 含量甚微 (0.05-0.1mg/L), 而且体外极不稳定, FVIII 制剂或纯化中间品溶液在室温条件下活性损失非常严重, 所以在工业化生产规模, FVIII 制剂的生产从原料血浆冷沉淀制备开始到病毒灭活结束, 所有工序必须连续不间断进行, 即便在实验室级别科学家们经常为了试验方便随时冻存各纯化阶段的蛋白质样品。而且储存不同批次的纯化中间产物并将不同批次的相当量的纯化中间产物合并进行后续 FVIII 制剂生产的工艺设计是不被药品监管部门认可的, 因为中间品冻存再融化会引起 FVIII 活性降低 (Stability of von Willebrand factor and factor VIII in canine cryoprecipitate under various conditions of storage. Stokol T et al. Res Vet Sci. (1995)), 进而直接影响成品效价和质量。导致这一不利后果的可能的原因是: 蛋白质溶液在冷冻过程中会形成小的冰晶和相对大的冰-液界面表面积, 这会增加蛋白质分子暴露在冰-液界面的程度, 从而增加蛋白质变性失活的风险; 而在解冻过程中, 蛋白溶液的再结晶进一步使暴露在冰-液界面的蛋白质分子面临大的表面张力或机械剪切力, 从而加剧损害 (Effect of freezing and

thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions, *Biotechnology and Bioengineering*, VOL. 82, NO. 6, JUNE 20, 2003).

进一步地，专利文献、其他科技文献以及本领域工具书（比如刘隽湘主编的《输血疗法与血液制剂》）中公开或记载的 FVIII 产品的生产工艺中，均未见对 FVIII 中间品进行冻存处理这一步骤的描述或介绍。比如国内血液制品公司泰邦在专利 CN108218981A 中公开了一种 FVIII 的制备方法，具体方法如下：以血浆冷沉淀为原料，经溶解后经酸沉淀、DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附、S/D 病毒灭活、TOYOPEARL DEAE-650M 凝胶柱层析、超滤、半成品及成品制备得到 FVIII 成品。再比如华兰生物在专利 CN107880112A 中公开的 FVIII 的制备方法如下：以血浆冷沉淀为原料，用氨丁三醇溶液溶解后经聚乙二醇沉淀、S/D 病毒灭活、Toyopearl DEAE 650M 凝胶柱层析、超滤、半成品及成品制备得到 FVIII 成品。武汉血液制品有限公司在专利 CN107337727A 中公开的 FVIII 的制备方法如下：以血浆冷沉淀为原料，溶解后经 PEG 沉淀及病毒灭活得初提原液、阴离子交换层析得精提原液、超滤透析得纯化液、冻干、干热灭活及包装得到 FVIII 成品。上述血液制品公司公开的 FVIII 制剂的生产工艺均不包括对 FVIII 中间品进行冻存处理的步骤。

发明人经过长期大量生产实践发现，生产规模下，通过对 FVIII 中间品冻存条件的特殊控制，可以达到 FVIII 活性回收率、比活回收率基本无损失的预料不到的技术效果。同时，发明人意外观察到，上述 FVIII 中间品溶液经低温冻存处理后，室温存放可见异物析出程度降低，进一步检测经冻存处理的 FVIII 中间品溶液在室温存放 24 小时后的 FVIII:C 活性大小发现，FVIII 活性损失减缓，室温稳定性显著提高。

本发明公开的 FVIII中间品的冻存方法，其冻存速率不低于 1°C/min，优选 1°C/min~10°C/min，较优选 1°C/min~3°C/min，较优选 1.5°C/min~3°C/min。当 FVIII中间品完全冻结后，冻存温度至少应能保持 FVIII中间品处于完全冻结状态。本发明公开的 FVIII中间品在上述条件下冻结后在-15°C~-196°C的条件下储存，优选-20°C~-80°C，较优选-20°C~-55°C。

在一些具体的实施方式中，FVIII中间品冻结后使用液氮或干冰储存。

在一些实施例中，FVIII中间品的冻存时间可以是 0~24 个月或更长。

在一些情况下，FVIII中间品的比活性 (IU/mg) ≥ 1 IU/mg，在另一些情况下，FVIII中间品的比活性 (IU/mg) ≥ 10 IU/mg 或 ≥ 50 IU/mg 或 ≥ 70 IU/mg 或 ≥ 100 IU/mg 或 ≥ 200 IU/mg 或 ≥ 1000 IU/mg。

在一些实施例中，FVIII制剂中间品的溶液的 pH 为 6.5-7.5。在一些更具体地实施例中，FVIII中间品的缓冲液可以是含一种或多种氨基酸的缓冲液，缓冲液任选枸橼酸钠缓冲液、磷酸缓冲液、Tris 缓冲液等。因为 FVIII与血管性血友病因子复合物的等电点为 5.5~6.0，当 pH 在 6.5~7.5 时 FVIII与血管性血友病因子复合物带负电，适合通过阴离子层析进一步精制 FVIII；同时 pH 为 6.5-7.5 的偏中性条件有助于保护 FVIII活性。

进一步地，本发明公开的 FVIII中间品的冻存方法，其冻存效果受其他前序工艺步骤的影响较小。冻存后的 FVIII中间品融化后，再经过滤、半成品配制、除菌、分装、冻干、干热灭活等工艺步骤，可制备得到符合 2015 版《中国药典》规定的合格 FVIII制剂。

本发明所称的“FVIII制剂”也可称之为“抗血友病球蛋白制剂”。

本发明所称的“FVIII制剂的制备工艺”为 FVIII制剂的整个生产工艺。本发

明实施例所要突出的 FVIII 中间品的冻存方法可以是 FVIII 制剂整体生产工艺中的一个环节。

现有技术中，FVIII 生产工艺从血浆冷沉淀开始，经凝胶吸附、病毒灭活以及层析等多个步骤制得 FVIII 中间产品，FVIII 中间产品进一步经配制分装后进行冻干或其他病毒灭活工艺即得 FVIII 制剂成品。通常包括多个具体步骤：制备血浆冷沉淀，将冷沉淀溶解，得溶解液；将溶解液通过调节 pH 进行酸沉淀，并滤去沉淀部分，得上清液；将上清液进行凝胶吸附；将凝胶吸附后的流穿液进行病毒灭活、层析、超滤、除菌等工艺步骤，并经分批、分装、冻干、干热病毒灭活等步骤最终制得 FVIII 成品。

为实现本发明，一种基本的 FVIII 制备工艺路线为：制备血浆冷沉淀；将血浆冷沉淀溶解，得溶解液；将溶解液通过调节 pH 进行预沉淀，并滤去沉淀部分，得上清液；将上清液通过平衡过的凝胶吸附；将凝胶吸附后得的上清液经进行病毒灭活、层析、超滤、除菌等工艺步骤，并经分批、分装、冻干，干热病毒灭活等步骤最终制得 VIII 成品。

为实现本发明，一种可选基本的 FVIII 制备工艺路线为：制备血浆冷沉淀；将血浆冷沉淀溶解，得溶解液；将溶解液通过平衡过的凝胶吸附；将凝胶吸附后得的上清液经进行病毒灭活、层析、超滤、除菌等工艺步骤，并经分批、分装、冻干，干热病毒灭活等步骤最终制得 VIII 成品。

为实现本发明，一种可选的基本的 FVIII 制备工艺路线为：制备血浆冷沉淀；Tris 缓冲液溶解冷沉淀，经聚乙二醇沉淀后，0.3% 磷酸三丁酯和 1% Tween 80 处理 6h 以灭活脂包膜病毒，然后经 DEAE 650M 层析纯化。绝大部分杂蛋白和磷酸三丁酯及 Tween80 随流穿液直接流穿，洗脱液即为人凝血因

子VIII中间品(参考文献《人凝血因子VIII原液生产工艺放大可行性研究》公开)。

除非特别说明,如图1所示,本发明所称的“FVIII中间品”是指原液制备前或超滤浓缩前或超滤浓缩后的FVIII浓缩液,或FVIII层析纯化洗脱液。

当本发明所称的“FVIII中间品”特指FVIII层析纯化洗脱液时,可选FVIII肝素亲和层析纯化洗脱液或FVIII阴离子层析纯化洗脱液。优选FVIII阴离子层析纯化洗脱液。因为FVIII与血管性血友病因子复合物的等电点为5.5~6.0,当pH在6.5~7.5时复合物带负电;同时偏中性条件有助于保护FVIII活性,所以较优选阴离子层析纯化FVIII。通常的可选的阴离子层析介质包括但不限于:DEAE Sephadex A-50、TOYOPEARL DEAE-650M、DEAE 650、Q-sepharose-FF、DEAE-SAPHROSEFF、DEAE-FractogelTSK650M、DEAE SepharoseTSK650M、DEAESepharoseFF、CaptoDEAE、QsepharoseFF、CaptoQ及QSepharoseHP等。如果需要的话,可以使用阴离子交换层析膜替代阴离子交换色谱基质。市售的阴离子交换膜包含,但不限于,来自Sartorius的Sartobind™ Q,来自Pall Technologies的Mustang™ Q,来自Millipore的Intercept™ Q。

当本发明所称的“FVIII中间品”特指原液制备前FVIII浓缩液时,优选原液制备前的除菌过滤前的FVIII浓缩液,优选原液制备前的纳米膜过滤前的FVIII浓缩液。

在一种实施方式中,所述FVIII中间品可以通过血浆冷沉淀制备并随后用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 凝胶吸附、离心去除不容物上清液经DEAE Sephadex A-50凝胶吸附纯化得到的FVIII层析纯化洗脱液。

在一种实施方式中,所述FVIII中间品可以通过血浆冷沉淀制备并随后通过酸沉淀、DEAE Sephadex A-50凝胶吸附、离心去除不容物上清液经

TOYOPEARL DEAE-650M 凝胶吸附纯化得到的 FVIII 层析纯化洗脱液。

在一种实施方式中，所述 FVIII 中间品可以通过血浆冷沉淀制备并随后用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 凝胶吸附、离心去除不溶物上清液经 S/D 病毒灭活、DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附纯化得到的 FVIII 层析纯化洗脱液。

在一种实施方式中，所述 FVIII 中间品可以通过血浆冷沉淀制备并随后用中性 pH 缓冲液溶解后用的 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 凝胶 (W/V) 吸附、离心去除不溶物、上清液经 S/D 处理、再经阴离子凝胶 (Fractogel TMAE 650) 吸附纯化、洗脱液在糖和氨基酸保护下 63°C 加热 10hr 再次经第二次阴离子凝胶柱层析去除稳定剂所得 FVIII 层析纯化洗脱液。

在一种实施方式中，所述 FVIII 中间品可以通过血浆冷沉淀制备并随后用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 凝胶吸附、甘氨酸沉淀、NaCl 沉淀、缓冲液调节浓度后原液配制前的样品溶液。

在一种实施方式中，所述 FVIII 中间品可以通过血浆冷沉淀制备并随后用 PEG 分级沉淀、肝素亲和凝胶 (比如 Heparin Sepharose[®] 6 FF) 吸附纯化得到的 FVIII 层析纯化洗脱液。

进一步的，本发明所称“FVIII 中间品”还可以是上述 FVIII 层析纯化洗脱液经过透析和/或缓冲液调节浓度后的 FVIII 浓缩液。进一步地，本发明所称“FVIII 中间品”还可以是上述 FVIII 浓缩液经超滤得到的 FVIII 超滤浓缩液。进一步地，本发明所称“FVIII 中间品”还可以是上述 FVIII 超滤浓缩液经缓冲液调节浓度后原液配制前的样品溶液。

一种本发明所称的“FVIII 中间品的变形”可以是 FVIII 层析纯化洗脱液经过病毒灭活后的 FVIII 浓缩液。也可以是添加了 FVIII 活性保护剂的层析纯化洗

脱液。所述的 FVIII 活性保护剂任选糖类、氨基酸类。

本实施例中所述“FVIII 中间品”还可以是其他可以实现 FVIII 制剂制备的工艺流程中所得到的原液制备前或超滤浓缩前或超滤浓缩后的 FVIII 浓缩液或 FVIII 层析纯化洗脱液，在此不一一穷举。

以下结合具体的实施例对 FVIII 中间品的冻存方法加以说明。

实施例 1

发明人首先考察了 FVIII 层析纯化洗脱液液氮速冻、低温(-196℃至-15℃) 储存前后 FVIII:C 活性回收率的变化。

FVIII 层析纯化洗脱液制备：以血浆冷沉淀为原料，溶解后经酸沉淀、DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附、S/D 病毒灭活、TOYOPEARL DEAE-650M 凝胶柱层析制备得到 FVIII 层析纯化洗脱液。检测 FVIII 层析纯化洗脱液的 FVIII:C 活性大小。

将制得的 FVIII 层析纯化洗脱液分成多个平行样品在液氮中冻结，并分别在-196℃、-80℃、-60℃、-40℃、-20℃、-15℃储存 12 个月后，室温水浴融化，检测 FVIII:C 活性大小，计算活性回收率。

FVIII:C 活性回收率检测结果如表 1 所示：FVIII 层析纯化洗脱液液氮冻结后低温(-196℃至-15℃) 保存 12 个月，活性无损失。

表 1 实施例 1 FVIII 纯化洗脱液冻存前后 FVIII:C 活性回收率

储存温度	FVIII 纯化洗脱液冻储存时间 (月)		
	0	1	12
-196℃	100	125.34	118.97
-80℃	100	105.36	104.83
-60℃	100	109.24	120.73
-40℃	100	110.85	117.52
-20℃	100	107.16	118.54

发明人将上述 6 个经过冻存的 FVIII 纯化洗脱液样品室温水浴融化后超滤，室温放置 2 小时后，肉眼观察意外发现无可见异物析出（可见异物检查法参考 2015 版 2015 版《中国药典》进行）。而此前，发明人多次试验观察到，不经冻存处理的 FVIII 层析纯化洗脱液样品超滤后如果在室温放置 2 个小时，可肉眼明显地观察到可见异物析出。

进一步地，发明人将上述样品继续在室温放置至 24 个小时，检测 FVIII:C 活性大小，以考察 FVIII:C 活性回收率的变化。

检测结果如表 2 显示：与未经液氮冷冻低温储存的样品相比，FVIII 纯化洗脱液经低温冻存处理后，室温存放 24 小时活性损失显著降低，稳定性提高。

表 2 实施例 1 FVIII 纯化洗脱液低温冻存后室温放置 24 小时活性回收率

低温储存温度	24 小时
-196℃	49.31%
-80℃	54.93%
-60℃	61.86%
-40℃	57.47%
-20℃	54.87%
未经低温冻存样品	17.12%

进一步地，发明人考察了不同冷冻条件对 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液活性回收率、室温条件下的稳定性的影响以及对最终制得的 FVIII 成品质量的影响。

实施例 2

FVIII 层析纯化洗脱液制备：以血浆冷沉淀为原料，溶解后经酸沉淀、DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附、S/D 病毒灭活、TOYOPEARL DEAE-650M 凝胶柱层析制备得到 FVIII 层析纯化洗脱液。检测 FVIII 层析纯化洗脱液的蛋白含量及 FVIII:C 活性大小，计算得到 FVIII 层析纯化洗脱液的比活性为 (IU/mg) = 257 IU/mg。

FVIII层析纯化洗脱液冻存：以 1°C/min 的速率冻结，并在-30°C~-45°C 冻存 12 个月。

FVIII成品制备：室温水浴融化冻存的 FVIII层析纯化洗脱液，将融化后的 FVIII层析纯化洗脱液超滤、除菌过滤。除菌过滤后按成品规格配制，并加入稳定剂 100mM 的甘氨酸。分装、冻干，密封出柜，冻干制品干热灭活（100°C × 30min 或 80°C × 72h）后包即得 FVIII成品。

超滤透析液为：50mmol/L 氯化钠，20mmol/L 枸橼酸钠，1mmol/L 氯化钙，7g/L 白蛋白，35g/L 盐酸精氨酸；pH 7.0。

实施例 3

FVIII层析纯化洗脱液制备：以血浆冷沉淀为原料，用氨丁三醇溶液溶解后经聚乙二醇沉淀、S/D 病毒灭活、ToyopearlDEAE 650M 凝胶柱层析制备得到 FVIII层析纯化洗脱液。检测 FVIII层析纯化洗脱液的蛋白含量及 FVIII:C 活性大小，计算得到 FVIII层析纯化洗脱液的比活性为（IU/mg）=151 IU/mg。

FVIII层析纯化洗脱液冻存：以 10°C/min 的速率冻结，并在-60°C~-45°C 冻存 12 个月。

FVIII成品制备：室温水浴融化冻存的 FVIII层析纯化洗脱液，将融化后的 FVIII层析纯化洗脱液超滤、除菌过滤。除菌过滤后按成品规格配制，并加入稳定剂 10mM 的甘氨酸。分装、冻干，密封出柜，冻干制品干热灭活（100°C × 30min 或 80°C × 72h）后包即得 FVIII成品。

超滤透析液为：50mmol/L 氯化钠，6mmol/L 枸橼酸钠，1mmol/L 氯化钙，6.7g/L 白蛋白，35g/L 盐酸精氨酸；pH 6.5。

实施例 4

FVIII层析纯化洗脱液制备：以血浆冷沉淀为原料，溶解后经 PEG 沉淀、S/D 病毒灭活、ToyopearlDEAE 650M 凝胶柱层析制备得到 FVIII层析纯化洗脱液。检测 FVIII层析纯化洗脱液的蛋白含量及 FVIII:C 活性大小，计算得到 FVIII层析纯化洗脱液的比活性为 (IU/mg) =85 IU/mg。

FVIII层析纯化洗脱液冻存：以 1.5°C/min 的速率冻结，干冰冻存 12 个月。

FVIII成品制备：室温水浴融化冻存的 FVIII层析纯化洗脱液，将融化后的 FVIII层析纯化洗脱液超滤、除菌过滤。除菌过滤后按成品规格配制，并加入稳定剂 20mM 的甘氨酸。分装、冻干，密封出柜，冻干制品干热灭活 (100°C × 30min 或 80°C × 72h) 后包即得 FVIII成品。

超滤透析液为：50mmol/L 氯化钠，20mmol/L 枸橼酸钠，1mmol/L 氯化钙，7g/L 白蛋白，35g/L 盐酸精氨酸；pH 7.2。

实施例 5

FVIII层析纯化洗脱液制备：以血浆冷沉淀为原料溶解后，经 DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附、S/D 病毒灭活、TOYOPEARL DEAE-650M 凝胶柱层析制备得到 FVIII层析纯化洗脱液。检测 FVIII层析纯化洗脱液的蛋白含量及 FVIII:C 活性大小，计算得到 FVIII层析纯化洗脱液的比活性为 (IU/mg) =54 IU/mg。

FVIII层析纯化洗脱液冻存：以 3°C/min 的速率冻结，并在 -20°C ~ -30°C 冻存 12 个月后，室温水浴融化 FVIII层析高纯度洗脱液。

FVIII成品制备：室温水浴融化冻存的 FVIII层析纯化洗脱液，将融化后的 FVIII层析纯化洗脱液超滤、除菌过滤。除菌过滤后按成品规格配制，并加入稳定剂 200mM 的甘氨酸。分装、冻干，密封出柜，冻干制品干热灭活 (100°C

×30min 或 80℃×72h) 后包即得 FVIII 成品。

超滤透析液为: 50mmol/L 氯化钠, 20mmol/L 枸橼酸钠, 1mmol/L 氯化钙, 7g/L 白蛋白, 35g/L 盐酸精氨酸; pH 7.0。

实施例 6~9

实施例 6~9 的所采用的冻存样品分别取自实施例 1~4 FVIII 纯化洗脱液的超滤浓缩液。超滤浓缩液的制取方法为, 将 FVIII 纯化洗脱液经过截流分子量 10~30KD 超滤膜透析浓缩, 得到 FVIII 超滤浓缩液。

其冻存条件同实施例 2~5, 及合批后的透析浓缩、除菌、半成品配制、分装、冻干、干热灭活步骤同实施例 2~5。

超滤浓缩后的 FVIII 中间品 FVIII:C 值如下:

实施例 6 冻存条件: 冻存液 FVIII:C 111 IU/mL。

实施例 7 冻存条件: 冻存液 FVIII:C 98 IU/mL。

实施例 8 冻存条件: 冻存液 FVIII:C 73 IU/mL。

实施例 9 冻存条件: 冻存液 FVIII:C 52 IU/mL。

对比例 1

对比例 1 与实施例 2 的区别在于: TOYOPEARL DEAE-650M 凝胶柱层析制备得到 FVIII 层析纯化洗脱液后直接进入 FVIII 成品步骤, 不包括 FVIII 层析纯化洗脱液冻存步骤。

其他工艺 FVIII 纯化工艺和成品制备工艺参考实施例 2, 制备 FVIII 成品。

以下为实施例 2~9 FVIII 中间品冻存前后及制备得到的成品的各项指标对比。

1、不同冷冻条件对 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液活性回收率的影响

检测实施例 2~9 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液冻存前后蛋白浓度及 FVIII:C 活性，计算活性回收率及比活回收率。检测结果见表 3。

试验结果表明：

实施例 2~9 的凝血因子 VIII 中间品以 1°C/min 及以上的速率冻结，并在 -20°C~-60°C 冻存 12 个月后，活性回收率未见降低，FVIII:C 活性得以维持。

实施例 2~9 的凝血因子 VIII 中间品以 1°C/min 及以上的速率冻结，并在 -20°C~-60°C 冻存 12 个月后，比活回收率未见降低，FVIII:C 比活性得到提升。

以上试验结果表明：本发明的 FVIII 中间品冻存方法对 FVIII:C 活性回收率、比活回收率基本无影响，可以确保 FVIII 活性维持而比活性提升。

表 3 实施例 2~9 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液冻存前后活性回收率及比活回收率

实施例	储存时间 (月)	0	1	3	6	12
实施例 2	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	103.06	97.22	102.50	108.84
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	103.07	97.22	102.51	108.84
实施例 3	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	113.25	104.85	115.99	111.26
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	113.26	102.71	113.62	110.26
实例例 4	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	110.33	103.00	112.45	110.98
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	112.67	105.19	117.33	111.15
实施例 5	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	99.30	100.00	99.30	99.30
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	100.00	101.69	101.71	110.26
实施例 6	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	109.55	101.61	110.98	110.31
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	109.66	101.71	111.15	111.15
实施例 7	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	121.42	117.36	124.49	111.60
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	106.96	107.33	107.62	n.t
实施例 8	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	111.60	106.15	124.58	n.t
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	102.12	102.47	108.14	n.t
实施例 9	相对 0 月活性回收率 (%)	100.00	112.54	107.76	119.89	n.t
	相对 0 月比活回收率 (%)	100.00	103.86	101.66	105.65	n.t

2、不同冷冻条件对 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液室温条件下的稳定性影响

将实施例 2~9 经过冻存处理后的 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液样品室温水浴融化后超滤，室温放置 24 小时后检测其 FVIII:C 活性。同时，将实施例 2~9 未经过冻存处理的 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液超滤，室温放置 24 小时后检测其 FVIII:C 活性。对比两组试验结果，具体见表 4。

试验结果表明：FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液经实施例 2~9 的方法冻存处理后，室温存放 24 小活性损失显著降低，室温存放稳定性提高。

表 4 实施例 2~9 低温冻存处理对 FVIII 纯化洗脱液室温存放活性回收率影响

实施例	经低温冻存处理	未经低温冻存处理
实施例 2	64.54%	19.90%
实施例 3	67.62%	21.31%
实施例 4	61.44%	28.37%
实施例 5	58.21%	23.48%
实施例 6	66.13%	18.21%
实施例 7	67.51%	22.54%
实施例 8	68.27%	26.66%
实施例 9	67.32%	27.41%

3、不同冷冻条件对 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液最终制得的 FVIII 成品质量的影响

按 2015 版《中国药典》的规定，全检实施例 2~9 制得的 FVIII 成品的各项指标，尤其关注检测可见异物。检测结果见表 5。

检测结果表明：

实施例 2~9 制得的 FVIII 成品符合 2015 版《中国药典》对 FVIII 制剂的各项规定，尤其是可见异物检测结果符合《中国药典》规定。实施例 2~9 所得 FVIII 成品与对比例 1 所得成品质量检测结果无差异。

以上检测结果进一步证明：本发明冻存方法处理的 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液可以作为 FVIII 后续生产工艺原液及成品制备用原料。

表 5 实施例 2~9 制得的 FVIII 成品主要质量指标检测结果

实施例	FVIII 比活(IU/mg)	可见异物（注射剂）	按中国药典成品检定项全检结果
实施例 2	131	合格	合格
实施例 3	115	合格	合格
实施例 4	76	合格	合格
实施例 5	60	合格	合格
实施例 6	137	合格	合格
实施例 7	117	合格	合格
实施例 8	78	合格	合格
实施例 9	61	合格	合格
对比例 1	108	合格	合格

4、实施例 2~9 制得的 FVIII 成品长期稳定性考察

将实施例 2~9 制得的 FVIII 成品在 2~8℃ 条件下冷藏 48 个月，并按 2015 版《中国药典》的规定，全检 FVIII 成品的各项指标。检测结果见表 6。

检测结果显示：用经过冻存的 FVIII 纯化洗脱液/FVIII 超滤浓缩液制备得到的 FVIII 成品在 2~8℃ 条件下冷藏，48 个月内性能稳定。实施例 2~9 所得 FVIII 成品可异物合格率优于对比例 1。

实施例 2~9 所得 FVIII 成品与对比例 1 所得成品质量检测结果无差异。

表 6 实施例 2~9 制得的 FVIII 成品长期保存稳定性

实施例	FVIII 活性回收率(%)	可见异物（注射	按中国药典成
-----	----------------	---------	--------

		剂)	品检定项全检结果
实施例 1	117	合格	合格
实施例 3	104	合格	合格
实施例 4	111	合格	合格
实施例 5	111	合格	合格
实施例 6	98	合格	合格
实施例 7	97	合格	合格
实施例 8	111	合格	合格
实施例 9	114	合格	合格
对比例 1	108	不合格	合格

以上试验结果证明：

FVIII中间品经本发明公开的方法冻存处理，FVIII活性维持而比活性提升。同时本发明的 FVIII中间品冻存方法能一定程度上提高 FVIII中间品室温存放稳定性。

用本发明公开的冻存工艺冻存后的凝血因子VIII制剂中间品可用于制备合格的 FVIII成品。稳定性考察数据证明用经过冻存的 FVIII中间品制备得到的 FVIII成品在 2~8℃条件下冷藏，48 个月内性能稳定。

以上内容仅仅为本发明的较佳实施例，对于本领域的普通技术人员，依照本发明的思路，在具体实施例方式及其应用范围上均会有所改变之处，本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

权利要求书

1、一种凝血因子VIII中间品的冻存方法，其特征在于，所述凝血因子VIII中间品任选凝血因子VIII制剂制备过程中原液制备前或超滤浓缩前或超滤浓缩后的FVIII浓缩液或FVIII层析洗脱液以及它们的组合或变形进行冻存。

2、根据权利要求1所述的凝血因子VIII中间品的冻存方法，其特征在于，所述凝血因子VIII中间品的冷冻速率不低于 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ，并在 $-15^{\circ}\text{C}\sim-196^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存。

3、根据权利要求2所述的凝血因子VIII中间品的冻存方法，其特征在于，所述冷冻速率是 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ；

优选的，所述冷冻速率是 $1^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ；

优选的，所述冷冻速率是 $1.5^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 。

4、根据权利要求2所述的凝血因子VIII中间品的冻存方法，其特征在于，所述凝血因子VIII中间品在 $-20^{\circ}\text{C}\sim-80^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存；

优选的，所述凝血因子VIII中间品在 $-20^{\circ}\text{C}\sim-55^{\circ}\text{C}$ 的条件下储存；

优选的，所述凝血因子VIII中间品使用液氮或干冰储存。

5、根据权利要求1~4任一所述的凝血因子VIII中间品的冻存方法，其特征在于，所述凝血因子VIII中间品的比活性为： $\geq 1\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 10\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 50\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 70\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 100\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 200\text{IU}/\text{mg}$ 或 $\geq 1000\text{IU}/\text{mg}$ 。

6、根据权利要求1~4任一所述的凝血因子VIII中间品的冻存方法，其特征在于，所述凝血因子VIII中间品的溶液的pH为6.5-7.5。

7、一种包含权利要求1~6任一所述的凝血因子VIII中间品的冻存方法的凝血因子VIII制剂的制备工艺。

8、一种减少凝血因子VIII制品杂质析出的方法，其特征在于，在凝血因

子VIII制品制备过程中，根据权利要求 1~6 任一所述的冻存方法对凝血因子VIII中间品进行冻存。

9、一种提高凝血因子VIII制品长期稳定性的方法，其特征在于，在凝血因子VIII制品制备过程中，根据权利要求 1~6 任一所述的冻存方法对凝血因子VIII中间品进行冻存。

10、由权利要求 1-9 的方法制备的产品。

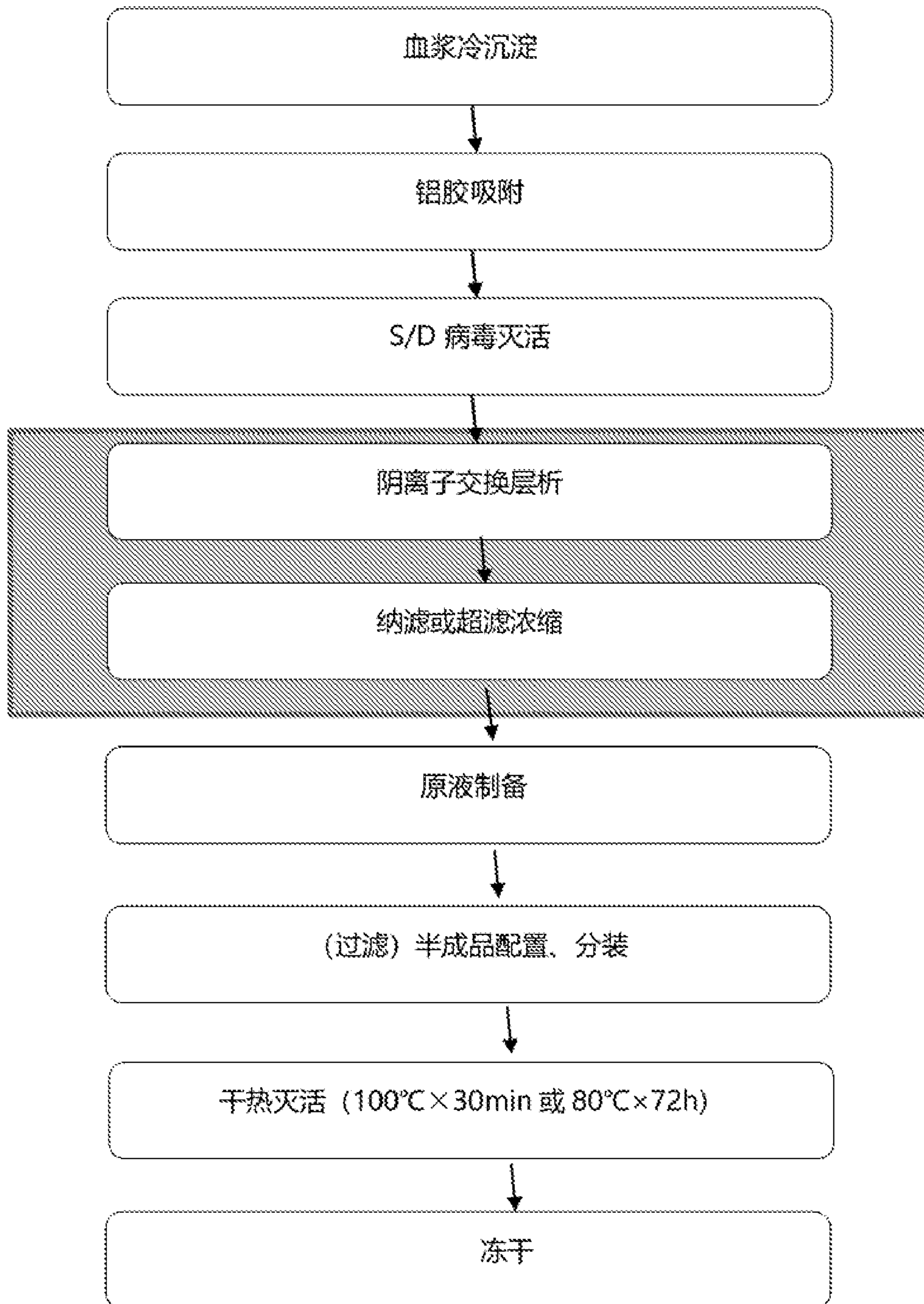


图 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/129854**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 14/755(2006.01)i; C07K 1/36(2006.01)i; C07K 1/34(2006.01)i; C07K 1/14(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNTXT; VEN; WOTXT; USTXT; EPTXT; CNKI; STN; 万方; WANFANG; ISI_Web of Science: 甲型血友病, 凝血因子, 抗血友病球蛋白, 抗血友病因子, 人凝血八因子, 冰冻保存, 冻存, 冷沉淀, 纯化, 冉曙光, 远大蜀阳, 成都蜀阳, 王强, 蒋德席, 黄亮, 杨德军, 李兴旺, freez+, cryopreservation, frozen+, factor VIII, storage, hemophilia A, antihemophilic globulin, AHG, human coagulation factor, heparin, blood coagulating factor VIII, cryopreci+, cryoprecipitate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 105348382 A (SHANGHAI ZHOUYUE BIOLOGICAL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 February 2016 (2016-02-24) the abstract, and claim 1	10
X	CN 105294858 A (SHANGHAI ZHOUYUE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 February 2016 (2016-02-03) claim 1	10
X	CN 108976297 A (GUANGDONG SHUANGLIN BIO-PHARMACY CO., LTD.) 11 December 2018 (2018-12-11) claims 1-9	10
X	CN 107337727 A (SINOPHARM WUHAN BLOOD PRODUCT CO., LTD.) 10 November 2017 (2017-11-10) claims 1-7	10
X	CN 104231073 A (GUANGDONG SHUANGLIN BIO-PHARMACY CO., LTD.) 24 December 2014 (2014-12-24) claims 1-10	10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 August 2020

Date of mailing of the international search report

16 September 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/129854

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015143696 A1 (CHENGDU RONGSHENG PHARMACEUTICALS CO., LTD.) 01 October 2015 (2015-10-01) entire document	1-10
A	CN 105348382 A (SHANGHAI ZHOUYUE BIOLOGICAL SCIENCE & TECHNOLOGY CO., LTD.) 24 February 2016 (2016-02-24) the abstract, and claim 1	1-9
A	CN 105294858 A (SHANGHAI ZHOUYUE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 03 February 2016 (2016-02-03) claim 1	1-9
A	CN 108976297 A (GUANGDONG SHUANGLIN BIO-PHARMACY CO., LTD.) 11 December 2018 (2018-12-11) claims 1-9	1-9
A	CN 107337727 A (SINOPHARM WUHAN BLOOD PRODUCT CO., LTD.) 10 November 2017 (2017-11-10) claims 1-7	1-9
A	CN 104231073 A (GUANGDONG SHUANGLIN BIO-PHARMACY CO., LTD.) 24 December 2014 (2014-12-24) claims 1-10	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/129854

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	105348382	A	24 February 2016	None	
CN	105294858	A	03 February 2016	None	
CN	108976297	A	11 December 2018	None	
CN	107337727	A	10 November 2017	None	
CN	104231073	A	24 December 2014	CN 104231073 B	25 January 2017
WO	2015143696	A1	01 October 2015	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/129854

A. 主题的分类

C07K 14/755(2006.01)i; C07K 1/36(2006.01)i; C07K 1/34(2006.01)i; C07K 1/14(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS;CNTXT;VEN;WOTXT;USTXT;EPTXT;CNKI;STN;万方;ISI_Web of Science; 甲型血友病, 凝血因子, 抗血友病球蛋白, 抗血友病因子, 人凝血八因子, 冰冻保存, 冻存, 冷沉淀, 纯化, 再曙光, 远大蜀阳, 成都蜀阳, 王强, 蒋德席, 黄亮, 杨德军, 李兴旺, freez+, cryopreservation, frozen+, factor VIII, storage, hemophilia A, anti-hemophilic globulin, AHG, human coagulation factor, heparin, blood coagulating factor VIII, cryopreci+, cryoprecipitate

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 105348382 A (上海洲跃生物科技有限公司) 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24) 摘要、权利要求1	10
X	CN 105294858 A (上海洲跃生物科技有限公司) 2016年 2月 3日 (2016 - 02 - 03) 权利要求1	10
X	CN 108976297 A (广东双林生物制药有限公司) 2018年 12月 11日 (2018 - 12 - 11) 权利要求1-9	10
X	CN 107337727 A (国药集团武汉血液制品有限公司) 2017年 11月 10日 (2017 - 11 - 10) 权利要求1-7	10
X	CN 104231073 A (广东双林生物制药有限公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-10	10
A	WO 2015143696 A1 (成都蓉生药业有限责任公司) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 全文	1-10

其余文件在C栏的续页中列出。

见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 8月 3日

国际检索报告邮寄日期

2020年 9月 16日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

李杨军

电话号码 (86-512)88996895

G. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105348382 A (上海洲跃生物科技有限公司) 2016年 2月 24日 (2016 - 02 - 24) 摘要、权利要求1	1-9
A	CN 105294858 A (上海洲跃生物科技有限公司) 2016年 2月 3日 (2016 - 02 - 03) 权利要求1	1-9
A	CN 108976297 A (广东双林生物制药有限公司) 2018年 12月 11日 (2018 - 12 - 11) 权利要求1-9	1-9
A	CN 107337727 A (国药集团武汉血液制品有限公司) 2017年 11月 10日 (2017 - 11 - 10) 权利要求1-7	1-9
A	CN 104231073 A (广东双林生物制药有限公司) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 权利要求1-10	1-9

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/129854

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105348382	A	2016年 2月 24日	无	
CN	105294858	A	2016年 2月 3日	无	
CN	108976297	A	2018年 12月 11日	无	
CN	107337727	A	2017年 11月 10日	无	
CN	104231073	A	2014年 12月 24日	CN 104231073	B 2017年 1月 25日
WO	2015143696	A1	2015年 10月 1日	无	