



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110257358 B

(45) 授权公告日 2023.05.19

(21) 申请号 201910495082.4

A61K 38/48 (2006.01)

(22) 申请日 2019.06.10

A61P 7/04 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110257358 A

(56) 对比文件

CN 105175486 A, 2015.12.23

CN 103396494 A, 2013.11.20

(43) 申请公布日 2019.09.20

CN 104181313 A, 2014.12.03

(73) 专利权人 广东双林生物制药有限公司

CN 105330736 A, 2016.02.17

地址 524000 广东省湛江市东海岛新丰东路1号

CN 109651502 A, 2019.04.19

CN 102858971 A, 2013.01.02

(72) 发明人 朱光祖 罗观文 胡川 殷如

杨波波 庾昌文 骆燕容

Tharakan等. Development of an immunoaffinity process for factor IX purification”.《Vox Sang》.1990,

匡青芬等. 高纯度凝血因子IX制剂的制备方法.《临床医药实践》.2016, (第06期),

(74) 专利代理机构 广州广信知识产权代理有限公司 44261

专利代理师 张文雄

审查员 申延昊

(51) Int. Cl.

C12N 9/64 (2006.01)

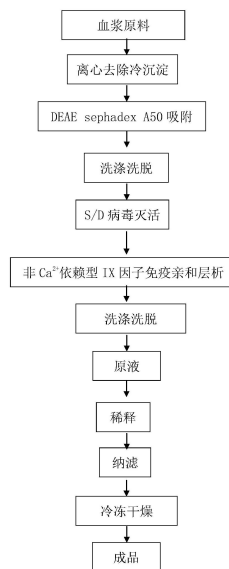
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种高纯人凝血因子IX制剂的生产方法

(57) 摘要

本发明公开了一种工艺步骤少、生产成本低、高比活性的高纯人凝血因子IX制剂生产方法。包括以下步骤：(1) 血浆冷沉淀去除；(2) DEAE sephadex A50阴离子交换层析；(3) S/D灭活病毒；(4) 非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和层析；(5) 配液加保护剂；(6) 纳滤膜除病毒过滤；(7) 分装，冷冻干燥。本发明通过采用高吸附特异性的新型免疫亲和层析极大简化了人凝血因子IX生产工艺，所制得的高纯人凝血因子IX成品效价可达114.2IU/ml，IX因子比活性高达196.5IU/mg蛋白以上；此外，本发明采用了具有高度成熟性与安全性的S/D法+纳滤法进行两步病毒灭活，有效保证了制品的安全性。



1. 一种高纯人凝血因子IX制剂的生产方法,其特征在于包含以下步骤:

血浆冷沉淀的去除:以新鲜冷冻人血浆为原料,经融浆,混浆,连续离心等工序去除血浆中的冷沉淀;

凝胶批吸附:血浆温度控制在10℃,按照1.0g干凝胶/L血浆,向去冷沉淀血浆中加入平衡后的DEAE A-50凝胶,搅拌吸附45min后关闭搅拌,凝胶吸附后的血浆使用小型封闭过滤器进行过滤,收集吸附后的A-50凝胶;

装柱洗脱:将吸附后的A-50凝胶装填在小型XK16/20层析柱内,装填好的层析柱使用AKTA层析系统进行在线洗涤,洗涤液流速为2ml/min,冲洗时间60min,洗涤后的A-50凝胶切换洗脱液进行在线洗脱,洗脱液流速为2ml/min,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于500mAu后停止洗脱,使用小型0.45um滤芯过滤;

S/D灭活:温和搅拌下将配置好的S/D灭活液缓慢加入过滤后的洗脱液中,添加完毕后搅拌30min,调整液温为24℃,灭活6h;

亲和层析:将非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和凝胶12ml装填在小型XK16/20层析柱中,装填好的层析柱使用AKTA层析系统泵入含20mmol/L的Tris,0.1mol/L的氯化钠,pH为7.4的缓冲液平衡10个柱体积,S/D灭活后料液流入层析柱,上样流速为2ml/min,上样完成后使用两种不同的洗涤缓冲液分3次进行洗涤,洗涤液流速为2ml/min,第1次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.1mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液洗涤100ml,第2次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.6mol/L的氯化钠,0.05%Tween-80,pH为7.4的洗涤缓冲液洗100ml,第3次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.1mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液洗涤50ml,洗涤后的层析柱使用含10mmol/L的Tris,0.2mol/L甘氨酸,pH为5.5的洗脱缓冲液进行洗脱,洗脱液流速为2ml/min;

配液:向洗脱液中加入含蔗糖5%,赖氨酸3%,精氨酸3%,甘氨酸3%,枸橼酸钠20mmol/L的混合保护剂10ml,使用稀释液对洗脱液进行稀释,调节活力为30IU/ml,pH 7.5,使用0.45um滤头过滤;

纳滤除病毒:采用Planova 20N纳滤膜进行除病毒过滤;

分装冻干:按规格分装,冷冻干燥。

一种高纯人凝血因子IX制剂的生产方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物制药和血液制品技术领域,具体涉及血液制品生产中一种工艺步骤少、生产成本低、高比活性的高纯人凝血因子IX制剂生产方法。

背景技术

[0002] 人凝血因子IX(human coagulation factor IX,h FIX)是一种具有关键作用的凝血因子,属于维生素K依赖性糖蛋白,是人体内源性凝血级联反应中丝氨酸蛋白酶的前体,在人体内源性凝血途径中发挥着非常重要的作用。

[0003] 乙型血友病是一种罕见的遗传疾病,发病率约为1/25000。乙型血友病的病因在于凝血因子IX的缺失,患者一旦出血后,就需要极长的时间来凝血。一些轻微的受伤,就可能带来足以威胁生命的影响。对于病情严重的患者,他们的关节和肌肉还会经常自发出血,带来痛苦。目前针对这一疾病的主流疗法是使用人凝血酶原复合物(Prothrombin Complex Concentrate,PCC)输注治疗,控制和预防出血事件。

[0004] 但使用PCC治疗乙型血友病或凝血因子IX缺乏症时,由于PCC中含有维生素K依赖性凝血因子ⅡI、VⅡ、IX、X以及蛋白C、蛋白S、 α -胰蛋白酶抑制剂、高分子量激肽原等,因而大剂量使用PCC可能会引起血栓形成和弥漫性血管内凝血,具有一定的风险。因此,从血浆中分离出高纯度凝血因子IX制品可有效控制患者的出血状况,并且显著降低患者用药过程中血栓发生的风险,具有相当大的市场前景,国内外对高纯凝血因子IX制品的研究热情极高。随着临床医生的逐步认可,高纯凝血因子IX产品的使用量也在逐年增加;目前,我国尚未有血浆来源的高纯凝血因子IX产品上市,加之原料血浆紧张,血浆来源的高纯凝血因子IX产品市场短缺,其生产制备引起了各方面的关注。

[0005] 蔡骏等在《柱层析法制备高纯人血FIX研究初探》中报告了一种用DEAE Sephadex A50,DEAE-Sepharose FF和Heparin-Sepharose CL-6B制备高纯度凝血因子IX的方法,最终凝血因子IX成品比活为 35 ± 2.0 IU/mg,回收率约为30%。赵彦鼎等人在《自制填充介质对人血浆凝血因子IX的层析分离》中采用自制的DEAE Bio-Sep FF和肝素Bio-Sep介质,经过2步弱阴离子交换和1步亲和层析从去冷沉淀血浆中分离纯化凝血因子IX,成品比活达到99.40 IU/mg,回收率约为30%。上述方法均使用2步阴离子交换和1步肝素亲和层析纯化凝血因子IX,产品得率尚可,但由于肝素配基填料开发初衷是作为AT-Ⅲ的吸附剂,该凝胶对于AT-Ⅲ、凝血因子(包括VⅡ,IX)、脂蛋白、脂酶、蛋白合成因子;激素、类固醇受体、核酸结合酶、限制性内切酶、干扰素等数十种蛋白种类均有吸附作用,对于人凝血因子IX的吸附特异性不强,故以上制备工艺所制备的人凝血因子IX成品比活性均较低,甚至不能满足欧洲药典中要求比活性不低于50 IU/mg的最低要求,因此,以上制备工艺均不具备批量生产价值。

[0006] 公开日为2008.10.22,公开号为CN101291951A的专利申请《一种高纯度的人第IX凝血因子的制备方法》公开了一种利用2次阴离子交换层析、肝素亲合层析、阳离子交换层析从血浆来源纯化人第IX凝血因子的制备方法,该方法通过增加层析工艺步骤的方式提高

比活性,所制备的人IX凝血因子比活性较高,可达150IU/mg。但由于其生产工艺繁琐,需经过4次层析步骤,本领域专业技术人员公知,每经过1次层析纯化步骤,均不可避免地会造成目标蛋白损失,因此,该制备工艺产品得率较低;此外,4次层析步骤需耗费大量凝胶填料,生产成本极高,不便于大范围推广。

[0007] 综上所述,市场急需一种工艺步骤少,生产成本低,同时比活性更高的高纯凝血因子IX产品制造方法,来最大限度的满足临床病人的需求和最大可能的提高血浆利用率。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服上述现有技术的不足,提供一种工艺步骤少、生产成本低、高比活性的高纯人凝血因子IX制剂生产方法。为实现此目的,本发明采用以下技术方案。

[0009] 一种高纯人凝血因子IX制剂的生产方法,其特征在于包含以下步骤:

[0010] (1) 血浆冷沉淀的去除:以新鲜冷冻人血浆为原料,经融浆,混浆,连续离心等工序去除血浆中的冷沉淀,得到无冷沉淀的血浆离心上清液;

[0011] (2) 离子交换凝胶吸附:血浆温度控制在10-15℃,按照1.0-1.5g干凝胶/L血浆,向去冷沉淀血浆中加入平衡后的DEAE-sephadex A-50凝胶,搅拌吸附45min后关闭搅拌,静置沉降45min。凝胶吸附后的血浆使用连续过滤器进行过滤,收集吸附后的A-50凝胶,血浆滤过液并入血浆罐;

[0012] (3) 装柱洗脱:将吸附后的A-50凝胶装填在固定床层析柱内,装填好的层析柱泵入洗涤液进行在线冲洗,洗涤液流速为30-40cm/h,冲洗时间约60-90min。洗涤后的A-50凝胶使用洗脱液进行在线洗脱,洗脱液流速为30-40cm/h,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于500mAu后停止洗脱,收集洗脱液并使用0.45um滤芯过滤;

[0013] (4) S/D灭活病毒:温和搅拌下将配置好的S/D灭活液缓慢加入过滤后的洗脱液中,添加完毕后搅拌30min。调整液温为24-26℃,灭活6h;

[0014] (5) 亲和层析:将琼脂糖免疫亲和凝胶装填在固定床层析柱内,装填好的层析柱使用平衡液平衡5-10个柱体积,S/D灭活后料液流入层析柱,上样流速为50-80cm/h。上样完成后使用两种不同的洗涤液进行复合洗涤,洗涤液流速为50-80cm/h。洗涤后的层析柱使用洗脱液进行洗脱,洗脱液流速为50-80cm/h,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于100mAu后停止洗脱,收集洗脱液;

[0015] (6) 配液:向洗脱液中加入保护剂,所述保护剂为盐、糖、氨基酸或其混合物;使用稀释液对洗脱液进行稀释,调节活力为30-40IU/ml, pH7-7.5,使用0.45um滤芯过滤;

[0016] (7) 纳滤膜除病毒过滤;

[0017] (8) 分装,冷冻干燥,得到高纯人凝血因子IX制剂成品。

[0018] 进一步的,所述的步骤(3)中的洗涤液为含20-30mmol/L的柠檬酸钠,0.1-0.5mol/L的氯化钠,200-500IU/ml的肝素钠,pH为6.8-7.0的洗涤缓冲液A;优选为含25mmol/L的柠檬酸钠,0.25mol/L的氯化钠,200IU/ml的肝素钠,pH为6.9的洗涤缓冲液。

[0019] 进一步的,所述步骤(3)中的洗脱液为含20-30mmol/L的柠檬酸钠,0.5-1.0mol/L的氯化钠,200-500IU/ml的肝素钠,pH为6.8-7.0的洗脱缓冲液A;优选为含25mmol/L的柠檬酸钠,0.8mol/L的氯化钠,200IU/ml的肝素钠,pH为6.9的洗脱缓冲液。

[0020] 进一步的,所述步骤(5)中的亲和层析介质为琼脂糖免疫亲和凝胶;优选使用非

Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和凝胶,凝胶用量为0.5ml/kg血浆。

[0021] 进一步的,所述的步骤(5)中的复合洗涤为使用两种不同的洗涤缓冲液进行3次分步洗涤。第1次洗涤:使用含10-30mmol/L的Tris,0.1-0.15mol/L的氯化钠,pH为6.8-7.5的洗涤缓冲液B洗涤8-12个柱体积;优选为使用含20mmol/L的Tris,0.15mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液B洗涤8个柱体积。第2次洗涤:使用含10-30mmol/L的Tris,0.4-0.6mol/L的氯化钠,0.05-0.1% Tween-80,pH为6.8-7.5的洗涤缓冲液C洗涤8-12个柱体积;优选为使用含20mmol/L的Tris,0.6mol/L的氯化钠,0.05% Tween-80,pH为7.4的洗涤缓冲液C洗涤8个柱体积。第3次洗涤:使用含10-30mmol/L的Tris,0.1-0.15mol/L的氯化钠,pH为6.8-7.5的洗涤缓冲液B洗涤8-12个柱体积;优选为使用含20mmol/L的Tris,0.15mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液B洗涤4个柱体积。

[0022] 进一步的,所述的步骤(5)中的洗脱液为含10-30mmol/L的Tris,0-2mol/L氯化镁,0-0.2mol/L甘氨酸,pH为2-7.5的洗脱缓冲液B;优选的,所述洗脱液为含10mmol/L的Tris,0.2mol/L甘氨酸,pH为5.5的洗脱缓冲液。

[0023] 进一步的,所述步骤(6)中活性保护剂为盐、糖、氨基酸混合保护剂;优选的,所述活性保护剂为蔗糖,赖氨酸,精氨酸,甘氨酸,枸橼酸钠混合保护剂;更优选的,所述活性保护剂为含蔗糖2-5%,赖氨酸1-3%,精氨酸1-3%,甘氨酸1-3%,枸橼酸钠20mmol/L的混合保护剂。

[0024] 进一步的,所述步骤(7)中的纳滤膜除病毒过滤采用中空再生纤维素纳滤膜,优选采用Planova 20N纳滤膜进行除病毒过滤。

[0025] 一种根据本发明所述高纯人凝血因子IX制剂生产方法制得的人凝血因子IX产品。

[0026] 与现有的技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0027] 1.目前国内主要使用离子交换层析加肝素亲和层析的方法纯化凝血因子IX,由于肝素亲和填料开发初衷是作为AT-Ⅲ的吸附剂,该凝胶对于AT-Ⅲ、凝血因子(包括VII,IX)、脂蛋白等多种蛋白种类均有吸附作用,对于人凝血因子IX的吸附特异性不强,故采用常规3步层析法所制备的人凝血因子IX成品比活性较低,不能满足欧洲药典要求;而采用增加纯化步骤的方式提高比活性又势必会造成产品得率的降低和生产成本的提高。

[0028] 本发明采用高吸附特异性的新型非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和层析大大简化了人凝血因子IX传统工艺。非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和填料采用特异性亲和人凝血因子IX分子的单克隆抗体片段作为配基,与球形琼脂糖颗粒(基质)连接而成,对人凝血因子IX分子吸附特异性和吸附载量极高,1步非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和层析可替代多步层析的分离纯化效果,在不影响成品比活性的基础上将原有的3步层析工艺简化为2步层析,并降低凝胶用量70%以上,显著减少了物料及时间成本,综合生产成本较传统工艺降低3倍以上。同时,所得人凝血因子IX成品比活性不降反升,IX因子效价可达114.2IU/ml以上,IX因子比活性高达196.5IU/mg蛋白以上,远高于欧洲药典标准。

[0029] 2.亲和洗脱层析过程中使用优选的含10-30mmol/L枸橼酸钠,0-0.2mol/L甘氨酸,pH为2-7.5的洗脱缓冲液进行洗脱,仅需3个柱体积便可将所有目标蛋白全部洗脱,具备极佳的洗脱效果;同时由于洗脱缓冲液成分简单,避免了常规免疫亲和层析洗脱过程中需用到的EDTA缓冲溶液,减少了潜在毒性物质,有效保证了制品的安全性。

[0030] 3.由于采用了优选的蔗糖,赖氨酸,精氨酸,甘氨酸,枸橼酸钠混合活性保护剂,按

照本发明所述制备方法所制得的高纯人凝血因子IX制剂成品复溶时间短,可于3min内复溶完毕,远低于复溶时间30min的质量标准,而且复溶效果好,复溶液澄清微带乳光。

[0031] 4. 本发明采用的新型非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和填料,其配体的制造,培养和纯化工艺均在没有哺乳动物成分的情况下进行,不存在引入外源性动物成分的风险。同时,本发明人凝血因子IX制剂生产过程中采用了具有高度成熟性、简便性与安全性的S/D法+纳滤法进行两步病毒灭活,有效保证了制品的安全性。

附图说明

[0032] 图1为以血浆为原料生产高纯人凝血因子IX制剂的工艺流程图;

[0033] 图2为实施例2中高纯人凝血因子IX制剂成品SDS-page电泳图。

具体实施方式

[0034] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0035] 【实施例1】

[0036] 血浆冷沉淀的去除:以新鲜冷冻人血浆为原料,经融浆,混浆,连续离心等工序去除血浆中的冷沉淀,得到无冷沉淀的血浆离心上清液2kg;

[0037] 凝胶批吸附:血浆温度控制在15℃,按照1.5g干凝胶/L血浆,向去冷沉淀血浆中加入平衡后的DEAEA-50凝胶,搅拌吸附45min后关闭搅拌。凝胶吸附后的血浆使用小型封闭过滤器进行过滤,收集吸附后的A-50凝胶;

[0038] 装柱洗脱:将吸附后的A-50凝胶装填在小型XK16/20层析柱内,装填好的层析柱使用AKTA层析系统进行在线洗涤,洗涤液流速为2ml/min,冲洗时间50min。洗涤后的A-50凝胶切换洗脱液进行在线洗脱,洗脱液流速为2ml/min,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于500mAu后停止洗脱,收集洗脱液125ml,使用小型0.45um滤芯过滤;

[0039] S/D灭活:温和搅拌下将配置好的S/D灭活液缓慢加入过滤后的洗脱液中,添加完毕后搅拌30min。调整液温为24℃,灭活6h;

[0040] 亲和层析:将非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和凝胶10ml装填在小型XK16/20层析柱中,装填好的层析柱使用AKTA层析系统泵入含20mmol/L的Tris,0.15mol/L的氯化钠,pH为7.4的缓冲液平衡10个柱体积,S/D灭活后料液流入层析柱,上样流速为2ml/min。上样完成后使用两种不同的洗涤缓冲液分3次进行洗涤,洗涤液流速为2ml/min。第1次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.15mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液洗涤80ml。第2次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.6mol/L的氯化钠,0.1% Tween-80,pH为7.4的洗涤缓冲液洗80ml。第3次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.15mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液洗涤30ml。洗涤后的层析柱使用含10mmol/L的Tris,2mol/L氯化镁,pH为7.5的洗脱缓冲液进行洗脱,洗脱液流速为2ml/min,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于100mAu后停止洗脱,共收集洗脱液80ml;

[0041] 配液:向洗脱液中加入含蔗糖3%,赖氨酸2%,精氨酸2%,甘氨酸2%,枸橼酸钠20mmol/L的混合保护剂20ml;经检测,原液凝血因子IX效价为23.4IU/ml,使用稀释液对洗脱液进行稀释,调节pH7.5,使用0.45um滤头过滤,共收集滤液100ml;

[0042] 分装冻干:按10.5ml/瓶规格分装,冷冻干燥,共制得高纯人凝血因子IX制剂成品7瓶。

[0043] **【实施例2】**

[0044] 血浆冷沉淀的去除:以新鲜冷冻人血浆为原料,经融浆,混浆,连续离心等工序去除血浆中的冷沉淀,得到无冷沉淀的血浆离心上清液4kg;

[0045] 凝胶批吸附:血浆温度控制在10℃,按照1.0g干凝胶/L血浆,向去冷沉淀血浆中加入平衡后的DEAEA-50凝胶,搅拌吸附45min后关闭搅拌。凝胶吸附后的血浆使用小型封闭过滤器进行过滤,收集吸附后的A-50凝胶;

[0046] 装柱洗脱:将吸附后的A-50凝胶装填在小型XK16/20层析柱内,装填好的层析柱使用AKTA层析系统进行在线洗涤,洗涤液流速为2ml/min,冲洗时间60min。洗涤后的A-50凝胶切换洗脱液进行在线洗脱,洗脱液流速为2ml/min,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于500mAu后停止洗脱,收集洗脱液340ml,使用小型0.45um滤芯过滤;

[0047] S/D灭活:温和搅拌下将配置好的S/D灭活液缓慢加入过滤后的洗脱液中,添加完毕后搅拌30min。调整液温为24℃,灭活6h;

[0048] 亲和层析:将非Ca²⁺依赖型IX因子免疫亲和凝胶12ml装填在小型XK16/20层析柱中,装填好的层析柱使用AKTA层析系统泵入含20mmol/L的Tris,0.1mol/L的氯化钠,pH为7.4的缓冲液平衡10个柱体积,S/D灭活后料液流入层析柱,上样流速为2ml/min。上样完成后使用两种不同的洗涤缓冲液分3次进行洗涤,洗涤液流速为2ml/min。第1次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.1mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液洗涤100ml。第2次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.6mol/L的氯化钠,0.05% Tween-80,pH为7.4的洗涤缓冲液洗100ml。第3次洗涤:使用含20mmol/L的Tris,0.1mol/L的氯化钠,pH为7.4的洗涤缓冲液洗涤50ml。洗涤后的层析柱使用含10mmol/L的Tris,0.2mol/L甘氨酸,pH为5.5的洗脱缓冲液进行洗脱,洗脱液流速为2ml/min,待在线紫外检测器中的紫外吸收值低于100mAu后停止洗脱,共收集洗脱液45ml;

[0049] 配液:向洗脱液中加入含蔗糖5%,赖氨酸3%,精氨酸3%,甘氨酸3%,枸橼酸钠20mmol/L的混合保护剂10ml;经检测,原液凝血因子IX效价为114.2IU/ml,使用稀释液对洗脱液进行稀释,调节活力为30IU/ml,pH7.5,使用0.45um滤头过滤,共收集滤液210ml;

[0050] 纳滤除病毒:采用Planova 20N纳滤膜进行除病毒过滤;

[0051] 分装冻干:按10.5ml/瓶规格分装,冷冻干燥,共制得高纯人凝血因子IX制剂成品18瓶。

[0052] **【实施例3】**

[0053] 委托检测实验室对实施例2中所制备的高纯人凝血因子IX制剂成品进行SDS-page电泳检测,以确定成品中主要蛋白种类分布情况。检测操作步骤:

[0054] (1) 将玻璃板洗干净晾干;

[0055] (2) 把玻璃板在灌胶支架上固定好,固定时两边用力均匀,防止夹坏玻璃板;

[0056] (3) 按比例配置8%分离胶,用移液管快速加入,加至上边缘1cm左右,之后加入少许水进行封夜,静置40min左右;

[0057] (4) 倒出水并用滤纸把剩余的水分吸干,配制5%的浓缩胶,连续平稳加入浓缩胶至离边缘5mm处,迅速插入样梳,静置30-40min;

- [0058] (5) 在上槽内加入缓冲液后,拔出样梳,使气泡全部排出;
- [0059] (6) 加样,取4倍体积的蛋白样品溶解液于EP管内,再加入1倍的样品缓冲液(5X),上样量为10微升;marker直接溶解上样;
- [0060] (7) 加样前,样品在沸水中加热3分钟,去掉亚稳态聚合;
- [0061] (8) 加样时应控制好高度,防止发生扩散或边缘效应;
- [0062] (9) 电泳槽中加入缓冲液,接通电源,进行电泳,开始时电压控制在80V,当进入到分离胶后改为121V,溴酚蓝距凝胶边缘约5mm时,停止电泳;
- [0063] (10) 电泳结束后,撬开玻璃板,将凝胶板做好标记后放在大培养皿内,加入染色液,染色10min左右,再用脱色液脱色,直到蛋白质区带清晰。
- [0064] SDS-page电泳检测结果显示,实施例2中所制备的人凝血因子IX制剂成品其主要蛋白条带位置与人凝血因子IX标准品基本一致,且杂蛋白条带几乎不可见,说明实施例2中所制备人凝血因子IX制剂成品纯度较高,杂蛋白种类较少。
- [0065] **【实施例4】**
- [0066] 实施例1,2及另一批次所生产的人凝血因子IX冻干成品全项目检测结果。
- [0067] 委托检测实验室对实施例1,2及另一批次所生产的人凝血因子IX冻干成品进行全项目检测,检测项目设置参考欧洲药典8.0中人凝血因子IX成品质量标准,检测结果如表1所示:以上3批次产品检验各项质量指标均合格,且具有高效价和高比活性,成品IX因子效价大于20IU/ml、比活性高达196.5IU/mg,几乎不含凝血因子II,VII,X等杂质;同时,产品复溶速度快,仅为3min,远低于复溶时间少于30min的质量标准,且复溶效果好,复溶液澄清,仅微带乳光。
- [0068] 表1人凝血因子IX成品全项目检测结果

[0069]

检测项目	质量标准	制品批号		
		实施例1	实施例2	2018XXXX
鉴别试验 (免疫双扩散法)	仅与抗人血清或血浆产生沉淀线，与抗马、抗牛、抗猪、抗羊血清不产生沉淀线	合格	合格	合格
外观	应为白色或灰绿色疏松体，复溶后应为无色、淡黄色、淡蓝色或黄绿色澄明液体，可带轻微乳光。	少量颗粒	少量颗粒	少量颗粒
真空度	应出现蓝紫色辉光	合格	合格	合格
复溶时间	应于30分钟内完全溶解	3	3	2
可见异物	依法检查，应符合规定/不应有异物或沉淀，除允许有微量细小蛋白颗粒外，其余应符合规定	少量析出	细小颗粒	少量析出
装量差异	应符合规定	合格	合格	合格
渗透压(mOsmol/Kg)	300-600	714	754	780
比活性(IU/mg蛋白质)	≥50	114.2	196.5	160.1
肝素含量(IU/IU人凝血因子IX)	≤0.5	未检出	未检出	未检出
活化的凝血因子(秒)	凝固时间应不低于150	80s	128s	80s
人凝血酶活性检查	不得有凝块或纤维蛋白析出	合格	合格	合格
水分(%)	≤3.0	0.48	0.53	0.29
pH值	6.5~7.5	6.93	6.95	7.05
II因子效价(IU/ml)	≤1	0.03	0.03	0.01
VII因子效价(IU/ml)	≤1	0.02	0.02	0.015
X因子效价(IU/ml)	≤1	0.04	0.04	0.02
IX因子效价(%)	应为标示量的80~140	110.6	101.1	112.7
钠离子含量(mmol/L)	≤800	480	520	568
磷酸三丁酯含量(μg/ml)	≤10	1.463	1.973	1.522
聚山梨酯80含量(μg/ml)	≤100	9.71	10.14	7.64
无菌试验	无菌生长	符合规定	符合规定	符合规定
异常毒性试验	豚鼠应健存，体重增加，小白鼠应健存，体重增加	符合规定	符合规定	符合规定
热原质试验	应符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
HBsAg	阴性	合格	合格	合格
HIV-1/HIV-2抗体	阴性	合格	合格	合格
HCV抗体	阴性	合格	合格	合格

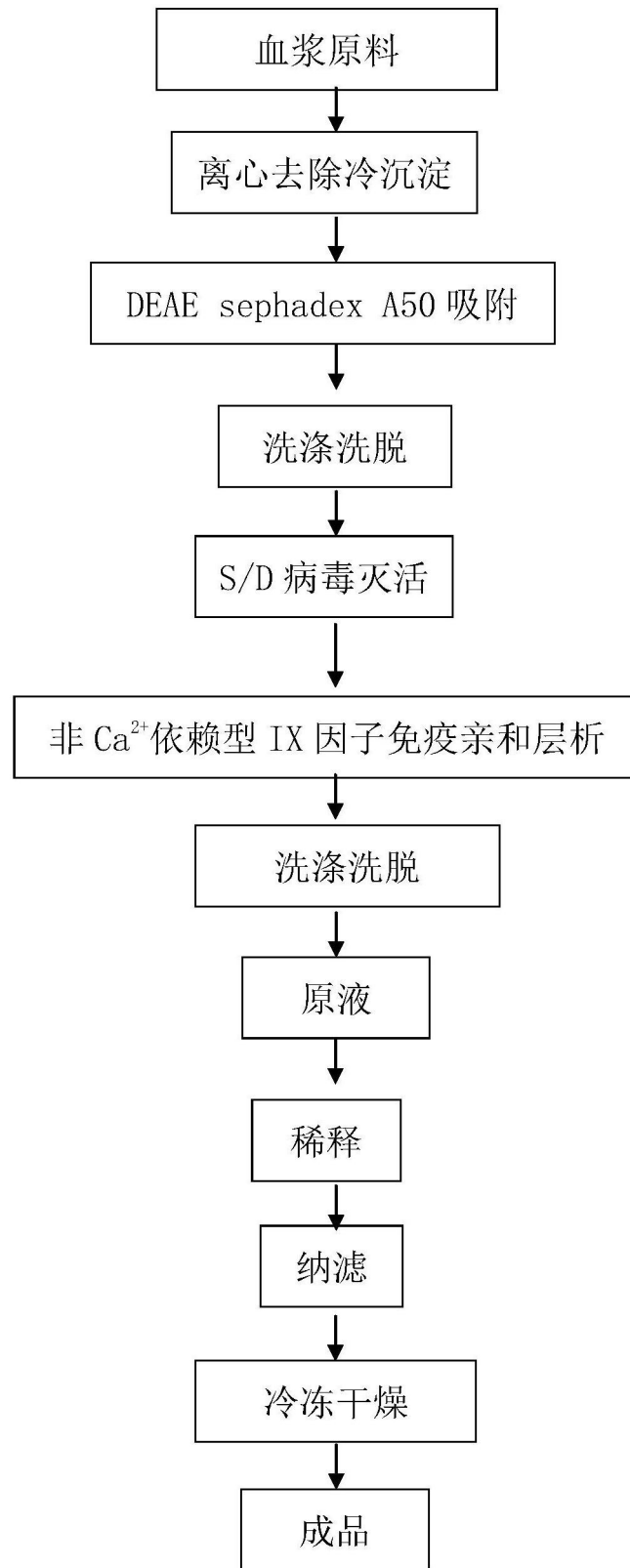


图1

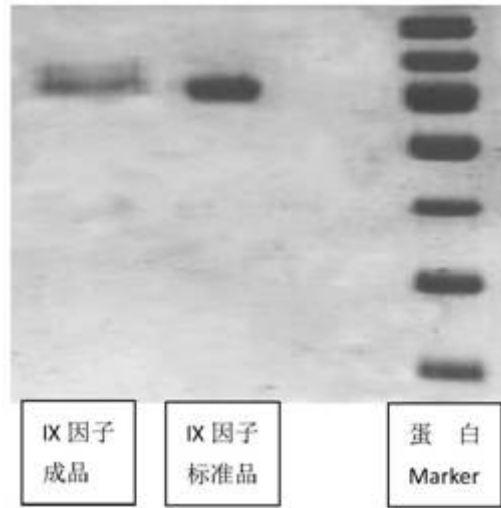


图2