



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113563457 B

(45) 授权公告日 2023.02.24

(21) 申请号 202110959567.1

C07K 1/18 (2006.01)

(22) 申请日 2021.08.20

G12N 9/68 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113563457 A

(43) 申请公布日 2021.10.29

(73) 专利权人 华兰生物工程股份有限公司

地址 453003 河南省新乡市华兰大道甲1号

(72) 发明人 马小伟 谢来峰 张学成 李光飞

杨保平 薛继初

(74) 专利代理机构 北京市中联创和知识产权代

理有限公司 11364

专利代理师 王峰 张利杰

(51) Int. Cl.

C07K 14/75 (2006.01)

C07K 14/755 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103848886 A, 2014.06.11

CN 107880112 A, 2018.04.06

CN 104086620 A, 2014.10.08

WO 2015136217 A1, 2015.09.17

CH 478097 A, 1969.09.15

WO 2021134180 A1, 2021.07.08

CN 102295696 A, 2011.12.28

牟蕾等. 一种离子交换层析制备人凝血因子 VIII 方法的建立及保护剂配方的筛选.《中国生物制品学杂志》.2015, (第11期),

余伟等. 两种不同工艺制备的人凝血因子 VIII 的比较.《中国生物制品学杂志》. (第12期),

余鼎等. 两种方法制备冷沉淀的比较研究.《中国输血杂志》.2015, (第11期),

审查员 周振威

权利要求书2页 说明书6页 附图1页

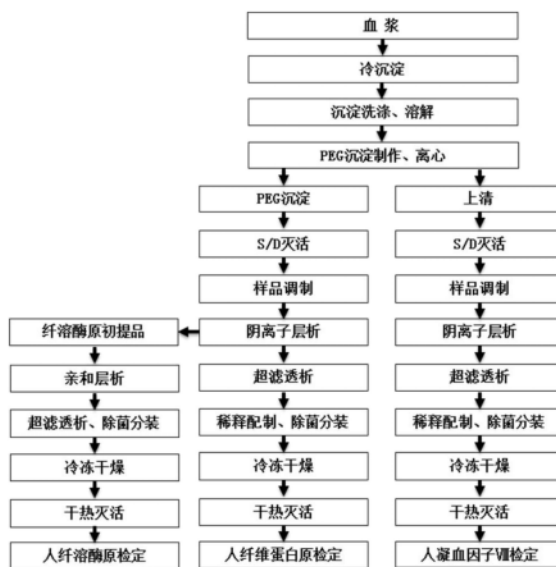
(54) 发明名称

一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子 VIII 和纤溶酶原的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子 VIII 和纤溶酶原的方法,从血浆中分离凝血因子 VIII 的同时,以副产物 PEG 沉淀为原料制备人纤维蛋白原和纤溶酶原。血浆处理后获得上清液和 PEG 沉淀,上清液经 S/D 灭活、样品调制、阴离子层析、超滤透析、稀释配制、除菌分装、冷冻干燥和干热灭活后得到凝血因子 VIII。PEG 沉淀经 S/D 灭活、样品调制、阴离子层析处理后获得洗脱制品 I 和洗脱制品 II (纤溶酶原初提品),洗脱制品 I 经超滤透析、稀释配制、除菌分装、冷冻干燥和干热灭活制备人纤维蛋白原;洗脱制品 II 经亲和层析、超滤透析、除菌分装、冷冻干燥和干热灭活后得人纤溶酶原。采用本发明的方法能最大限度的利用血浆资源,且获得的每种制品都具有较高的

收率和纯度。



1. 一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和纤溶酶原的方法,其特征在于,从血浆中分离凝血因子Ⅷ的同时,以副产物PEG沉淀为原料,同时制备人纤维蛋白原和纤溶酶原;所述制备方法具体包括:

S1. 血浆混合后离心分离冷沉淀;

S2. 将所述冷沉淀用氨丁三醇溶液洗涤后虹吸,废弃上清;

S3. 将步骤S2得到的沉淀溶解,加入PEG3350,使PEG3350浓度到达 $3.5\% \pm 0.5\%$,并调整pH至 $6.00 \sim 7.00$,离心后分别收集上清液和PEG沉淀,其中凝血因子Ⅷ存在于所述上清液中,人纤维蛋白原和纤溶酶原形成所述PEG沉淀析出;

所述步骤S3中采用氨丁三醇进行溶解,氨丁三醇浓度为 $0.01 \sim 0.1 \text{mol/L}$,pH $6.50 \sim 7.50$,溶解温度为 $25 \sim 35^\circ\text{C}$,溶解倍数为 $3 \sim 5$ 倍,

所述凝血因子Ⅷ的制备方法包括如下步骤:

S311. 将所述步骤S3得到的上清液加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯, $24^\circ\text{C} \sim 26^\circ\text{C}$ 孵育至少6h进行S/D灭活;

S312. 将步骤S311得到的灭活后制品调制后,经阴离子交换介质层析,所述阴离子交换介质层析包括平衡液平衡、淋洗液淋洗、洗脱液洗脱,收集的洗脱液经超滤透析后,除菌过滤即为原液;原液经稀释、配制、分装、冻干、干热灭活得到凝血因子Ⅷ成品;

所述人纤维蛋白原和纤溶酶原的制备方法包括如下步骤:

S321. 将所述步骤S3得到的PEG沉淀溶解后,离心、过滤,加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯, $24^\circ\text{C} \sim 26^\circ\text{C}$ 孵育至少6h进行S/D灭活;

S322. 将灭活后的制品通过超滤透析或者沉淀再溶解的方式使制品中氨丁三醇浓度达到 $0.01 \sim 0.1 \text{mol/L}$,pH值到达 $8.50 \sim 9.50$,电导率达到 $0.1 \sim 2 \text{ms/cm}$;

S323. 将步骤S322得到的制品澄清过滤后,使用阴离子凝胶进行层析纯化;上样前依次用 0.5mol/L 氢氧化钠溶液、注射用水、平衡液处理层析介质;层析上样线性速度为 $80 \sim 120 \text{cm/h}$,载量不高于 100g 蛋白/L凝胶;上样结束后用淋洗液顶洗凝胶 $2 \sim 6$ 柱体积,流穿液和顶洗出的缓冲液废弃处理,用洗脱液进行洗脱获得洗脱制品I;

S324. 用分子量为 100KD 的聚醚砜超滤膜包超滤浓缩步骤S323的洗脱制品I, $3 \sim 5$ 倍透析液等体积超滤透析,除菌过滤后即原液,原液经稀释、配制、分装、冻干、干热灭活得到人纤维蛋白原成品;

S325. 步骤S323洗脱液洗脱结束后,用 0.3mol/L 氯化钠溶液洗脱并收集洗脱制品II,即为纤溶酶原初提品;纤溶酶原初提品经ECH-lysine sepharose 4 fast flow凝胶亲和层析后,分别用 0.05mol/L 磷酸盐、 0.1mol/L 氯化钠、 $0.05 \sim 0.5 \text{mol/L}$ 盐酸赖氨酸溶液洗脱;用分子量为 30KD 的聚醚砜超滤膜包超滤浓缩得到的洗脱制品, $3 \sim 5$ 倍透析液等体积超滤透析,除菌过滤后即原液;原液经稀释、配制、分装、冻干、干热灭活得到人纤溶酶原成品。

2. 根据权利要求1所述的一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和纤溶酶原的方法,其特征在于,所述步骤S2中,洗涤时氨丁三醇浓度为 $0.01 \sim 0.1 \text{mol/L}$,pH $6.50 \sim 7.50$,洗涤温度为 $0 \sim 4^\circ\text{C}$ 。

3. 根据权利要求1所述的一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和纤溶酶原的方法,其特征在于,所述步骤S312中,灭活后制品调制方法为调整所述灭活后制品的氯化钠浓度至 $0.10 \sim 0.20 \text{mol/L}$;阴离子交换层析介质为Toyo Pear1 DEAE-650M。

4. 根据权利要求1所述的一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和纤溶酶原的方法, 其特征在于, 所述步骤S312中, 平衡液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇, 0.10~0.20mol/L的氯化钠, pH值为6.50~7.50; 淋洗液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇, 0.10~0.20mol/L的氯化钠, pH值为6.50~7.50; 洗脱液组分为0.01~0.1mol/L的组氨酸, 0.15~0.25mol/L的氯化钠, pH值为6.00~7.00。

5. 根据权利要求1所述的一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和纤溶酶原的方法, 其特征在于, 所述步骤S323中, 平衡液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇, pH值为8.50~9.50; 淋洗液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇, pH值为8.50~9.50; 洗脱液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇, pH值为7.00~7.50。

6. 根据权利要求1所述的一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子Ⅷ和纤溶酶原的方法, 其特征在于, 所述步骤S324中, 透析液配方组成为1.0~10.0g/L枸橼酸钠、5.0~15.0g/L氯化钠、10.0~20.0g/L精氨酸, pH6.80~7.20, 温度20℃~30℃。

一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制药技术领域,特别涉及一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原的方法。

背景技术

[0002] 人纤维蛋白原适用于先天性纤维蛋白原减少或缺乏症、严重肝脏损伤、肝硬化、弥散性血管内凝血、产后大出血以及大手术、外伤、内出血等引起的纤维蛋白原缺乏而造成的凝血障碍,是临床上用于大出血、止血的必备急救药品。目前仅有华兰生物、博雅生物、上海莱士等少数几个血液制品企业具有人纤维蛋白原生产批件,产量不足,人纤维蛋白原属于国内紧缺药品。人凝血因子VIII主要用于防治甲型血友病和获得性凝血因子VIII缺乏而致的出血症状及这类病人的手术后出血。

[0003] CN105481976A涉及一种制备人凝血因子VIII的离子交换层析用洗涤缓冲液及其用途,采用聚乙二醇(PEG)沉淀法是凝血因子VIII的主要分离方法之一,该工艺方法的副产物PEG沉淀富含人纤维蛋白原,但是相对于组分I沉淀和冷沉淀而言,其纤维蛋白原纯度低,凝固活力差,稳定性差等,在凝血因子VIII工艺中视为工艺废料而废弃,宝贵的血浆资源未得到充分利用。人纤溶酶原药物是治疗血纤溶酶原缺乏症的孤儿药。PEG沉淀中同样含有纤溶酶原,但是因为其浓度低,提取难度大而被废弃。CN105315360A公开了一种同时制备人凝血因子VIII和人纤维蛋白原的方法,但是该工艺未涉及PEG沉淀的再利用问题,且其原料中的纤溶酶原未被有效提取纯化。CN107827974B公开了一种同时制备人纤维蛋白原和人纤溶酶原的方法,其主要缺点是原料中的人凝血因子VIII未被有效提取纯化,且价格昂贵的亲和层析步骤是制备人纤维蛋白原和纤溶酶原的共有步骤,根据市场需求当仅需制备人纤维蛋白原或纤溶酶原时,亲和层析步骤的存在会导致制造成本升高。

[0004] 目前已有的技术方案中,都着眼于一种或两种制品的分离提取和纯化,其他成分都作为杂蛋白被去除,很难再得到利用。由于技术的局限性,还没有任何一种技术方案可以同时从血浆中制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明旨在提出一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原的方法,以最大程度的利用宝贵的血浆资源,通过对制备方法的改进和工艺参数的调整,可以从血浆中同时获得多种有用的制品,减少资源的浪费。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术方案是这样实现的:

[0007] 一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原的方法,从血浆中分离凝血因子VIII的同时,以副产物PEG沉淀为原料,同时制备人纤维蛋白原和纤溶酶原;所述制备方法具体包括:

[0008] S1. 血浆混合后离心分离冷沉淀;

[0009] S2. 将所述冷沉淀用氨丁三醇洗涤后虹吸,废弃上清;

[0010] S3. 将步骤S2得到的沉淀溶解,加入PEG,离心后分别收集上清液和PEG沉淀,其中凝血因子VIII存在于所述上清液中,人纤维蛋白原和纤溶酶原形成所述PEG沉淀析出。

[0011] 进一步的,将步骤S2得到的沉淀溶解,加入分子量为2000~5000的PEG。

[0012] 进一步的,所述凝血因子VIII的制备方法包括如下步骤:

[0013] S311. 将所述步骤S3得到的上清液加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯,24℃~26℃孵育至少6h进行S/D灭活;

[0014] S312. 将步骤S311得到的灭活后制品调制后,经阴离子交换介质层析(平衡液平衡、淋洗液淋洗、洗脱液洗脱),收集的洗脱液经超滤透析后,除菌过滤即为原液;原液经稀释、配制、分装、冻干、干热灭活得到凝血因子VIII成品。

[0015] 进一步的,人纤维蛋白原和纤溶酶原的制备方法包括如下步骤:

[0016] S321. 将所述步骤S3得到的PEG沉淀溶解后,离心、过滤,加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯,24℃~26℃孵育至少6h进行S/D灭活;

[0017] S322. 将灭活后的制品通过超滤透析或者沉淀再溶解的方式使制品中氨丁三醇浓度达到0.01~0.1mol/L,pH值到达8.50~9.50,电导率达到0.1~2ms/cm;

[0018] S323. 将步骤S322得到的制品澄清过滤后,使用阴离子凝胶进行层析纯化;上样前依次用0.5mol/L氢氧化钠溶液、注射用水、平衡液处理层析介质;层析上样线性速度为80~120cm/h,载量不高于100g蛋白/L凝胶;上样结束后用淋洗液顶洗凝胶2~6柱体积,流穿液和顶洗出的缓冲液废弃处理,用洗脱液进行洗脱获得洗脱制品I;

[0019] S324. 用分子量为100KD的聚醚砜超滤膜包超滤浓缩步骤S323的洗脱制品I,3~5倍透析液等体积超滤透析,除菌过滤后即为原液,原液经稀释、配制、分装、冻干、干热灭活得到人纤维蛋白原成品;

[0020] S325. 步骤S323洗脱液洗脱结束后,用0.3mol/L氯化钠溶液洗脱并收集洗脱制品II,即为纤溶酶原初提品。该初提品中纤溶酶原含量比S321步骤所述PEG沉淀溶解后制品提高了15~25倍。

[0021] 进一步的,所述步骤S325中,纤溶酶原初提品经ECH-lysine sepharose 4 fast flow凝胶亲和层析后,分别用0.05mol/L磷酸盐、0.1mol/L氯化钠、0.05~0.5mol/L盐酸赖氨酸溶液洗脱;用分子量为30KD的聚醚砜超滤膜包超滤浓缩得到的洗脱制品,3~5倍透析液等体积超滤透析,除菌过滤后即为原液;原液经稀释、配制、分装、冻干、干热灭活得到人纤溶酶原成品。

[0022] 进一步的,所述步骤S2中,洗涤时氨丁三醇浓度为0.01~0.1mol/L,pH6.50~7.50,洗涤温度为0~4℃。

[0023] 进一步的,所述步骤S3中采用氨丁三醇进行溶解,氨丁三醇浓度为0.01~0.1mol/L,pH6.50~7.50,溶解温度为25~35℃,溶解倍数为3~5倍。

[0024] 进一步的,所述步骤S3中加入PEG3350,使PEG3350浓度到达3.5%±0.5%,并调整pH至6.00~7.00。

[0025] 进一步的,所述步骤S312中,灭活后制品调制方法为调整所述灭活后制品的氯化钠浓度至0.10~0.20mol/L;阴离子交换层析介质为Toyo Pearl DEAE-650M。

[0026] 进一步的,所述步骤S312中,平衡液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇,0.10~0.20mol/L的氯化钠,pH值为6.50~7.50;淋洗液组分为0.01~0.1mol/L的氨丁三醇,0.10

~0.20mol/L的氯化钠,pH值为6.50~7.50;洗脱液组分为0.01~0.1mol/L的组氨酸,0.15~0.25mol/L的氯化钠,pH值为6.60~7.00。

[0027] 进一步的,所述步骤S322中,采用超滤透析时,透析液氨丁三醇溶液浓度为0.01~0.1mol/L,pH8.50~9.50;采用沉淀再溶解时,氨丁三醇溶液浓度为0.01~0.1mol/L,pH8.50~9.50,溶解倍数为15~25倍沉淀量。

[0028] 进一步的,所述步骤S323中,阴离子凝胶为Fractgel EMD TMAE (M) 凝胶。

[0029] 进一步的,所述步骤S323中,层析后淋洗时氨丁三醇溶液浓度为0.01~0.1mol/L,pH8.50~9.50,使用4~6柱床体积的淋洗液,洗脱时洗脱液氨丁三醇溶液浓度为0.01~0.1mol/L,pH值为7.00~7.50。

[0030] 进一步的,所述步骤S324中,透析液配方组成为1.0~10.0g/L枸橼酸钠、5.0~15.0g/L氯化钠、10.0~20.0g/L精氨酸,pH6.80~7.20,温度20℃~30℃。

[0031] 进一步的,调整步骤S325中所述纤溶酶原初提品磷酸盐浓度达到0.05~0.2mol/L,氯化钠浓度达到0.05~0.2mol/L,pH6.50~7.50。

[0032] 相对于现有技术,本发明所述的一种同时制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原的方法具有以下优势:本发明可以从血浆中同时制备人纤维蛋白原、凝血因子VIII和纤溶酶原,在分离凝血因子VIII的同时,以废料PEG沉淀为原料,同时制备人纤维蛋白原和纤溶酶原,最大限度的利用紧缺的血浆资源,大大提高了血浆利用率,且获得的每种制品都具有较高的收率和纯度。

附图说明

[0033] 构成本发明的一部分的附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0034] 图1为本发明的工艺流程图。

具体实施方式

[0035] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。首先应说明的是,下述实验例中的数据是由发明人通过大量实验获得,限于篇幅,在说明书中只展示其中的一部分,且本领域普通技术人员可以在此数据下理解并实施本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些改动或修改同样落于本申请所保护的范围。

[0036] 实施例1

[0037] (1) 取健康人血浆2015.53kg于2℃融合后,离心得到冷沉淀25kg;

[0038] (2) 用100L洗涤液于1℃下保温洗涤冷沉淀后,虹吸上清废弃,其中洗涤液为:0.05mol/L的氨丁三醇,pH6.80;用100L溶解液于25℃下保温溶解沉淀2小时,其中沉淀溶解液为:0.05mol/L的氨丁三醇,pH7.20。

[0039] (3) 在步骤(2)得到的制品中加入聚乙二醇3350使聚乙二醇3350浓度达到3.5%,调整制品pH至6.50,离心得到上清120L和PEG沉淀18.3kg。

[0040] (4) 将步骤(3)得到的18.3kgPEG沉淀加入10倍溶解液(所述溶解液由如下组分组成:17.8g/L枸橼酸钠、8.5g/L氯化钠、2.7g/L氨丁三醇,并调节至pH6.81,)于温度25.5℃溶

解1.5小时,过滤,用溶解液顶出至183L,加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯,使制品中聚山梨酯80含量达到10.0g/L,磷酸三丁酯的含量达到3.0g/L,调节制品pH至6.90,保持制品温度在25℃条件下,灭活6小时。

[0041] (5) 将步骤(4)得到的灭活后制品降温至1.0℃,加入预冷至-15℃以下的50%乙醇,使制品中乙醇终含量为8%,调整制品pH至6.92,控制制品温度在0℃条件下搅拌反应1小时,静置1小时后离心收集沉淀12kg。控制参数指标:杯式离心机以每分钟3500转离心,温度-2.0℃,离心时间20分钟。

[0042] (6) 将步骤(5)得到的12kg乙醇沉淀,用20倍沉淀量的溶解液(0.02mol/L氨丁三醇,pH8.80)于25℃下溶解1小时,然后澄清过滤,使用FractgelEMD TMAE(M)凝胶进行层析纯化。上样前依次用4倍柱床体积的0.5mol/L氢氧化钠溶液、4倍柱床体积的注射用水、2倍柱床体积的平衡液(平衡液组成为0.02mol/L氨丁三醇缓冲溶液(pH8.80)),对凝胶进行前处理。然后层析上样,上样速度100cm/h;上样结束后用4倍柱床体积的淋洗液(淋洗液组成为0.02mol/L氨丁三醇缓冲溶液(pH8.80))对凝胶进行顶洗,流穿液和顶洗出的缓冲液废弃处理;用洗脱液(0.02mol/L氨丁三醇,pH7.40)进行洗脱,收集4倍柱床体积洗脱液后,获得洗脱制品I。用0.3mol/L氯化钠溶液再次洗脱层析柱,获得洗脱制品II。

[0043] (7) 用分子量为100KD的聚醚砜超滤膜包超滤浓缩步骤(6)得到的洗脱制品I,用4倍透析液(透析液组成为:1.5g/L枸橼酸钠、9.0g/L氯化钠、17.5g/L精氨酸,调节pH7.02,温度25℃)等体积超滤透析后,除菌过滤,调整蛋白质含量至25g/L。

[0044] (8) 将步骤(7)得到的制品分装后,入柜冷冻干燥后出柜轧盖,进行沸水浴(99.5℃±0.5℃)31分钟干热灭活病毒处理得到人纤维蛋白原制品。

[0045] (10) 步骤(9)得到的人纤维蛋白原制品经检定,质量指标均符合药典标准。其中纯度为94.2%,凝固活力为20秒,稳定性试验符合药典规定,纤溶酶原残留量为1.0μg/mL,纤维蛋白原与凝血酶成胶后可保持5天不水解,磷酸三丁酯残留量<3μg/mL,聚山梨酯80残留量为12μg/mL。本批次获得人纤维蛋白原1171g。整个工艺人纤维蛋白原蛋白回收率为0.58g/kg血浆。

[0046] 实施例2

[0047] (1) 取实施例1步骤(3)得到的120L离心上清,加入聚山梨酯80和磷酸三丁酯,使制品中聚山梨酯80含量达到10.0g/L,磷酸三丁酯的含量达到3.0g/L,调节制品pH至6.85,保持制品温度在25℃条件下,灭活6小时。

[0048] (3) 灭活后制品加入氯化钠,使制品中氯化钠含量达到0.12mol/L,经阴离子交换介质层析上样,用平衡液平衡、淋洗液淋洗5倍柱体积,用洗脱液洗脱并收集洗脱液,其中所述阴离子交换介质Toyo Pear1 DEAE-650M,平衡液组分为0.05mol/L的氨丁三醇,0.15mol/L的氯化钠,pH值为7.00;淋洗液组分为0.05mol/L的氨丁三醇,0.15mol/L的氯化钠,pH值为7.00;洗脱液组分为0.05mol/L的组氨酸,0.20mol/L的氯化钠,pH值为6.80。

[0049] (4) 将步骤(3)得到的洗脱制品用分子量为100KD的聚醚砜超滤膜包进行超滤浓缩,用4倍透析液(透析液组分为0.01mol/L枸橼酸钠、0.05mol/L组氨酸,pH7.05,温度25℃)等体积超滤透析后,除菌过滤,调整人凝血因子VIII效价≥20IU/mL。

[0050] (5) 将步骤(4)得到的制品分装、入柜冻干、出柜轧盖后,进行沸水浴(99.5℃±0.5℃)31分钟干热灭活病毒处理。

[0051] (6) 步骤(5)得到的人凝血因子VIII制品经检定,质量指标均符合中国药典标准。其中人凝血因子VIII效价为25IU/mL,比活为61IU/mg,人凝血因子VIII收率为190IU/kg血浆。

[0052] 实施例3

[0053] (1) 在实施例1步骤(6)得到的洗脱制品II中加入2倍体积的0.2mol/L磷酸盐缓冲液(pH7.00),使制品中磷酸盐浓度达到0.17mol/L,氯化钠浓度达到0.1mol/L,pH为7.21,澄清过滤。

[0054] (2) 使用ECH-lysine sepharose 4 fast flow凝胶进行层析纯化。上样前依次用4倍柱床体积的0.5mol/L氢氧化钠溶液、4倍柱床体积的注射用水、5倍柱床体积的平衡液(平衡液组成为0.05mol/L磷酸盐、0.1mol/L氯化钠,pH7.00),对凝胶进行前处理。然后层析上样,上样速度150cm/h。上样结束后用平衡液对凝胶进行顶洗,流穿液和顶洗出的缓冲液废弃处理;用洗脱液(洗脱液组成为0.05mol/L磷酸盐、0.1mol/L氯化钠、0.05mol/L盐酸赖氨酸,pH7.00)进行洗脱,收集洗脱液澄清过滤。

[0055] (3) 用分子量为30KD的聚醚砜超滤膜包超滤浓缩步骤(2)得到的洗脱制品,用3倍透析液(透析液组成为9.0g/L氯化钠、10g/L精氨酸,pH6.88,温度25℃)等体积超滤透析后,除菌过滤,调整蛋白质含量至1g/L。

[0056] (4) 将步骤(3)得到的制品分装后,入柜冻干。

[0057] (5) 将步骤(4)得到的制品冷冻干燥后的制品出柜轧盖后,进行沸水浴(99.5℃±0.5℃)31分钟干热灭活病毒处理。

[0058] (6) 步骤(5)得到的制品经检定,纯度为98.0%,活性5IU/mL,磷酸三丁酯残留量<3μg/mL,聚山梨酯80残留量为12μg/mL。整个工艺人纤溶酶原蛋白回收率为8mg/kg血浆。

[0059] 对比例1

[0060] 对比例1为按照CN107827974B中实施例2方法制备的人纤维蛋白原。

[0061] 对比例2

[0062] 对比例2为按照CN105481976A中实施例1方法制备的人凝血因子VIII。

[0063] 对实施例1和对比例1制备的人纤维蛋白原进行检测,结果如表1所示。

[0064] 表1

序号	纯度(%)	凝固活力(s)	磷酸三丁酯残留量(μg/mL)	聚山梨酯80残留量(μg/mL)
[0065] 实施例1	94.2	20	<3	12
对比例1	90	30	3.2	10

[0066] 本发明实施例1中人纤维蛋白原制品纯度为94.2%,凝固活力为20秒,稳定性试验符合药典规定,磷酸三丁酯残留量<3μg/mL,聚山梨酯80残留量为12μg/mL。本发明中灭活后制品通过超滤透析或沉淀再溶解方法,可以降低磷酸三丁酯和聚山梨酯80的含量。对比例1从血浆中去除纤溶酶原,得到的人纤维蛋白原制品纯度为90%,凝固活力为30秒,磷酸三丁酯残留量为3.2μg/mL,聚山梨酯80残留量为10μg/mL。对比例1无法充分合理利用血浆资源,仅能获得人纤维蛋白原制品,造成资源的浪费,且人纤维蛋白原制品的纯度和凝固活力都不如本申请。

[0067] 在传统工艺中采用氢氧化铝凝胶来吸附去除血浆冷沉淀中残留的凝血酶,但是氢氧化铝凝胶通常需要现场制备,制备的凝胶的浓度、纯度等可控性低,且在制备过程中容易引入铝离子,铝离子输入人体后有导致老年痴呆症的潜在风险。对比例2的人凝血因子VIII的制备,采用冰冻血浆为原料,血浆经融化、离心制备沉淀、溶解、聚乙二醇沉淀后,用氢氧化铝吸附。最终得到的FVIII制品比活性为40.5IU/mg;复溶后外观澄清,无絮状,可见异物合格,符合药典规定。采用本申请制备方法的实施例2得到的人凝血因子VIII,比活为61IU/mg,复溶后外观澄清,无絮状,可见异物合格,符合药典规定。本申请无需使用氢氧化铝凝胶,减少氢氧化铝的不良影响,但是制备得到的凝血因子VIII符合药典规定,且比活较高。

[0068] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

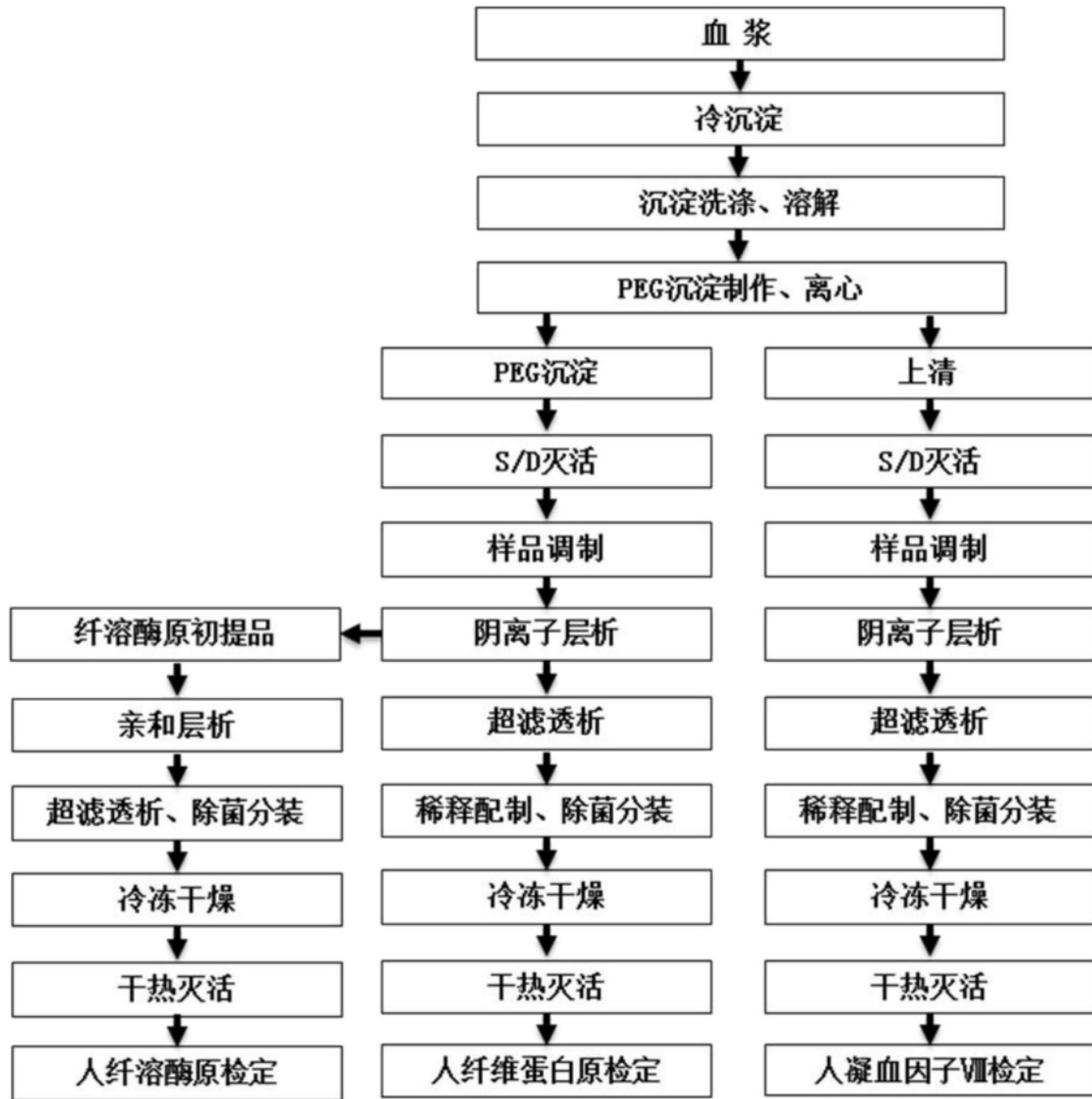


图1