



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102441172 A

(43) 申请公布日 2012.05.09

(21) 申请号 201110400450.6

A61P 7/04(2006.01)

(22) 申请日 2011.12.06

(71) 申请人 中国医学科学院输血研究所

地址 610052 四川省成都市东三环路二段龙潭总部经济城华彩路26号

申请人 四川大学

中蓝晨光化工研究设计院有限公司

成都英德生物工程有限公司

(72) 发明人 曹海军 黄亮 李长清 何琦

赵红卫 邱家山 林方昭 李志雄

(51) Int. Cl.

A61K 47/36(2006.01)

A61K 47/22(2006.01)

A61K 47/18(2006.01)

A61K 38/36(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

高纯度凝血酶原复合物制品冷冻干燥稳定剂

(57) 摘要

本发明涉及医药生物技术领域,是一种高纯度凝血酶原复合物制品(四种凝血因子 II、VII、IX、X 比活均 ≥ 3.5 IU/mg 蛋白)在冷冻干燥过程,有效防止制品中主要作用凝血因子 IX 及凝血因子 II、VII、X 失活的稳定剂。本发明的稳定剂是指精氨酸或/和海藻糖或/和组氨酸或/和甘氨酸,还含有常用柠檬酸钠和 NaCl。试验表明,高纯度凝血酶原复合物只要含有 0.1% - 10% 精氨酸或/和 0.1% - 10% 海藻糖或/和 0.1% - 10% 组氨酸或/和 0.1% - 10% 甘氨酸,就可在冷冻干燥过程中有效地保护凝血因子 IX 及凝血因子 II、VII、X 的活性。因此本发明可用作高纯度凝血酶原复合物冷冻干燥过程中的稳定剂。

1. 精氨酸或 / 和海藻糖或 / 和组氨酸或 / 和甘氨酸用作高纯度凝血酶原复合物冷冻干燥稳定剂, 精氨酸含量为 0.1% -10%, 海藻糖含量为 0.1% -10%, 组氨酸含量为 0.1% -10%, 甘氨酸含量为 0.1% -10%。

2. 根据权利要求 1 所述精氨酸或 / 和海藻糖或 / 和组氨酸或 / 和甘氨酸用作高纯度凝血酶原复合物冷冻干燥过程稳定剂, 其特征在于凝血酶原复合物四种凝血因子 II、VII、IX、X 比活均 ≥ 3.5 IU/mg。

3. 根据权利要求 1 所述精氨酸或 / 和海藻糖或 / 和组氨酸或 / 和甘氨酸用作高纯度凝血酶原复合物冷冻干燥过程稳定剂, 其特征在于稳定剂中还含有柠檬酸钠和 NaCl。

4. 根据权利要求 1 所述精氨酸或 / 和海藻糖或 / 和组氨酸或 / 和甘氨酸用作高纯度凝血酶原复合物冷冻干燥过程稳定剂, 同样适用于其他各类凝血酶原复合物制品。

高纯度凝血酶原复合物制品冷冻干燥稳定剂

技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物技术领域,是几种和几组高纯度凝血酶原复合物制品(四种凝血因子 II、VII、IX、X 比活均 ≥ 3.5 IU/mg)在冷冻干燥过程,可有效防止制品中主要作用凝血因子 IX 及凝血因子 II、VII、X 失活的稳定剂。更详细地说,在高纯度凝血酶原复合物中加入 0.1% -10% 精氨酸或 / 和 0.1% -10% 海藻糖或 / 和 0.1% -10% 组氨酸或 / 和 0.1% -10% 甘氨酸,在冷冻干燥过程中可有效保护制品凝血因子 IX 及凝血因子 II、VII、X 的活性。

背景技术

[0002] 人凝血酶原复合物(Prothrombin Complex Concentrate, PCC)是从健康人混合血浆中分离制备成的一种能促进血液凝固的血液制品,主要含有依赖维生素 K 合成的凝血因子 II、VII、IX、X。在临床上, PCC 主要用于乙型血友病、凝血因子 VII 抗体产生的甲型血友病及由肝脏疾病、维生素 K 缺乏所引起的凝血因子水平低下而导致的出血症治疗。我国是乙型肝炎患者大国,再加上其他类肝脏疾病,对 PCC 制品的需求有较大的患者群体,随着临床认同度的提高,近年来, PCC 制品有较大的使用需求。

[0003] 自 20 世纪 50 年代 PCC 用于临床以来,不断有静脉输注后导致血栓形成的报道,因此,减少潜在致栓性发生的高端 PCC 制品的开发是该制品的研究重点。高端 PCC 制品应具有较少的促栓蛋白因子,四种凝血因子 II、VII、IX、X 应具有较好的纯度及均衡度。目前国内市场成型的 PCC 制品,凝血因子 II、VII、IX、X 的比活性大多在 0.3-1.0 IU/mg 之间,纯度相对较低。此外,凝血因子 II、VII、IX、X 均衡度也有待改善,从某种意义来讲,国内目前 PCC 制品存在一定的血栓副反应发生的隐患。

[0004] 凝血因子易失活变性,此类制品为了便于保存、运输,在制备过程中需冷冻干燥处理成为粉针制剂。在冷冻过程中,冰晶从溶液中析出,制品盐离子浓度迅速增加、盐析过程又引起制品内部 pH 值变化、冷冻过程的表面诱导破坏和低温条件等诸多因素均对蛋白稳定性有负面影响;在干燥过程中,制品溶液玻璃化及玻璃化转变、水分升华氢键的直接暴露等因素也容易引起蛋白质的变性,对于易失活变性蛋白类制品,冷冻干燥过程必须添加一定的稳定剂。

[0005] 高纯度 PCC 蛋白含量相对较少,对稳定剂的要求更较高,至今未见有关 PCC 冷冻干燥稳定剂的报道,更未见精氨酸或 / 和海藻糖或 / 和组氨酸或 / 和甘氨酸用于高纯度 PCC 冷冻干燥稳定剂的研究报道。

发明内容

[0006] 要解决的技术问题

[0007] 为了能有效保护高纯度 PCC 在冷冻干燥过程中凝血因子蛋白活性,减少凝血因子的活性损失,本发明提供几种和几组高纯度 PCC 的稳定剂,经冷冻干燥处理能有效地保护凝血因子 II、VII、IX、X 的活性,其中凝血因子 IX 活性收率均 $> 70\%$ 。

[0008] 技术方案

[0009] 本发明以高纯度 PCC 为材料,经冷冻干燥、成形外观比较、活性测定、复溶澄清度比较获得 3 种和 6 组高纯度 PCC 冷冻干燥保护剂,具体步骤如下:

[0010] a) 高纯度 PCC 制备

[0011] 以健康人混合血浆去除冷沉淀上清为原料,利用扩张床技术制备高纯度 PCC。将收集的洗脱峰溶液用所含 0.01M 柠檬酸钠、0.5% NaCl、pH7.0 超滤缓冲液在 Millipore Labscale 超滤浓缩系统中超滤、脱盐、浓缩并活性测定,获得高纯度 PCC。

[0012] 上述制备的高纯度 PCC 组成特征为:

凝血因子类型	比活 (IU/mg)	凝血因子均衡度 (与凝血因子 IX 相比)
凝血因子 II	3.5-6.0	90%-115%
凝血因子 VII	3.5-6.0	90%-115%
凝血因子 IX	3.5-6.0	100%
凝血因子 X	3.5-6.0	90%-115%

[0014] b) 冷冻干燥稳定剂的添加

[0015] 以凝血因子 IX 为标准,适当调整浓缩液凝血因子活性单位至 9-15IU/ml,按比例加入精氨酸或 / 和海藻糖或 / 和组氨酸或 / 和甘氨酸稳定剂,调整 pH 至 7.0-7.2,除菌过滤、分装。

[0016] c) 冷冻干燥

[0017] 分装后制品 -40℃ 预冻 6hr-9hr,Labconco FreeZone 冻干机真空冷冻干燥,按图 1 冻干曲线进行冷冻干燥。

[0018] d) 成形外观比较

[0019] 对冻干后制品成形外观进行比较。

[0020] e) 活性测定及分析

[0021] 注射用水溶解冻干制品,一期法测定凝血因子活性,对比分析。

[0022] f) 复溶澄清度比较

[0023] 对复溶后冻干制品澄清度进行比较分析。

[0024] 有益效果

[0025] 本发明的有益效果是,提供了 3 种和 6 组高纯度 PCC 冷冻干燥稳定剂,对凝血因子 II、VII、IX、X 有较好的保护作用,其中凝血因子 IX 的活性收率均在 70% 以上,最优保护剂组合四种凝血因子活性回收率达 84% 以上。

具体实施方式

[0026] 结合实施例对本发明稳定剂在冷冻干燥过程对高纯度 PCC 的保护作用作详细说明,本发明的实施方式不限于此。

[0027] 实施例 1:精氨酸、海藻糖、组氨酸对高纯度 PCC 主要作用凝血因子 IX 的保护效果

[0028] 未加任何稳定剂的空白对照制品经冷冻干燥后,凝血因子 IX 回收率为 59.5%,而添加不同浓度(0.5%、1.5%)海藻糖作稳定剂的制品,凝血因子 IX 活性回收率在 70%以上;添加不同浓度(0.5%、1.5%)精氨酸作稳定剂的制品,凝血因子 IX 活性回收率在 76%以上;添加不同浓度(0.5%、1.5%)组氨酸作稳定剂的制品,凝血因子 IX 活性回收率在 77%以上(见表 1),说明本发明保护剂在单一因素下即能对高纯度 PCC 主要作用凝血因子 IX 活性进行保护。

[0029] 表 1 精氨酸、海藻糖、组氨酸对冷冻干燥过程高纯度 PCC 凝血因子 IX 活性回收率的影响

[0030]

类型	稳定剂浓度	凝血因子 IX 回收率 (%)
空白对照	0	59.5
海藻糖	0.5%	74.8
	1.5%	70.2
精氨酸	0.5%	77.8
	1.5%	76.1
组氨酸	0.5%	77.8
	1.5%	77.8

[0031] 实施例 2:甘氨酸与甘氨酸+海藻糖或精氨酸或组氨酸对高纯 PCC 四种凝血因子的保护效果

[0032] 仅加 2%甘氨酸稳定剂的制品,冷冻干燥后,四种凝血因子最高活性收率为 75.4%;在 2%甘氨酸的基础上,添加 0.5%海藻糖稳定剂,四种凝血因子活性收率最低为 81.2%;在 2%甘氨酸的基础上,添加 0.5%精氨酸稳定剂,四种凝血因子活性收率最低为 84.6%;在 2%甘氨酸的基础上,添加 0.5%组氨酸稳定剂,四种凝血因子活性收率最低为 83.5%(见表 2);此外,与 2%甘氨酸相比,有海藻糖、精氨酸、组氨酸存在的制品冻干成形外观、复溶澄清度均较好(见表 3),可以看出,在甘氨酸存在的基础上,海藻糖、精氨酸、组氨酸任何一种均能对冷冻干燥过程中高纯度 PCC 四种凝血因子活性进一步有效保护。

[0033] 表 2 甘氨酸及甘氨酸+海藻糖或精氨酸或组氨酸对冷冻干燥过程高纯度 PCC 四种凝血因子活性回收率的影响

[0034]

类型	凝血因子IX 回收率 (%)	凝血因子II 回收率 (%)	凝血因子VII 回收率 (%)	凝血因子X 回收率 (%)
2%甘氨酸对照	73.2	69.2	62.8	75.4
2.0%甘氨酸+0.5%海藻糖	81.6	87.2	86.1	81.2
2.0%甘氨酸+0.5%精氨酸	85.6	84.6	90.4	92.9
2.0%甘氨酸+0.5%组氨酸	85.5	88.2	83.5	86.7

[0035] 表3 甘氨酸及甘氨酸+海藻糖或精氨酸或组氨酸对高纯度PCC冷冻干燥后成形外观、复溶澄清度的影响

[0036]

类型	冻干后成形外观	冻干后复溶澄清度
2%甘氨酸对照	整体萎缩	有纤毛状物
2.0%甘氨酸+0.5%海藻糖	无萎缩,成形好	澄清
2.0%甘氨酸+0.5%精氨酸	无萎缩,成形好	澄清
2.0%甘氨酸+0.5%组氨酸	无萎缩,成形好	澄清

[0037] 实施例3:甘氨酸及甘氨酸+海藻糖或/和精氨酸或/和组氨酸对高纯度PCC四种凝血因子的保护效果

[0038] 添加1.0%甘氨酸+0.5%精氨酸+0.5%海藻糖稳定剂,冷冻干燥后,四种凝血因子活性收率最低为79.6%;添加1.0%甘氨酸+0.5%组氨酸+0.5%海藻糖稳定剂,冷冻干燥后,四种凝血因子活性收率最低为77.9%;仅加1.0%甘氨酸保护剂为对照,四种凝血因子活性收率最高为69.2%(见表4);此外,有精氨酸和海藻糖或组氨酸和海藻糖稳定剂存在,制品冻干成形外观、复溶澄清度均优于甘氨酸对照组(见表5),可以看出,在甘氨酸存在的基础上,有精氨酸或组氨酸与海藻糖存在,均能提高冷冻干燥过程中高纯度PCC四种凝血因子稳定性。表4 甘氨酸及甘氨酸+海藻糖或/和精氨酸或/和组氨酸对冷冻干燥过程高纯度PCC四种凝血因子活性回收率的影响

[0039]

类 型	凝血因子IX 回收率 (%)	凝血因子II 回收率 (%)	凝血因子VII 回收率 (%)	凝血因子X 回收率 (%)
1%甘氨酸对照	68.2	69.2	59.8	61.5
1.0%甘氨酸+0.5%精氨酸 +0.5%海藻糖	85.5	84.3	87.2	79.6
1.0%甘氨酸+0.5%组氨酸 +0.5%海藻糖	81.9	77.9	84.7	82.2

[0040] 表5 甘氨酸及甘氨酸+海藻糖或 / 和精氨酸或 / 和组氨酸对高纯度PCC冷冻干燥后成形外观、复溶澄清度的影响

[0041]

类 型	冻干后成形外观	冻干后复溶澄清度
1%甘氨酸对照	整体萎缩	有纤毛状物
1.0%甘氨酸+0.5%精氨酸 +0.5%海藻糖	无萎缩，成形好	澄清
1.0%甘氨酸+0.5%组氨酸 +0.5%海藻糖	无萎缩，成形好	澄清

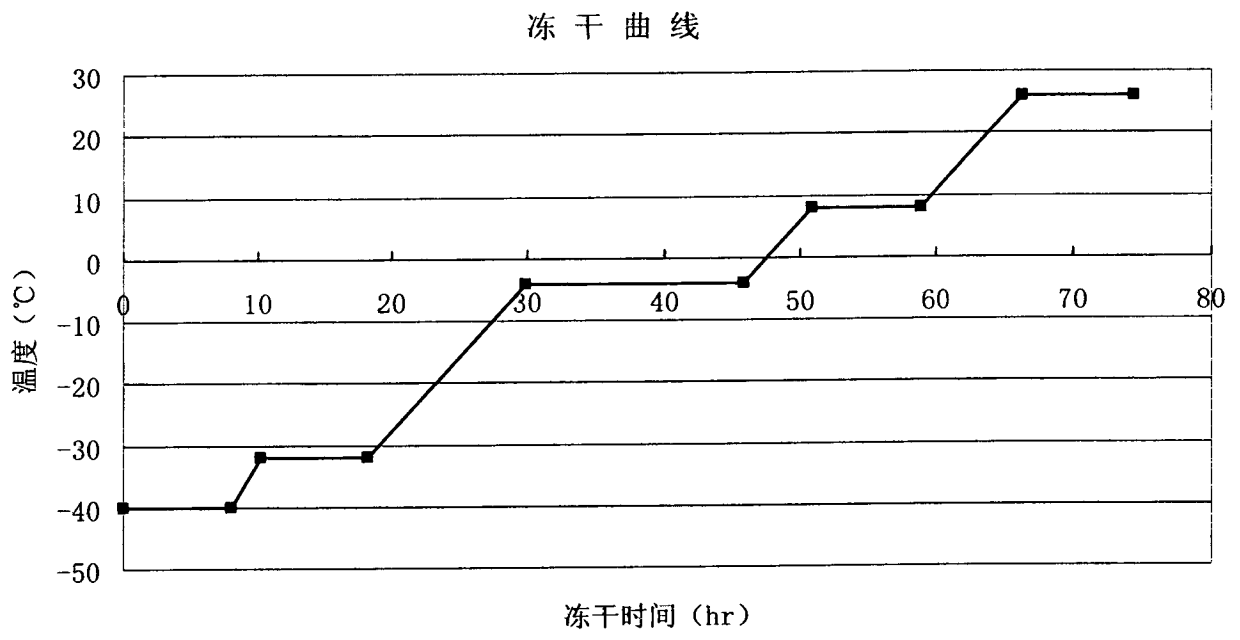


图 1