



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105315360 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 10

(21) 申请号 201510748334. 1

(22) 申请日 2015. 11. 06

(71) 申请人 上海洲跃生物科技有限公司

地址 201306 上海市浦东新区新城路 2 号 24 幢 N3925 室

(72) 发明人 李春洲

(51) Int. Cl.

C07K 14/755(2006. 01)

C07K 14/75(2006. 01)

C07K 1/36(2006. 01)

C07K 1/34(2006. 01)

C07K 1/30(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

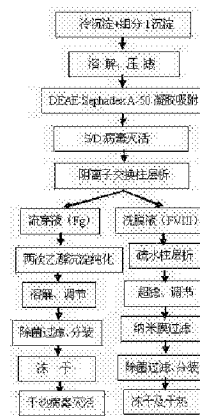
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种冷沉淀与组分 I 沉淀混合投料同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,步骤包括:(1)冷沉淀与组分 I 同时投料、溶解;(2)DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附;(3)S/D 病毒灭活;(4)阴离子交换柱层析;(5)层析穿透液经两步低温乙醇沉淀纯化、除菌过滤、分装、冻干及干热病毒灭活制得人纤维蛋白原;(6)层析洗脱液进一步疏水柱层析;(7)疏水柱洗脱液经超滤、纳米膜过滤、除菌过滤、分装、冻干及干热病毒灭活制得高纯人凝血因子 VIII。本发明工艺将两种原料均含有的 FVIII 与 Fg 同时提取出来,大大提高了两种产品的得率,其中人凝血因子 VIII 可达 20 万 IU/吨血浆,人纤维蛋白原超过 2000 瓶/吨血浆,均远高于传统工艺。



1. 一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在于:生产流程包括如下步骤:

(1) 冷沉淀与组分 I 沉淀制取

将新鲜冰冻血浆融化,保持血浆温度在 1-3℃,离心得到冷沉淀,保持 0-5℃,暂存;在去冷沉淀血浆中加入 -20℃ 以下的低温 95% 乙醇,使血浆中乙醇含量约 7-9%,调节 PH 值至 6.80-7.00,在 -1~-3℃ 下离心得到组分 I 沉淀;然后立即将冷沉淀与组分 I 沉淀合并在一起,切成碎块;

(2) 冷沉淀与组分 I 沉淀共溶解并压滤

按 1:10~20 的重量比,将切成碎块的新鲜冷沉淀及组分 I 沉淀一起投入预先配制的溶解缓冲液 1 中,温度控制在 15-30℃,搅拌 2.5-5 小时,使其充分溶解;然后用 PALL 公司生产的 Supradur 50P 滤板串联 0.45μm 滤芯压滤,收集澄清滤液;过滤前用溶解缓冲液 1 预洗滤板及滤芯;

(3) DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附并过滤

在步骤(2)收集的滤液中加入预先用 65℃ 以上的热注射用水溶胀后用 25℃ 以下的冷注射用水冷却再用步骤(2)所述溶解缓冲液 1 平衡的 DEAE Sephadex A-50 凝胶,按凝胶溶胀前的重量(干重)计,凝胶的加入量为 0.5-1.5 克/kg 溶解缓冲液 1;凝胶加入到滤液后缓慢搅拌 45-75 分钟,后静置 5-10 分钟;然后过滤,收集滤液;

(4) S/D 病毒灭活

在步骤(3)收集的滤液中加入 Tween80 至 1.0% (wt%), TNBP (磷酸三丁酯) 至 0.3% (wt%), 搅匀后升温至 24-26℃, 后保温 6-8 小时, 然后用 0.45μm 滤芯过滤, 收集滤液;

(5) 阴离子交换柱层析

步骤(4)收集的滤液上阴离子交换柱进行层析,柱子预先用平衡缓冲液 1 充分平衡;上柱过程中,收集穿透液,上柱结束后,用平衡缓冲液 1 冲洗柱子,将冲洗液并入穿透液中;后用洗涤缓冲液 1 洗涤柱子,再用洗脱缓冲液 1 洗脱柱子,收集洗脱液即为纯化的 FVIII 溶液,及时用 0.45μm 滤芯进行过滤,收集滤液;洗脱液的滤液按照以下 6A-11A 步骤进行,而流穿液按 6B-11B 步骤进行;

(6A) 疏水柱层析;以上洗脱液滤液中加入氯化钠至 1.8M-2.5M, 然后上疏水柱, 柱子预先用平衡缓冲液 2 充分平衡;上柱结束后用平衡缓冲液 2 冲洗柱子,后用洗涤缓冲液 2 洗涤柱子,再用洗脱缓冲液 2 洗脱,收集洗脱液即为高纯 FVIII 溶液;用 0.45μm 或 0.22μm 滤芯过滤,收集滤液;

(7A) 用 10K~30K 的超滤膜浓缩以上滤液,然后恒体积透析 4-6 倍,再浓缩至凝血 FVIII 活力高于 35IU/ml; 后移出超滤膜包并后洗膜包;

(8A) 调节 FVIII 含量至所需值(一般规格为 20-30IU/ml), 加入稳定剂, 后调 PH 值至 6.50-7.50;

(9A) 用 0.1μm 滤芯串联 15-20 纳米滤芯进行除病毒过滤

(10A) 用 0.22μm 滤芯对产品进行除菌过滤并分装;

(11A) 冻干;

(12A) 干热病毒灭活

将人凝血因子 VIII 冻干制剂在 100℃ 沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活;

(6B) 将流穿液温度降至  $-2\sim 0^{\circ}\text{C}$  时, 缓慢加入  $-20^{\circ}\text{C}$  以下的低温 95% 乙醇溶液至浓度为 7-9% (V/V), 调节 PH 值至 6.80-7.20, 保持温度  $-3.0\sim 0^{\circ}\text{C}$ , 均匀搅拌 1.5-3 小时后离心, 得到第一次 Fg 沉淀, 立即切碎;

(7B) 按 1:10-20 的稀释比, 将以上切碎的新鲜 Fg 沉淀投入预先配制的溶解缓冲液 2 中溶解, 在  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$  下均匀搅拌 2-3 小时; 用 30SP 深层滤芯 (3M 公司 CUNO 滤芯) 串联一只  $1.0\mu\text{m}$  的滤芯过滤悬浮液; 用上述溶解缓冲液 2 后洗滤芯, 收集滤液;

(8B) 将滤液降温至  $-1^{\circ}\text{C}$  左右, 缓慢加入低温乙醇 (不高于  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 至 7-9%; 搅拌 2-3 小时, 低温 ( $-2\sim 0^{\circ}\text{C}$ ) 离心, 得到第二次 Fg 沉淀, 立即切碎;

(9B) 根据终产品的蛋白浓度要求 (一般为 2.5-6.0%), 将以上切碎的新鲜沉淀投入预先配制的溶解缓冲液 3 中, 在  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$  下搅拌 0.5-2 小时, 后调节蛋白浓度至所需值, 调 PH 值至 6.50-7.50, 用  $0.45\mu\text{m}$  的滤芯过滤并用溶解缓冲液 3 后洗滤芯, 收集滤液;

(10B) 除菌过滤并分装;

(11B) 冻干;

(12B) 干热病毒灭活

将人纤维蛋白原冻干制剂在  $100^{\circ}\text{C}$  沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活。

2. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤 (2) 所述的溶解缓冲液 1 的组成为 0.01M-0.02M TRIS (三羟甲基氨基甲烷)、0.03M-0.06M 柠檬酸钠、0.02M-0.04M 赖氨酸盐酸盐、0.1M-0.15M 氯化钠, 其余为水; 溶解缓冲液中同时加入肝素钠, 加入量为 3000-12000IU/kg 溶解缓冲液 1; 所述溶解缓冲液 1 的 PH6.50-7.50。

3. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤 (5) 所述的阴离子交换柱所用填料为 Capto DEAE, Q-Sepharose FF, Q-Sepharose 4FF, Q-Sepharose HP 及 Capto Q 中的任意一种; 所述的平衡缓冲液 1 组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.03M-0.06M 柠檬酸钠, 0.02-0.04M 赖氨酸盐酸盐, 0.1M-0.15M 氯化钠, 0.005M-0.015M 氯化钙, 其余为水; 所述平衡缓冲液 1 的 PH6.50-7.50; 所述洗涤缓冲液 1 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.2M-0.3M 氯化钠, 0.005M-0.015M 氯化钙, 其余为水; 所述洗涤缓冲液 1 的 PH6.50-7.50; 所述洗脱缓冲液 1 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.5M-2.0M 氯化钠, 0.001M-0.005M 氯化钙, 其余为水; 所述洗脱缓冲液 1 的 PH6.50-7.50。

4. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤 (6A) 所述的疏水柱所用填料为 Capto Phenyl (LS), Phenyl Sepharose 6FF (LS), Octyl Sepharose 4FF 中的任意一种; 所述的平衡缓冲液 2 组成为 0.01M-0.02M TRIS, 1.8M-2.5M 氯化钠, 0.01M-0.02M 氯化钙, 其余为水; 所述的平衡缓冲液 2 的 PH6.50-7.50; 所述的洗涤缓冲液 2 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.6M-1.6M 氯化钠, 0.01-0.02M 氯化钙, 其余为水; 所述的洗涤缓冲液 2 的 PH6.50-7.50; 所述的洗脱缓冲液 2 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.001M-0.003M 氯化钙, 其余为水; 所述洗脱缓冲液 2 的 PH6.50-7.50。

5. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤 (7B) 所述的溶解缓冲液 2 组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.03M-0.06M 柠檬酸钠, 0.5-3% 甘氨酸, 0.5-3% 精氨酸盐酸盐, 0.075M-0.15M 氯化钠, 其余为水; 所述的

溶解缓冲液 2 的 PH 6.50-7.50。

6. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤(8A)所述的 FVIII 的稳定剂为甘氨酸, 所述的甘氨酸的浓度为 0.5-3%。

7. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤(9B)所述的溶解缓冲液 3 组成为 0.03M-0.06M 柠檬酸钠, 0.01M-0.15M 氯化钠, 甘氨酸 0.5-3%, 精氨酸盐酸盐 0.5-3%, 其余为水; 所述的溶解缓冲液 3 的 PH6.50-7.50。

8. 根据权利要求 1-7 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 冷沉淀与组分 I 沉淀分别从冰冻血浆中制取, 投料时将冷沉淀与组分 I 沉淀混和。

9. 根据权利要求 1-8 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 冷沉淀与组分 I 沉淀混和投料并充分溶解后用压滤而不是离心的方法获得上清液。

10. 根据权利要求 1-9 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 人凝血因子 VIII 冻干制剂经过 S/D、纳米膜过滤及干热三步病毒灭活步骤, 人纤维蛋白原冻干制剂经过 S/D 及干热两步病毒灭活步骤。

## 一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属生物制药领域,涉及一种血液制品的制备,具体讲是涉及一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法。

### 背景技术

[0002] 人凝血因子 VIII (FVIII) 是在肝脏中合成的人体凝血因子之一,有 2332 个氨基酸残基,由两条肽链所组成,重链分子量为 90 ~ 200kDa;轻链分子量为 80kDa,二条肽链间由  $\text{Ca}^{2+}$  连接。在人体内的半衰期 8~12 小时,血浆中的含量仅为 0.05 ~ 0.1mg/升。FVIII 缺乏会导致甲型血友病发生,该病是一种遗传性疾病,患者多为男性,发病率约 1/10000~1/5000,患者出血部位集中于关节、肌肉和内脏。其中,关节反复出血导致骨骼变形,肌肉萎缩;而内脏和颅内出血则会危及生命。甲型血友病因属遗传性疾病,目前尚无根治的方法,只能通过输注 F VIII 制剂进行替代性治疗,只要定期输注 F VIII 制剂,甲型血友病患者完全可以像正常人一样生活。

[0003] 人纤维蛋白原(human fibrinogen,简称 Fg),是一种含 2964 个氨基酸、具有凝血功能的蛋白质,由肝脏合成,它是人体所有凝血因子中含量最大的一种,血浆中含量 2 ~ 4 克/升,分子量 340KD,半衰期 4 ~ 6 日,等电点 5.10-5.50,沉降系数 7.70-7.90。Fg 由  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三对不同多肽链所组成,多肽链间以二硫键相连。人体凝血的最后阶段是在凝血酶作用下,Fg 的  $\alpha$  链与  $\beta$  链分别释放出 A 肽与 B 肽,生成纤维蛋白单体,进一步在  $\text{Ca}^{2+}$  与活化的 XIII 因子作用下,单体之间以共价键相连,变成稳定的不溶性纤维蛋白凝块,从而完成凝血过程。Fg 缺乏会导致各类凝血方面的疾病,常见的包括:先天性纤维蛋白原减少或缺乏症,以及因肝损伤、肝硬化、弥散性血管内凝血、外伤、产后大出血、大手术、内出血等导致的后天性纤维蛋白原缺乏症。因先天因素引起的 Fg 减少或缺乏症,补充 Fg 是目前唯一可靠的治疗方法,而对于后天因素引起的 Fg 减少或缺乏,根据病因的不同,也需输注不同剂量的 Fg。Fg 除直接参与凝血过程外,还可介导血小板聚集,影响血液粘度,是心脑血管病发病的重要危险因素,在动脉粥样硬化的形成及肿瘤血行转移等病理过程中也起重要作用。

[0004] 近年来,一种具有高效止血功能的外科用血液制品——人纤维蛋白粘合剂在临床上的应用越来越广泛,也使得作为该药配伍之一的高浓度人纤维蛋白原的需求量大增。人纤维蛋白粘合剂所用的 Fg 与常规静脉输注的 Fg 很大的不同,主要体现在前者具有很高的蛋白浓度,至少是后者(一般为 2.5%)的二倍或者更高。

[0005] Fg 制品最大的问题在于冻干粉复溶时间长且溶解时需在 30-37℃ 的水浴中进行,另一个问题是容易产生蛋白析出及蛋白颗粒悬浮,这给临床使用带来了不便,譬如必须提前从冰箱里取出置于水浴中,静脉输注时需配备过滤装置。低浓度人纤维蛋白原尚且如此,高浓度人纤维蛋白原的复溶就更困难了。因此用常规的人纤维蛋白原生产工艺很难制备出合格的高浓度纤维蛋白原产品。

[0006] 目前,国内血制品公司供应市场的 F VIII 产品数量十分有限,患者经常面临无药可用的情况,严重危害患者的健康和生命安全。国内目前血制品厂家的 FVIII 制备工艺得率普遍较低,一般不高于 10 万 IU/吨血浆(FVIII 含量一般为 70~80 万 IU/吨血浆),同时产品纯度不高,比活一般不高于 50IU/mg,另外产品的外观欠佳,冻干粉不成饼状,复溶后乳光较重,有的还有蛋白析出。

[0007] 目前我国也仅有少数几家血制品公司具有人纤维蛋白原的生产能力,但产量均不大,有的公司生产断断续续,基本处于停顿状态,因而纤维蛋白原在临床上也处于供应不足的状态,作为人纤维蛋白粘合剂配伍的高浓度人纤维蛋白原,由于技术难度较高,国内仅个别厂家有能力生产。

[0008] 传统的生产工艺,大都是用冷沉淀生产人凝血因子 VIII,用组分 I 生产人纤维蛋白原,这种工艺的缺点在于,冷沉淀中含有的纤维蛋白原(约占血浆 Fg 的 20%)被当作生产废料扔掉了;同样地,组分 I 中含有的大量 FVIII 也未回收利用而白白损失。

[0009] 鉴于此,本发明开发了一种冷沉淀与组分 I 沉淀混合投料,同时制备高纯 FVIII 与人纤维蛋白原的新工艺,降低了劳动强度,缩短了生产周期,大大提高了 FVIII 与 Fg 的得率与纯度,明显改善了人纤维蛋白原的品质,使得高浓度纤维蛋白原的外观得到明显改善,复溶时间大大缩短,可以大规模进行生产。

## 发明内容

[0010] 本发明所要解决的技术问题是提供一种工艺稳定、产品质量好、得率高、生产成本低及生产效率高的同时制备人凝血因子 VIII 及纤维蛋白原的方法。

[0011] 1. 一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在于:生产流程包括如下步骤:

### (1) 冷沉淀与组分 I 沉淀制取

将新鲜冰冻血浆融化,保持血浆温度在 1~3℃,离心得到冷沉淀,保持 0~5℃,暂存;在去冷沉淀血浆中加入 -20℃ 以下的低温 95% 乙醇,使血浆中乙醇含量约 7~9%,调节 PH 值至 6.80~7.00,在 -1~-3℃ 下离心得到组分 I 沉淀;然后立即将冷沉淀与组分 I 沉淀合并在一起,切成碎块;

### (2) 冷沉淀与组分 I 沉淀共溶解并压滤

按 1:10~20 的重量比,将切成碎块的新鲜冷沉淀及组分 I 沉淀一起投入预先配制的溶解缓冲液 1 中,温度控制在 15~30℃,搅拌 2.5~5 小时,使其充分溶解;然后用 PALL 公司生产的 Supradur 50P 滤板串联 0.45μm 滤芯压滤,收集澄清滤液;过滤前用溶解缓冲液 1 预洗滤板及滤芯;

### (3) DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附并过滤

在步骤(2)收集的滤液中加入预先用 65℃ 以上的热注射用水溶胀后用 25℃ 以下的冷注射用水冷却再用步骤(2)所述溶解缓冲液 1 平衡的 DEAE Sephadex A-50 凝胶,按凝胶溶胀前的重量(干重)计,凝胶的加入量为 0.5~1.5 克/kg 溶解缓冲液 1;凝胶加入到滤液后缓慢搅拌 45~75 分钟,后静置 5~10 分钟;然后过滤,收集滤液;

### (4) S/D 病毒灭活

在步骤(3)收集的滤液中加入 Tween80 至 1.0% (wt%), TNBP (磷酸三丁酯) 至 0.3%

(wt%), 搅匀后升温至 24-26°C, 后保温 6-8 小时, 然后用 0.45 $\mu$ m 滤芯过滤, 收集滤液;

(5) 阴离子交换柱层析

步骤(4)收集的滤液上阴离子交换柱进行层析, 柱子预先用平衡缓冲液 1 充分平衡; 上柱过程中, 收集穿透液, 上柱结束后, 用平衡缓冲液 1 冲洗柱子, 将冲洗液并入穿透液中; 后用洗涤缓冲液 1 洗涤柱子, 再用洗脱缓冲液 1 洗脱柱子, 收集洗脱液即为纯化的 FVIII 溶液, 及时用 0.45 $\mu$ m 滤芯进行过滤, 收集滤液; 洗脱液的滤液按照以下 6A-11A 步骤进行, 而流穿液按 6B-11B 步骤进行;

(6A) 疏水柱层析; 以上洗脱液滤液中加入氯化钠至 1.8M-2.5M, 然后上疏水柱, 柱子预先用平衡缓冲液 2 充分平衡; 上柱结束后用平衡缓冲液 2 冲洗柱子, 后用洗涤缓冲液 2 洗涤柱子, 再用洗脱缓冲液 2 洗脱, 收集洗脱液即为高纯 FVIII 溶液; 用 0.45 $\mu$ m 或 0.22 $\mu$ m 滤芯过滤, 收集滤液;

(7A) 用 10K~30K 的超滤膜浓缩以上滤液, 然后恒体积透析 4-6 倍, 再浓缩至凝血 FVIII 活力高于 35IU/ml; 后移出超滤膜包并后洗膜包;

(8A) 调节 FVIII 含量至所需值(一般规格为 20-30IU/ml), 加入稳定剂, 后调 PH 值至 6.50-7.50;

(9A) 用 0.1 $\mu$ m 滤芯串联 15-20 纳米滤芯进行除病毒过滤

(10A) 用 0.22 $\mu$ m 滤芯对产品进行除菌过滤并分装;

(11A) 冻干;

(12A) 干热病毒灭活

将人凝血因子 VIII 冻干制剂在 100°C 沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活;

(6B) 将流穿液温度降至 -2~0°C 时, 缓慢加入 -20°C 以下的低温 95% 乙醇溶液至浓度为 7-9% (V/V), 调节 PH 值至 6.80-7.20, 保持温度 -3.0~0°C, 均匀搅拌 1.5-3 小时后离心, 得到第一次 Fg 沉淀, 立即切碎;

(7B) 按 1:10-20 的稀释比, 将以上切碎的新鲜 Fg 沉淀投入预先配制的溶解缓冲液 2 中溶解, 在 20-30°C 下均匀搅拌 2-3 小时; 用 30SP 深层滤芯 (3M 公司 CUNO 滤芯) 串联一只 1.0 $\mu$ m 的滤芯过滤悬浮液; 用上述溶解缓冲液 2 后洗滤芯, 收集滤液;

(8B) 将滤液降温至 -1°C 左右, 缓慢加入低温乙醇(不高于 -20°C) 至 7-9%; 搅拌 2-3 小时, 低温(-2~0°C) 离心, 得到第二次 Fg 沉淀, 立即切碎;

(9B) 根据终产品的蛋白浓度要求(一般为 2.5-6.0%), 将以上切碎的新鲜沉淀投入预先配制的溶解缓冲液 3 中, 在 20-30°C 下搅拌 0.5-2 小时, 后调节蛋白浓度至所需值, 调 PH 值至 6.50-7.50, 用 0.45 $\mu$ m 的滤芯过滤并用溶解缓冲液 3 后洗滤芯, 收集滤液;

(10B) 除菌过滤并分装;

(11B) 冻干;

(12B) 干热病毒灭活

将人纤维蛋白原冻干制剂在 100°C 沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活。

[0012] 2. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法, 其特征在于: 步骤(2)所述的溶解缓冲液 1 的组成为 0.01M-0.02M TRIS(三羟甲基氨基甲烷)、0.03M-0.06M 柠檬酸钠、0.02M-0.04M 赖氨酸盐酸盐、0.1M-0.15M 氯化钠, 其余为水; 溶解缓冲液中同时加入肝素钠, 加入量为 3000-12000IU/kg 溶解缓冲液 1; 所述溶解缓

冲液 1 的 PH6.50-7.50。

[0013] 3. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於: 步骤(5)所述的阴离子交换柱所用填料为 Capto DEAE, Q-Sepharose FF, Q-Sepharose 4FF, Q-Sepharose HP 及 Capto Q 中的任意一种;所述的平衡缓冲液 1 组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.03M-0.06M 柠檬酸钠, 0.02-0.04M 赖氨酸盐酸盐, 0.1M-0.15M 氯化钠, 0.005M-0.015M 氯化钙, 其余为水;所述平衡缓冲液 1 的 PH6.50-7.50;所述洗涤缓冲液 1 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.2M-0.3M 氯化钠, 0.005M-0.015M 氯化钙, 其余为水;所述洗涤缓冲液 1 的 PH6.50-7.50;所述洗脱缓冲液 1 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.5M-2.0M 氯化钠, 0.001M-0.005M 氯化钙, 其余为水;所述洗脱缓冲液 1 的 PH6.50-7.50。

[0014] 4. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於: 步骤(6A)所述的疏水柱所用填料为 Capto Phenyl (LS), Phenyl Sepharose 6FF (LS), Octyl Sepharose 4FF 中的任意一种;所述的平衡缓冲液 2 组成为 0.01M-0.02M TRIS, 1.8M-2.5M 氯化钠, 0.01M-0.02M 氯化钙, 其余为水;所述的平衡缓冲液 1 的 PH6.50-7.50;所述的洗涤缓冲液 2 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.6M-1.6M 氯化钠, 0.01-0.02M 氯化钙, 其余为水;所述的洗涤缓冲液 2 的 PH6.50-7.50;所述的洗脱缓冲液 2 的组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.001M-0.003M 氯化钙, 其余为水;所述洗脱缓冲液 2 的 PH6.50-7.50。

[0015] 5. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於: 步骤(7B)所述的溶解缓冲液 2 组成为 0.01M-0.02M TRIS, 0.03M-0.06M 柠檬酸钠, 0.5-3% 甘氨酸, 0.5-3% 精氨酸盐酸盐, 0.075M-0.15M 氯化钠, 其余为水;所述的溶解缓冲液 2 的 PH 6.50-7.50。

[0016] 6. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於: 步骤(9B)所述的溶解缓冲液 3 组成为 0.03M-0.06M 柠檬酸钠, 0.01M-0.15M 氯化钠, 甘氨酸 0.5-3%, 精氨酸盐酸盐 0.5-3%, 其余为水;所述的溶解缓冲液 3 的 PH6.50-7.50。

[0017] 7. 根据权利要求 1 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於: 步骤(8A)所述的 FVIII 的稳定剂为甘氨酸,所述的甘氨酸的浓度为 0.5-3%。

[0018] 8. 根据权利要求 1-7 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於:分别从冰冻血浆中制取冷沉淀与组分 I 沉淀,但将冷沉淀与组分 I 沉淀混和投料用于 FVIII 与 Fg 的生产,且投料时冷沉淀与组分 I 均为新鲜组分,未经冷冻储存。

[0019] 9. 根据权利要求 1-8 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於:冷沉淀与组分 I 沉淀混和投料并充分溶解后用压滤而不是离心的方法获得上清液。

[0020] 10. 根据权利要求 1-9 所述的一种同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的方法,其特征在於:人凝血因子 VIII 冻干制剂经过 S/D、纳米膜过滤及干热三步病毒灭活步骤,人纤维蛋白原制剂经过 S/D 及干热两步病毒灭活步骤。

[0021] 本发明的优势:



1, 本发明采用冷沉淀与组分 I 沉淀混和后一起投料, 同时制备 FVIII 与 Fg, 明显提高了生产效率, 减少了劳动强度, 节省化学品与耗材, 特别是冷沉淀与组分 I 中所含的 Fg 同时被提取, 使得 Fg 的得率明显提高, 可达 2000 瓶 / 吨血浆以上 (0.5 克 / 瓶); 同样地, 冷沉淀与组分 I 中所含的 FVIII 一同被提取, 也使 FVIII 的得率明显提高, 可达 20 万 IU / 吨血浆以上; 两种产品的得率均远高于传统工艺;

2, 本发明因采用 DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附去除悬浮液中的维生素 K 依赖的凝血因子 (FII, FVII, FIX, FX) 代替传统的氢氧化铝凝胶吸附或 PEG 沉淀, 减少了 FVIII 与 Fg 的损失, 也使 FVIII 与 Fg 的得率进一步提高;

3, 本发明采用离子交换层析结合疏水层析, 大幅提高了 FVIII 的纯度, 比活 250IU/mg 左右, 远高于传统工艺制备的产品 (不大于 50IU/mg);

4, 本发明因采用 DEAE Sephadex A-50 凝胶吸附去除了悬浮液中的维生素 K 依赖的凝血因子 (FII, FVII, FIX, FX), 使得 Fg 在生产过程被凝血酶激活的概率明显下降, 同时由于经过了柱层析精制, 使得 Fg 的纯度明显提高 (>85%), 终产品的品质 (如复溶时间及外观等) 明显改善;

5, 本发明在悬浮液预处理阶段采用压滤法取代离心法, 避免了高速离心过程中强剪切力及泡沫, 从而减少了蛋白变性失活的机会, FVIII 及 Fg 产品更加稳定;

6, 本发明生产工艺制备的 FVIII 为白色均匀海绵状, 复溶时间极快, 复溶液澄清, 无蛋白析出, 几乎无乳光;

7, 本发明生产工艺制备的 Fg 冻干粉为白色均匀海绵状, 复溶时间很快, 复溶液澄清, 无乳光, 无蛋白析出亦无蛋白颗粒。

## 附图说明

[0022] 图 1 是同时制备高纯人凝血因子 VIII 及人纤维蛋白原的工艺流程图。

## 具体实施方式

下面结合附图及实施例对本发明做进一步的说明, 不能认为本发明的实施方式仅限于此, 对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说, 在不脱离本发明构思的前提下所做出的若干简单的改变或替换, 都应视为属于本发明权利要求书确定的专利保护范围。

[0023] 实施例一

1, 按工艺流程步骤 1 所述的方法制备冷沉淀与组分 I 沉淀, 称取冷沉淀与组分 I 沉淀各 0.5kg, 一起投入 10kg 预先配制的溶解缓冲液 1 中, 溶解缓冲液 1 组成为 0.02M TRIS-HCL, 0.06M 柠檬酸钠, 0.02M 赖氨酸盐酸盐, 0.15M NaCL, PH6.90-7.10; 溶解缓冲液 1 中预先加入肝素钠至 6000IU/kg; 温度控制在 25-30°C, 搅拌 2 小时使其充分溶解; 然后用颇尔公司生产的 Supradur 50P 滤板串联 0.45 $\mu$ m 滤芯过滤, 收集滤液; 过滤前用溶解缓冲液 1 预洗滤板及滤芯;

2, 以上滤液中加入预先溶胀、冷却并用上一步骤所述的溶解缓冲液 1 平衡的 DEAE Sephadex A-50 凝胶, 凝胶按干胶计加入量为 5.5g; 缓慢搅拌 1 小时, 后静置 10 分钟; 然后用滤布过滤, 收集滤液;

3, 以上滤液中加入 Tween80 至 1.0% (wt%), TNBP (磷酸三丁酯) 至 0.3% (wt%), 搅匀

后升温至 24-26℃,后保温 6 小时,然后用 0.45μm 滤芯过滤,收集滤液;

4, 以上滤液上 Capto Q 柱,柱子预先用平衡缓冲液 1 充分平衡,平衡缓冲液 1 组成为 0.02M TRIS-HCL,0.03M 柠檬酸钠,0.02M 赖氨酸盐酸盐,0.15M NaCL, 0.015M $CaCl_2$ , PH6.80-7.00);用带冷媒夹套的不锈钢罐收集流穿液;上柱结束后,用平衡缓冲液 1 冲洗柱子,冲洗液并入流穿液;用洗涤缓冲液 1 (0.02M TRIS-HCL, 0.2M NaCL, 0.015M $CaCl_2$ , PH6.80-7.00) 洗涤柱子,再用洗脱缓冲液 1 (0.02M TRIS-HCL, 2.5M NaCL, 0.002M $CaCl_2$ , PH6.80-7.00) 洗脱,及时用 0.45μm 滤芯进行过滤,收集滤液;滤液直接上 Capto Phenyl (LS), 柱子预先用平衡缓冲液 2 充分平衡,平衡缓冲液 2 组成为 0.02M TRIS-HCL, 2.5MNaCL, 0.01M $CaCl_2$ , PH6.80-7.00;上柱结束后,用平衡缓冲液 2 冲洗柱子,后用洗涤缓冲液 2(0.02M TRIS-HCL,0.8M NaCL,0.01M  $CaCl_2$ , PH6.80-7.00)洗涤柱子,再用洗脱缓冲液 2 (0.02M TRIS-HCL,0.002M  $CaCl_2$ , PH6.80-7.00)洗脱,收集洗脱液;用 0.45μm 滤芯过滤以上洗脱液,收集滤液;用 10K 的超滤膜浓缩以上滤液,然后恒体积透析 5 倍,再浓缩至凝血 FVIII 活力高于 35IU/ml;后移出超滤膜包并后洗膜包;调节 FVIII 含量至所 30IU/ml,加入甘氨酸至 3%,后调 PH 值至 6.50-7.50;用 0.1μm 滤芯串联 20 纳米滤芯进行除病毒过滤;用 0.22μm 滤芯对产品进行除菌过滤并分装;然后进冻干机进行冻干,获得 FVIII 冻干制剂;将 FVIII 冻干制剂在 100℃沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活;

5, 将步骤 4 收集的流穿液温度降至 -3~0℃时,缓慢加入低温 95% 乙醇溶液(温度不高于 -20℃)至浓度为 7-9% (V/V), 调解 PH 值至 6.80-7.00, 保持温度 -3~-1℃, 均匀搅拌 3 小时后离心,得到一次 Fg 沉淀;将此 Fg 沉淀立即摊薄切碎成小块,按 1:20 的稀释比,将切碎后的沉淀投入预先配制的溶解缓冲液中 (0.02M TRIS, 0.06M 柠檬酸钠, 1% 甘氨酸, 1% 精氨酸盐酸盐,0.15M 氯化钠,PH 6.80-7.00) 溶解,25-30℃下均匀搅拌 2 小时;用 30SP 深层滤芯 (3M 公司 CUNO 滤芯) 串联一只 1.0μm 的滤芯过滤悬浮液;用上述溶解缓冲液后洗滤芯,收集滤液;将滤液降温至 -1℃左右,缓慢加入低温乙醇(不高于 -20℃)至 7-9%;搅拌 2 小时,低温(-3~-1℃)离心,收集沉淀,弃上清液;按 1:6 的稀释比,用溶解缓冲液(0.06M 柠檬酸钠, 精氨酸盐酸盐 1.5%,甘氨酸 1.5%,0.15M NaCL, PH6.90-7.10) 溶解收集的沉淀,在 25-30℃下搅拌 1 小时,用一只 0.45μm 的滤芯过滤悬浮液并用溶解缓冲液后洗滤芯,收集滤液;将蛋白浓度至 2.50-3.0%;除菌分装;送进冻干机进行冻干,获得 Fg 冻干制剂;将 Fg 冻干制剂在 100℃沸水浴中保温 30 分钟,进行干热病毒灭活。

#### [0024] 实施例二

1, 同实施例一;

2, 以上滤液中加入预先溶胀、冷却并用上步所述的溶解缓冲液 1 平衡的 DEAE Sephadex A-50 凝胶,凝胶按干胶计加入量为 11g, PH6.90-7.10;缓慢搅拌至少 45 分钟,后静置 30 分钟;然后用滤布过滤,收集滤液;

3, 同实施例一;

4, 以上病毒灭活后的滤液上 Capto DEAE 柱,柱子预先用平衡缓冲液 1 充分平衡,平衡缓冲液 1 组成为 0.02M TRIS-HCL,0.06M 柠檬酸钠,0.02M 赖氨酸盐酸盐,0.1M NaCL, 0.01M $CaCl_2$  PH7.40-7.50);用带冷媒夹套的不锈钢罐收集流穿液,上柱结束后,用平衡缓冲液 1 冲洗柱子,冲洗液并入流穿液;后用洗涤缓冲液 1 (0.02M TRIS-HCL, 0.3M NaCL, 0.01M $CaCl_2$ , PH7.40-7.50) 洗涤柱子,再用洗脱缓冲液 1 (0.02M TRIS-HCL,0.6M NaCL,

0.001M $\text{CaCl}_2$  , PH7.40-7.50) 洗脱, 及时用 0.45 $\mu\text{m}$  滤芯进行过滤, 收集滤液; 加入 NaCl 至 2.2M, 上 Phenyl Sepharose 6FF (LS), 柱子预先用平衡缓冲液 2 充分平衡, 平衡缓冲液 2 组成为 0.02M TRIS-HCL, 2.2MNaCl, 0.01M $\text{CaCl}_2$  , PH7.40-7.50; 上柱结束后, 用平衡缓冲液冲洗柱子, 后用洗涤缓冲液 2(0.02M TRIS-HCL, 1.0M NaCl, 0.01M  $\text{CaCl}_2$  , PH7.40-7.50) 洗涤柱子, 再用洗脱缓冲液 2 (0.02M TRIS-HCL, 0.002M  $\text{CaCl}_2$  , PH7.40-7.50) 洗脱, 收集洗脱液; 用 0.45 $\mu\text{m}$  滤芯过滤以上洗脱液; 用 30K 的超滤膜浓缩以上滤液, 然后恒体积透析 4 倍, 再浓缩至凝血 FVIII 活力高于 35IU/ml; 后移出超滤膜包并后洗膜包; 调节 FVIII 含量至所 30IU/ml, 加入甘氨酸至 1.5%, 后调 PH 值至 6.90-7.10; 用 0.1 $\mu\text{m}$  滤芯串联 20 纳米滤芯进行除病毒过滤; 用 0.22 $\mu\text{m}$  滤芯对产品进行除菌过滤并分装; 然后进冻干机进行冻干, 获得 FVIII 冻干制剂; 将 FVIII 冻干制剂在 100 $^\circ\text{C}$  沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活;

5, 将步骤 4 收集的流穿液温度降至 -3 $\sim$ 0 $^\circ\text{C}$ , 缓慢加入低温 95% 乙醇溶液(温度不高于 -20 $^\circ\text{C}$ ) 至浓度为 7-9% (V/V), 调解 PH 值至 7.40-7.50, 保持温度 -3 $\sim$ -1 $^\circ\text{C}$ , 均匀搅拌 2 小时后离心, 得到第一次 Fg 沉淀; 将此 Fg 沉淀立即摊薄切碎成小块, 按 1:15 的稀释比, 将切碎后的沉淀投入预先配制的溶解缓冲液中 (0.02M TRIS , 0.04M 柠檬酸钠, 甘氨酸 0.5%, 精氨酸盐酸盐 3%, 0.15M 氯化钠, PH 7.40-7.50) 溶解, 20-25 $^\circ\text{C}$  下均匀搅拌 3 小时; 用 30SP 深层滤芯 (3M 公司 CUNO 滤芯) 串联一只 1.0 $\mu\text{m}$  的滤芯过滤悬浮液; 用上述溶解缓冲液后洗滤芯, 收集滤液; 将滤液降温至 -1 $^\circ\text{C}$  左右, 缓慢加入低温乙醇(不高于 -20 $^\circ\text{C}$ ) 至 7-9%; 搅拌 3 小时, 低温 (-3 $\sim$ -1 $^\circ\text{C}$ ) 离心得到第二次 Fg 沉淀; 按 1:2.5 的稀释比, 用溶解缓冲液 (0.04M Na-Citrate, 0.05M NaCl , 精氨酸盐酸盐 2%, 甘氨酸 1%, PH6.90-7.10) 溶解收集的沉淀, 在 25-30 $^\circ\text{C}$  下搅拌 2 小时, 用一只 0.45 $\mu\text{m}$  的滤芯过滤悬浮液并用溶解缓冲液后洗滤芯, 收集滤液; 将蛋白浓度至 5.0-5.5%; 除菌分装; 送进冻干机进行冻干, 获得 Fg 冻干制剂; 将 Fg 冻干制剂在 100 $^\circ\text{C}$  沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活。

#### [0025] 实施例三

1~3 同实施例一;

4, 以上病毒灭活后的滤液上 Q Sepharose 4FF 柱, 柱子预先用平衡缓冲液 1 充分平衡, 平衡缓冲液 1 组成为 0.02M TRIS-HCL, 0.05M 柠檬酸钠, 0.04M 赖氨酸盐酸盐, 0.15M NaCl, 0.015M $\text{CaCl}_2$  PH6.60-6.80); 用带冷媒夹套的不锈钢罐收集流穿液; 上柱结束后, 用平衡缓冲液 1 冲洗柱子, 冲洗液并入流穿液; 后用洗涤缓冲液 1 (0.02M TRIS-HCL, 0.2M NaCl, 0.01M $\text{CaCl}_2$  , PH6.60-6.80) 洗涤柱子, 再用洗脱缓冲液 1 (0.02M TRIS-HCL, 1.0M NaCl, 0.003M $\text{CaCl}_2$  , PH6.60-6.80) 洗脱, 及时用 0.45 $\mu\text{m}$  滤芯进行过滤, 收集滤液; 加入 NaCl 至 1.8M, 上 Phenyl Sepharose 6FF (LS), 柱子预先用平衡缓冲液 2 充分平衡, 平衡缓冲液 2 组成为 0.02M TRIS-HCL, 1.8MNaCl, 0.015M $\text{CaCl}_2$  , PH6.60-6.80; 上柱结束后, 用平衡缓冲液 2 冲洗柱子, 后用洗涤缓冲液 2(0.02M TRIS-HCL, 1.2M NaCl, 0.015M  $\text{CaCl}_2$  , PH6.60-6.80) 洗涤柱子, 再用洗脱缓冲液 2 (0.02M TRIS-HCL, 0.001M  $\text{CaCl}_2$  , PH6.90-7.10) 洗脱, 收集洗脱液; 用 0.45 $\mu\text{m}$  滤芯过滤以上洗脱液; 用 10K 的超滤膜浓缩以上滤液, 然后恒体积透析 5 倍, 再浓缩至凝血 FVIII 活力高于 35IU/ml; 后移出超滤膜包并后洗膜包; 调节 FVIII 含量至所 30IU/ml, 加入甘氨酸至 1%, 后调 PH 值至 6.90-7.10; 用 0.1 $\mu\text{m}$  滤芯串联 20 纳米滤芯进行除病毒过滤; 用 0.22 $\mu\text{m}$  滤芯对产品进行除菌过滤并分装; 然后进冻干机进行冻干, 获得 FVIII 冻干制剂; 将 FVIII 冻干制剂在 100 $^\circ\text{C}$  沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活;

5, 将步骤 4 收集的流穿液温度降至  $-3\sim 0^{\circ}\text{C}$  时, 缓慢加入低温 95% 乙醇溶液(温度不高于  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 至浓度为 7-9% (V/V), 调节 PH 值至 6.60-6.80, 保持温度  $-3\sim -1^{\circ}\text{C}$ , 均匀搅拌 2.5 小时后离心, 得到一次 Fg 沉淀; 将此 Fg 沉淀立即摊薄切碎成小块, 按 1:18 的稀释比, 将切碎后的沉淀投入预先配制的溶解缓冲液中 (0.02M TRIS, 0.03M 柠檬酸钠, 甘氨酸 2.5%, 精氨酸盐酸盐 0.5%, 0.15M 氯化钠, PH 7.40-7.50) 溶解,  $20\sim 25^{\circ}\text{C}$  下均匀搅拌 3 小时; 用 30SP 深层滤芯 (3M 公司 CUNO 滤芯) 串联一只  $1.0\mu\text{m}$  的滤芯过滤悬浮液; 用上述溶解缓冲液后洗滤芯, 收集滤液; 将滤液降温至  $-1^{\circ}\text{C}$  左右, 缓慢加入低温乙醇(不高于  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 至 7-9%; 搅拌 3 小时, 低温 ( $-3\sim -1^{\circ}\text{C}$ ) 离心, 收集沉淀, 弃上清液; 按 1:5 的稀释比, 用溶解缓冲液 (0.03M 柠檬酸钠, 0.075M 氯化钠, 精氨酸盐酸盐 2.5%, 甘氨酸 0.5%, PH6.90-7.10) 溶解收集的沉淀, 在  $25\sim 30^{\circ}\text{C}$  下搅拌 1.5 小时, 用一只  $0.45\mu\text{m}$  的滤芯过滤悬浮液并用溶解缓冲液后洗滤芯, 收集滤液; 将蛋白浓度至 2.5-3.0%; 除菌分装; 送进冻干机进行冻干, 获得 Fg 冻干制剂;

6, 将 Fg 冻干制剂在  $100^{\circ}\text{C}$  沸水浴中保温 30 分钟, 进行干热病毒灭活。

[0026] 表 试制品 FVIII 及 Fg 收率及关键技术指标一览表

	试制品 1	试制品 2	试制品 3
冷沉淀投料量, g	503	507	505
组分 I 沉淀投料量, g	508	503	507
FVIII 原液重量, g	456.5	448.3	464.1
FVIII 原液效价, IU/ml	31.5	28.6	30.1
FVIII 收率, IU/升血浆	231.9	228.6	242.5
FVIII 比活, IU/mg	239.4	266.7	241.3
FVIII 冻干粉 复溶时间, 分钟 ( $25^{\circ}\text{C}$ )	2-3	2-4	1-3
FVIII 冻干粉 复溶液外观	澄清, 无析出, 无乳光	澄清, 无析出, 微有乳光	澄清, 无析出, 无乳光
Fg 原液重量, kg	3.01	1.65 (Pr:5%)	3.28
Fg 收率, 瓶/吨血浆 (0.5g/瓶)	2032	2089	2109
Fg 纯度, %	88.9	85.5	91.3
Fg 冻干粉 复溶时间, 分钟 ( $30\sim 37^{\circ}\text{C}$ )	10-13	17-20	8-12
Fg 冻干粉 复溶液外观	澄清, 无析出, 无乳光, 无蛋白颗粒	澄清, 无析出, 微有乳光, 无蛋白颗粒	澄清, 无析出, 无乳光, 无蛋白颗粒

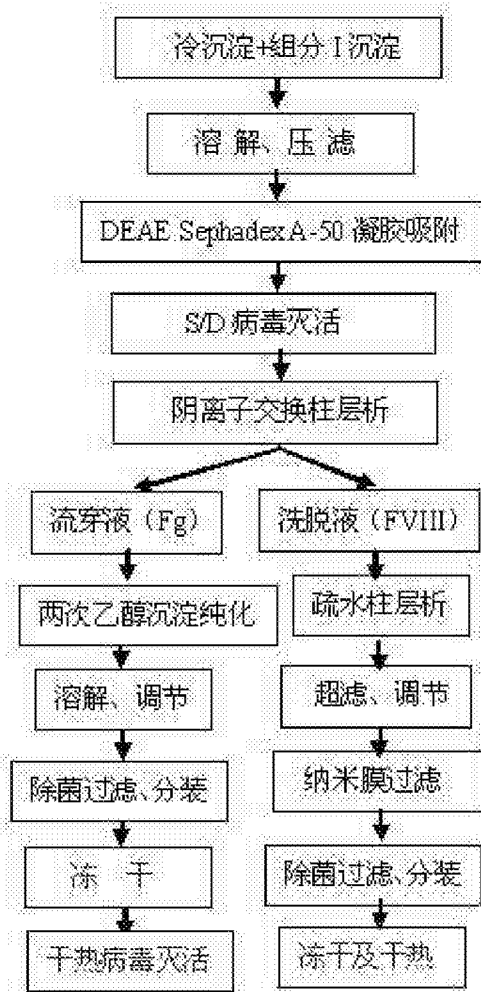


图 1