

• 论 著 •

人凝血因子Ⅷ制品配方研究^{*}

王黔川^{1,2}, 牟 蕾^{2#}, 鲁 涛², 余 伟², 李 伟², 吴传芳^{1△}

(1. 四川大学生命科学学院, 四川成都 610064; 2. 成都蓉生药业有限责任公司, 四川成都 610041)

摘 要:**目的** 摸索一种适用于人凝血因子Ⅷ制品的配方。**方法** 以人凝血因子Ⅷ质量为指标, 进行成分筛选实验, 对选定的成分再进行剂量选择, 获得最终配方、制备成品。进行质量与安全性、稳定性考察, 评估最终配方的效果。**结果** 得到的配方效果令人满意, 经稳定性(2~8 ℃、24 个月; 25 ℃、24 个月; 40 ℃、6 个月)考察证明配方稳定有效。**结论** 研发出一种适合人凝血因子Ⅷ制品的配方。

关键词: 人凝血因子Ⅷ; 配方研究; 效价回收率

DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 08. 003 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2015)07-1015-03

Formulation research of human coagulation factor Ⅷ product^{*}

Wang Qianchuan^{1,2}, Mou Lei^{2#}, Lu Tao², Yu Wei², Li Wei², Wu Chuanfang^{1△}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064; 2. Chengdu Ronsen Pharmaceutical Co., Ltd., Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract:**Objective** To search for a formulation suitable for human coagulation factor Ⅷ (FⅧ) product. **Methods** By using the human FⅧ quality as the indicator, the compositions screening experiment was conducted, then the dosage selection was performed on the selected compositions, finally the formulation was obtained for prepaing the FⅧ product. The quality, safety and stability were investigated. The effect of final formulation was evaluated. **Results** The effect of obtained formulation was satisfactory, which was proved to be stable and effective by the stability test(2—8 ℃×24 months, 25 ℃×24 months, 40 ℃×6 months). **Conclusion** The formulation of FⅧ product suitable for human is developed.

Key words: human coagulation factor Ⅷ; formulation research; titer recovery

甲型血友病是遗传性疾病, 患者血液中人凝血因子Ⅷ(FⅧ)不足, 导致自发或受伤后出血不止, 需终生输注 FⅧ制品。FⅧ制品是从健康人血浆中提取、纯化后富含 FⅧ的血液制品。由于 FⅧ在血浆中含量低, 性质不稳定、易失活, 因此从血浆中纯化 FⅧ后, 为保证 FⅧ的稳定, 需要用配方进行保护; 不同方式提取的 FⅧ制品需要相应的稳定配方。

本文就成都蓉生药业有限责任公司(蓉生公司)生产的 FⅧ制品的配方进行了研究, 针对产品纯度较高, 以及最终产品需经一次 80 ℃、72 h 的干热处理^[1-3]等特性, 研发出适合该产品的最终配方。

1 材料与方法

1.1 FⅧ生产过程和原材料

1.1.1 起始样品 经蓉生公司 FⅧ工艺生产的 FⅧ原液, 系经离子交换层析等工艺制备的富含 FⅧ的溶液, FⅧ效价为约 30~50 IU/mL。

1.1.2 超滤、配制 将本研究中的试剂按配方规定剂量制作

成超滤缓冲液, 对起始样品进行超滤透析; 如配方中含有清蛋白, 则在超滤透析完成后单独按量加入清蛋白; 最终将超滤后溶液配制到一定体积。

1.1.3 除菌、分装和冻干 配制后样品经过除菌过滤, 以每瓶 10 mL 分装到玻璃瓶中, 经冻干, 加盖密封, 为半成品。

1.1.4 干热 半成品用 80 ℃、72 h 干热处理, 成为成品。

1.1.5 配方成分试剂来源 所用的成分(除清蛋白)均为市售药用级试剂, 清蛋白为蓉生公司生产的经批签发的合格成品。

1.2 实验方法

1.2.1 配方判定依据 按《中华人民共和国药典》2010 年版三部(《药典》三部)中人凝血因子Ⅷ产品^[4]成品规定的检测项目和方法进行。配方考察时只关注 FⅧ制品的外观(冻干后、干热后外观和溶解后溶液外观)和效价回收率。配方基本成熟后进行全面质量检测。制品质量合格, 效价回收率越好的, 其配方越符合研究的要求。

表 1 采用 80 ℃、72 h 干热工艺的 FⅧ制品配方表

品名	配方组成
Biostat® ^[8]	蔗糖 1.5%, NaCl 0.06~0.08 mol/L, 枸橼酸钠 0.02 mol/L, CaCl ₂ 3 mmol/L, 清蛋白 10 mg/mL
Koate-DVI ^[9]	甘氨酸<0.05 mol/L, CaCl ₂ <3 mmol/L, 清蛋白<10 mg/mL, 精氨酸<5 μg/mL, 组氨酸<60 mmol/L
Alphanate ^[10]	甘氨酸<0.001 mol/L, CaCl ₂ <5 mmol/L, 清蛋白 3~9 mg/mL, 精氨酸 50~200 mmol/L, 组氨酸 10~40 mmol/L
Humate-P® ^[11]	甘氨酸 15~33 mg/mL, NaCl 2~5.3 mg/mL, 枸橼酸钠 3.5~9.3 mg/mL, 清蛋白 8~16 mg/mL

^{*} 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA021904)。 作者简介: 王黔川, 男, 实习研究员, 主要从事血液制品研究。

[#] 共同第一作者。 [△] 通讯作者, E-mail: wuchuanfang@scu.edu.cn。

表 2 成分筛选实验设计

配方号	配方组成
配方 1	30 mmol/L 氯化钠、15 mg/mL 蔗糖、20 mg/mL 盐酸组氨酸、10 mmol/L 枸橼酸钠、5 mmol/L 氯化钙
配方 2	6 mg/mL 清蛋白、20 mg/mL 盐酸精氨酸、10 mmol/L 枸橼酸钠、1 mmol/L 氯化钙
配方 3	30 mmol/L 氯化钠、4 mg/mL 清蛋白、20 mg/mL 甘氨酸、15 mmol/L 枸橼酸钠、5 mmol/L 氯化钙

1.2.2 配方研究 研究者统计了一些已经上市销售的 FⅧ制品的配方成分^[5]；特别关注了采用 80 ℃、72 h 干热工艺的 FⅧ制品的配方及其剂量^[6-7]，见表 1。研究者选取一些成分和剂量组合进行成分筛选实验，选定其中的一些成分；再对选定的成分进行剂量考察；以最合适的配方制备 3 批成品，进行成品质量与安全性、稳定性^[12]考察，以完成后的制品效能最终评估配方。

1.2.3 成分筛选实验 以表 2 的配方组成和剂量进行考察。制品 pH 值为 6.5～7.5。考察指标为各个配方制作的产品的的外观和活性回收率。

1.2.4 剂量考察实验 通过成分筛选试验，确定配方 2，再对其中的清蛋白、盐酸精氨酸、枸橼酸钠和氯化钙成分，以表 3 的

不同剂量进行剂量考察。制品 pH 值为 6.5～7.5。考察指标为各个配方制作的产品的的外观和活性回收率。

1.2.5 产品质量与安全性、稳定性考察实验 通过剂量考察实验后，选定配方 4，以此配方制作 3 批成品。分别进行产品质量考察，产品安全性考察，稳定性考察。考察指标见表 4。

表 3 剂量考察实验设计

配方号	清蛋白 (mg/mL)	盐酸精氨酸 (mg/mL)	枸橼酸钠 (mmol/L)	氯化钙 (mmol/L)
配方 1	2	60	20	5
配方 2	4	60	15	5
配方 3	6	40	15	2
配方 4	8	40	10	1

表 4 产品质量与安全性考察,稳定性实验设计

考察项目	实验步骤和检测指标
产品质量	在制品冻干后、干热前抽样检测外观和溶解后效价回收率 成品全检
安全性	检测成品的异常毒性
稳定性	成品在下列环境摆放,按时间取出检测 1. 2～8 ℃环境摆放 24 个月(长期稳定性),于第 3、6、9、12、18、24 个月抽样。全检 2. 25 ℃环境摆放 24 个月(加速稳定性),于第 1、2、3、6、12、24 个月抽样。全检 3. 40 ℃环境摆放 6 个月(强力破坏试验),于第 1、2、3、6 个月抽样。全检 4. 复溶后效价:制品溶解后置于 25 ℃环境,分别于第 0、1、2、4、18、24 h 取样,—20 ℃冻存,然后同时取出,检测效价回收率。

2 结 果

2.1 成分筛选实验 实验结果见表 5。

表 5 成分筛选实验结果

配方号	外观及回收率
配方 1	冻干后外观有塌陷;干热后外观有萎缩、变黄;溶解后溶液有较多絮状物,溶液微黄色;溶解液效价回收率 52.1%。
配方 2	冻干后外观良好;干热后外观有轻度萎缩;溶解后溶液外观良好;溶解液效价回收率 80.4%。
配方 3	冻干后外观良好;干热后外观有轻度萎缩;溶解后溶液有少许絮状物;溶解液效价回收率 71.7%。

2.2 剂量考察实验 实验结果见表 6。

表 6 剂量考察实验结果

配方号	外观及回收率
配方 1	冻干后外观有塌陷;干热后外观有萎缩;溶解后溶液有少许絮状物;溶解液效价回收率 65.0%。
配方 2	冻干后外观良好;干热后外观有轻度萎缩;溶解后溶液有少许絮状物;溶解液效价回收率 81.7%。
配方 3	冻干后外观良好;干热后外观无萎缩;溶解后溶液外观良好;溶解液效价回收率 84.6%。
配方 4	冻干后外观良好;干热后外观无萎缩;溶解后溶液外观良好;溶解液效价回收率 90.4%。

2.3 成品质量与安全性、稳定性实验

2.3.1 效价回收率 3 批制品所有检测指标全部合格,其中的效价回收率结果见表 7。

2.3.2 安全性考察结果 3 批制品的异常毒性实验结果均合格,无异常毒性。

2.3.3 稳定性考察结果 3 批制品不同项目、不同时间的抽样,所有检测指标全部合格,其中的效价回收率结果见表 7。

表 7 产品质量与安全性、与稳定性抽样效价回收率结果

项目	不同批号回收率(%)		
	20110305	20110306	20110407
冻干后效价	98.3	100.8	97.5
成品效价	91.3	92.1	89.6
2～8 ℃长期稳定性效价			
3 月	89.2	91.7	90.4
6 月	91.3	90.8	89.2
9 月	88.3	90.4	87.9
12 月	90.4	91.7	88.8
18 月	86.3	91.7	86.7
24 月	85.4	89.2	84.2
25 ℃加速稳定性效价			
1 月	88.3	90.4	87.9

续表 7 产品质量与安全性、与稳定性抽样效价回收率结果

项目	不同批号回收率(%)		
	20110305	20110306	20110407
2 月	89.6	88.3	89.6
3 月	86.3	91.7	88.8
6 月	85.0	88.8	86.3
12 月	82.9	87.5	83.3
24 月	81.7	85.8	85.4
40 ℃ 强力破坏试验效价			
1 月	89.6	93.8	89.2
2 月	90.0	91.7	91.3
3 月	87.9	90.4	89.6
6 月	84.2	87.9	85.4
复溶后效价			
0 h	89.6	92.5	91.3
1 h	87.5	89.6	88.8
2 h	86.7	91.7	86.3
4 h	85.4	87.1	88.3
18 h	87.5	83.3	87.5
24 h	87.9	83.3	86.7

3 讨 论

从上市 FⅧ制品配方来看,成分有 30 余种,可分为盐类、氨基酸类、糖及糖醇类和清蛋白等;枸橼酸钠和氯化钙与血液凝固过程相关,在 FⅧ产品中广泛使用,氨基酸,蔗糖和清蛋白有冻干赋形、稳定 FⅧ的作用,氯化钠可以保持渗透压。

在成分筛选实验中,综合考虑后形成了 3 个实验配方,主要为所含清蛋白与盐浓度不同及与不同种类的氨基酸的组合。从结果看:配方 1 制品冻干和溶液外观不合格,效价回收率差,颜色变黄,说明盐酸组氨酸和蔗糖不适合于 FⅧ制品和工艺。配方 2 的制品综合最好,活性回收率最好,有进一步考察的价值。配方 3 的制品外观和活性回收率较好,但是溶液外观有絮状物不合格。配方 2 中不含氯化钠,而制品的渗透压合格,故未再考虑使用氯化钠保持渗透压。就此以配方 2 中的清蛋白、盐酸精氨酸、枸橼酸钠和氯化钙成分进行剂量考察。

剂量考察结果显示:氨基酸和盐浓度的变化对外观和效价回收率影响不明显;随着清蛋白浓度逐渐增大,制品外观逐渐改善,到清蛋白 6 mg/mL 及以上,外观合格。效价回收率也随着清蛋白浓度增大而升高,到清蛋白 8 mg/mL 时升到 90.4%,效价保护效果最好。配方 4 的综合效果令研究者满意,以配方 4 开始进一步考察。

在药品研制中,须进行成品质量、安全性、稳定性方面的考察,才能该对药品及其生产中的全要素进行评价。

成品质量考察结果:采用该配方的成品质量检测全部合格,冻干和干热过程中的检测也全部合格;效价回收率与剂量考察时的回收率基本一致,说明本配方可以耐受住冻干和干热工艺,保证制品 FⅧ效价稳定。

成品安全性考察结果:安全性实验结果合格说明本配方及其制品无异常毒性,使用安全。

2~8 ℃是 FⅧ产品的规定储存温度,该产品在 2~8 ℃长

期稳定性实验 24 个月中,效价回收率变化为标示量的 84.2%~91.7%,质量合格,说明配方及其制品在长时间的储存中保持稳定。

在 24 个月 25 ℃加速稳定性实验中,该产品效价回收率变化为标示量的 81.7%~91.7%,质量合格,说明配方及其制品在比较恶劣的情况下仍然保持稳定。

在 6 个月 40 ℃强力破坏性试验中,该产品效价变化为标示量的 81.2%~91.7%,质量合格,说明即使面对破坏性的环境条件仍然有至少 6 个月的抵抗能力,是配方及其制品稳定的很好证明。

溶解后 24 h 效价观察试验,该产品效价回收率全部合格,远远超出说明书要求 FⅧ产品在“溶解后立即使用,并于 1 h 内输完”的标准。

总之,所有的实验结果表明,笔者摸索出的配方完全到达了稳定和保护人凝血因子Ⅷ的作用。笔者为此配方申请的专利已获审批,进入了申请公布期^[13]。

参考文献

[1] Winkelman L, Feldman PA, Evans DR. Severe heat treatment of lyophilied coagulation factors [J]. Curr Stud Hematol Blood Transfus, 1989, 56(1): 55-69.

[2] Skidmore SJ, Pasi KJ, Mawson SJ, et al. Serological evidence that dry heating of clotting factor concentrates prevents transmission of non-A, non-B hepatitis [J]. J Med Virol, 1990, 30(1): 50-52.

[3] Hart HF, Hart WG, Crossley J, et al. Effect of terminal(dry) heat treatment on non-enveloped viruses in coagulation factor concentrates [J]. Vox Sang, 1994, 67(4): 345-350.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版 3 部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 236-237.

[5] Mark Brooker. Registry of Clotting Factor Concentrates [M]. 8th edn. In Facts and Figures, no. 6. Montreal: World Federation of Hemophilia, 2008: 10-14.

[6] Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, et al. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice [J]. Pharm Res, 1997, 14(8): 969-975.

[7] Osterberg T, Fatouros A, Mikaelsson M. Development of freeze-dried albumin-free formulation of recombinant factor VIII SQ [J]. Pharm Res, 1997, 14(7): 892-898.

[8] CSL Behring. Biostate® instruction [EB/OL]. (2013-11-30) [2014-08-11] <http://labeling.cslbehring.com/PI/AU/Biostate/EN/Biostate-Prescribing-Information.pdf>.

[9] Cutter Biological. Koate-DVI instruction [EB/OL]. (2012-08-31) [2014-08-30] http://www.koate-dvi.com/documents/809754/0/Koate_DVI.pdf/fb455459-5ac0-43d3-bb48-363389a7c5c3.

[10] Grifols. Alphanate instruction [EB/OL]. (2008-12-28) [2014-10-09] http://www.grifols.com/documents/10192/65508/ft_alphanate_eeuu.en/a9f2f9c9-05eb-4fac-a7d3-5f091c198cff?version=1.4.

[11] CSL Behring. HUMATE-P® instruction [EB/OL]. (2013-08-23) [2014-10-21] <http://labeling.cslbehring.com/PI/US/Humate-P/EN/Humate-P-Prescribing-Information.pdf>.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版 2 部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010, 附录 199-201.

[13] 牟蕾, 鲁涛, 王黔川, 等. 一种人凝血因子Ⅷ的干热处理稳定剂及其用途 [P]. 中国专利: CN 102924562 A, 2013-02-13.