

冻干人纤维蛋白原制备工艺的优化

张会杰 王磊 王鹏 崔亚玲

山西康宝生物制品股份有限公司 山西长治 046011

摘要：背景：人纤维蛋白原是人血浆中重要的凝血因子，冻干人纤维蛋白原在临床上主要用于治疗缺乏纤维蛋白原引起的急性出血症。目的：通过对人纤维蛋白原（Fibrinogen 下文简称为 Fg）制备的主要工艺参数进行优化，以提高 Fg 的收率，纯度及凝固活力等指标。方法：通过探究不同温度下 Fg 各阶段组分（FI, FI-2, FI-3）在溶解液中的蛋白含量，从而得到最佳的悬浮温度；通过四因素三水平的正交设计法优化低温乙醇法中各工艺参数。结果：研究表明 Fg 组分的最佳溶解温度是 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ；低温乙醇法最佳工艺参数是反应液 pH 为 7.0 ± 0.05 、加酒精速度为 400ml/min 、酒精温度为 $-15 \pm 2^\circ\text{C}$ ，酒精浓度为 8%。结论：通过对 Fg 制备的主要工艺参数进行优化，对比发现优化后的人纤维蛋白原的收率，纯度及凝固活力均有明显提高。

关键词：人纤维蛋白原；低温乙醇法；凝固活力

前言

人纤维蛋白原，即凝血因子 I，是人血浆中重要的凝血因子，其在人肝脏中生成，由三对肽链构成，即 $A\alpha 2$ ， $B\beta 2$ ， $\gamma 2$ ，含碳水化合物 3%–5%，分子量约为 34 万，等电点为 5.5，血浆含量约为 $(2-4)\text{g/L}$ ^[1]。人纤维蛋白原主要存在于血浆中，大约 15% 存在于血管外。它在 56°C 下的热稳定性较差，会形成不可逆的沉淀。为了达到止血效果，通常需要使用正常的 25% 至 50% 的血浆水平。如果血浆中的纤维蛋白原低于 $1-1.5\text{g}$ ，可能会引起凝血障碍 [2–3]。临床上，人纤维蛋白原主要用于抢救和治疗先天性或获得性纤维蛋白原缺乏或低下所引起的凝血障碍。这些凝血障碍包括肝病性出血、弥散性血管内凝血、产科出血以及外伤出血等情况。通过补充纤维蛋白原，可以促进凝血过程，恢复正常的止血功能，从而控制出血状况，并提供所需的凝血保护 [4–6]。

目前人纤维蛋白原的分离工艺已比较成熟，国内外大多数血液制品厂家都采用低温乙醇法进行分离提取人纤维蛋白原。但是由于我国血液制品受原料血浆的供应不足，而市场需求大，一直处于供不应求的紧缺状态。因此提高原料血浆的综合利用水平，和提高血浆各组分的收率是每个从事血制品研究者所追求的共同目标，同时也是造福社会。本研究通过对 Fg 的生产工艺主要参数进行正交设计分析，筛选最佳参数从而提高 Fg 的收率，纯度及凝固活力等指标。

1. 材料和方法

1.1 材料

FI 沉淀均为本公司采用低温乙醇法分离制备，新鲜 FI 或冻存于 -30°C 以下组分库中。Tris，美国 Angus 化学品公司；蔗糖，南宁桂之隆药用辅料有限公司；枸橼酸钠，台山新宁制药股份有限公司；盐酸精氨酸，德国默克公司；甘氨酸，德国默克公司；氯化钠，天津海光药业有限公司；聚山梨酯 80，南京威尔药业集团股份有限公司；磷酸三丁酯，德国默克公司。

1.2 FI/FI-2 和 FI-3 悬浮液的配制

FI/FI-2 悬浮液：17.8g 枸橼酸钠、2.7g 三羟甲基氨基甲烷（Tris）、11g 蔗糖、10g 氯化钠，加入注射用水 1kg 溶解，调节 pH 至 6.80~6.85。S/D 灭活剂：33.0g 磷酸三丁酯、110.0g 聚山梨酯 80，加入注射用水至 1kg 溶解。FI-3 悬浮液：10 倍第二次悬浮后离心收集的沉淀重量的注射用水，含 1.2% 枸橼酸钠、2.4% 甘氨酸、3.6% 盐酸精氨酸、0.24% 氯化钠、0.00446% 聚山梨酯 80，调节 pH 至 7.2~7.3。

1.3 制备流程

冰冻健康人血浆化浆后在 0°C – -4°C 进行离心，去除冷沉淀，上清进行乙醇反应获得 FI 沉淀；FI 沉淀进行抽提过滤，再经过 SD 病毒灭活，灭活后样品降温并进行乙醇反应，离心收集沉淀 FI-2；FI-2 沉淀进行抽提过滤，再进行乙醇反应，离心收集沉淀 FI-3；FI-3 沉淀抽提溶解，再经过滤超滤配制

等步骤可以获得人纤维蛋白原原液，最后除菌过滤分装和冻干，冻干的半成品再进行干热病毒灭活后获得最终的成品。人纤维蛋白原纯度、凝固活力等质量指标检测方法参考^[7]。

2. 结果

2.1 FI 悬浮温度的优化

FI 沉淀中蛋白质的溶出度，直接决定着纤维蛋白原的收率，在一定条件下，当温度升高时，FI 沉淀中蛋白质的溶出率也随之升高，有利于目标蛋白最大化的溶出，因此在现有悬浮液工艺条件下，以悬浮液中的蛋白浓度为指标，我们考察了不同温度下（20℃ ,22℃ ,24℃ ,26℃ ,28℃ , 30℃）各阶段悬浮液中蛋白溶出的影响，结果见下表 1。

表 1 不同温度对 FI 悬浮液中蛋白含量的影响

悬浮温度 (±1) temperature(℃)	蛋白浓度 protein concentration(mg/ml)		
	FI	FI-2	FI-3
20	15.4 ± 0.4	9.1 ± 0.3	23.2 ± 0.7
22	16.9 ± 0.5	10.3 ± 0.6	25.7 ± 0.5
24	18.7 ± 0.7	11.2 ± 0.5	28.3 ± 0.6
26	21.3 ± 0.5	12.9 ± 0.4	31.6 ± 0.3
28	28.2 ± 0.3	16.2 ± 0.6	39.1 ± 0.6
30	29.7 ± 0.2	17.1 ± 0.4	41.2 ± 0.3

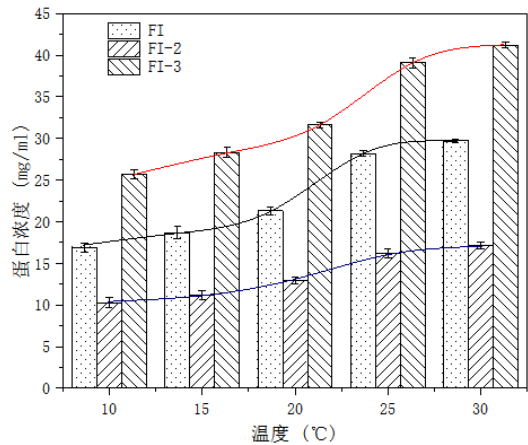


图 1 不同温度对 FI 悬浮液中蛋白含量的影响

结果显示，当温度升高到 30℃ 时，各步骤悬浮液中的蛋白含量（FI，29.7±0.2；FI-2，17.1±0.4；FI-3，41.2±0.3）均为最高，在此温度下，能够将沉淀中的蛋白最大限度的溶出。同时我们观察到，当温度在 25℃ 时，溶出的蛋白含量值（FI，28.2±0.3；FI-2，16.2±0.6；FI-3，39.1±0.6）与 30℃ 的差异显著缩小，考虑到温度升高到一定程度后，会影响纤维蛋白原的凝固活力，甚至有变性失活的风险，因此选择 25±1℃ 为最佳悬浮温度。

2.2 低温乙醇法工艺参数的优化

为了使 Fg 纯化能够达到最优的反应条件，我们对 Fg 低温乙醇制作工艺参数进行了优化，在固定了蛋白浓度，离子强度，反应温度之后，重点考察了反应液 pH(A)，加酒精速度（B），酒精温度（C），酒精浓度（D）四种因素对反应后所得蛋白溶解液的纯度和凝固活力的影响。因素水平见表 2。分析结果如表 3、表 4 所示。

表 2 正交设计因素水平表

水平 (level)	因素 (factor)			
	反应液 pH Reaction mixture pH	加酒精速度 Alcohol dropping rate(ml/min)	酒精温度 Alcohol temperature(℃)	酒精浓度 Alcohol concentration
1	6.9 ± 0.05	300	-5 ± 2	8%
2	7.0 ± 0.05	400	-10 ± 2	9%
3	7.1 ± 0.05	500	-15 ± 2	10%

表 3 正交设计直观分析结果——纯度

NO.	A 反应液 pH Reaction mixture pH	B 加酒精速度 Alcohol dropping rate(ml/min)	C 酒精温度 Alcohol temperature(℃)	D 酒精浓度 Alcohol concentration	纯度 Purity (%)
1	1	1	1	1	88.6
2	1	2	2	2	86.4
3	1	3	3	3	83.2
4	2	1	2	3	86.2
5	2	2	3	1	91.4
6	2	3	1	2	83.2
7	3	1	3	2	75.2
8	3	2	1	3	76.3
9	3	3	2	1	79.6
K1	86.067	83.333	82.7	86.533	
K2	86.933	84.7	84.067	81.6	
K3	77.033	82	83.267	81.9	
R	9.9	2.7	1.367	4.933	

经正交设计直观分析结果表明, 极差顺序为: $RA > RD > RB > RC$, 即 Fg 低温乙醇制作工艺参数对蛋白溶解液的纯度的影响顺序为反应液 pH > 酒精浓度 > 加酒精速度 > 酒精温度。得到 Fg 低温乙醇制作纯度最佳工艺条件为 A2B2C3D1, 即反应液 pH 为 7.0 ± 0.05 、加酒精速度为 400ml/min、酒精温度为 $-15 \pm 2^\circ\text{C}$, 酒精浓度为 8%。

表 4 正交设计直观分析结果——凝固活力

NO	A 反应液 pH	B 加酒精速度	C 酒精温度	D 酒精浓度	凝固活力
	Reaction mixture pH	Alcohol dropping rate(ml/min)	Alcohol temperature($^\circ\text{C}$)	Alcohol concentration	Coagulation Activity(s)
1	1	1	1	1	45
2	1	2	2	2	37
3	1	3	3	3	32
4	2	1	2	3	34
5	2	2	3	1	28
6	2	3	1	2	42
7	3	1	3	2	33
8	3	2	1	3	46
9	3	3	2	1	38
K4	38	37.333	44.333	37	
K5	34.667	37	36.333	37.333	
K6	39	37.333	31	37.333	
R*	4.333	0.333	13.333	0.333	

经正交设计直观分析结果表明, 极差顺序为: $R^*C > R^*A > R^*B = R^*C$, 即 Fg 低温乙醇制作工艺参数对蛋白溶解液的凝固活力的影响顺序为酒精温度 > 反应液 pH > 加酒精速度 = 酒精浓度。得到 Fg 低温乙醇制作凝固活力最佳工艺条件为 A2B2C3D1, 即反应液 pH 为 7.0 ± 0.05 、加酒精速度为 400ml/min、酒精温度为 $-15 \pm 2^\circ\text{C}$, 酒精浓度为 8%。

3. 讨论

纤维蛋白原是人血浆中的一种凝血因子, 可以转化为纤维蛋白并在血浆中其他凝血因子的配合下促进血液凝固。人纤维蛋白原水平的减少或缺失, 会引起纤维蛋白原功能异常, 临床上以出血症状为主。人纤维蛋白原是一种用于治疗缺乏纤维蛋白原引起的急性出血的止血制剂。在弥散性血管内凝血(DIC)继发纤溶期的情况下, 血液中的纤维蛋白会被降解, 导致凝血机能受损并进一步加重出血的风险。直接静脉补充纤维蛋白原可以快速提高体内纤维蛋白原的含量, 并吸附凝血酶, 减少凝血酶向循环中扩散的风险。因此, 人纤维蛋白原可以迅速增强凝血机能, 快速有效地控制出血, 是治疗 DIC 继发纤溶期的有效药物之一^[8]。

此外人纤维蛋白原在产科出血也有着广泛的应用, Ahmed^[9]证实 77 例产后出血患者中, 与冷沉淀相比, 纤维蛋白原浓缩物可有效控制出血。而贾玲^[10]报道称 28 例均

在发现出血增多血液不凝时应用纤维蛋白原首先静脉点滴纤维蛋白原 1 ~ 2 g, 用药后 15 ~ 30min 见到凝血块, 出血渐减少。另黄志平^[11]收集颅脑外伤患者 60 例, 观察组在对照组基础上加用人纤维蛋白原治疗。观察组总住院天数及住院期间肺部感染情况优于对照组(均 $p < 0.05$)证实人纤维蛋白原干预防治可有效降低颅脑外伤后 PHI 发生率, 对改善预后具有积极的意义。这几项研究都表明纤维蛋白原浓缩物能够显著提高患者体内的纤维蛋白原水平, 从而有效控制出血。

本研究通过对人纤维蛋白原制备的主要工艺参数进行优化, 正交设计分析筛选得到最佳的生产工艺条件: (1) $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 为最佳悬浮温度; (2) Fg 低温乙醇制作纯度最佳工艺条件为反应液 pH 为 7.0 ± 0.05 、加酒精速度为 400ml/min、酒精温度为 $-15 \pm 2^\circ\text{C}$, 酒精浓度为 8%; (3) Fg 低温乙醇制作凝固活力最佳工艺条件为反应液 pH 为 7.0 ± 0.05 、加酒精速度为 400ml/min、酒精温度为 $-15 \pm 2^\circ\text{C}$, 酒精浓度为 8%。

参考文献:

- [1] 李征. 冻干人纤维蛋白原病毒灭活方法研究概况 [J]. 微生物学免疫学进展, 1998, 26(1): 77-78.
- [2] 刘隽湘. 输血疗法与血液制剂 [M]. 北京人民卫生出

版社, 1996: 40-41.

[3] 徐修才, 吴竞生, 翟志敏. 人纤维蛋白原的研究进展 [J]. 国外医学 (临床生物化学与检验学分册), 2004, 25(6): 503-505.

[4] 肖永胜, 樊嘉, 周俭, 吴志全. 纤维蛋白原对肝外科凝血功能影响的临床研究 [J]. 中国临床医学, 2003, 2(10): 10-12.

[5] 李浩生, 林静吟. 纤维蛋白原在产科 DIC 治疗中的应用价值 [J]. 广东医学杂志, 2005, 26(2): 259-260.

[6] 文天夫, 严律南, 吴言涛等. 肝硬变肝功能衰竭者行肝移植时术前准备的重要性 [J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(3): 137-139.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[2020年版]. 北京工业出版社, 275-276.

[8] 陈琼芬, 吴悦好. 凝血因子及纤维蛋白原在抢救

产科 DIC 的应用 (附 11 例临床分析) [J]. 职业卫生与病伤, 2004, 19(1): 61-62.

[9] Ahmed S, Harrity C, Johnson S, et al. The efficacy of fibrinogen concentrate compared with cryoprecipitate in major obstetric haemorrhagean observational study [J]. Transfus Med, 2012, 22(5): 344-349.

[10] 贾玲. 纤维蛋白原在产科 DIC 中的应用研究 [J]. 医药论坛杂志, 2006, (10): 83-85.

[11] 黄志平, 高捷, 张俊锋等. 人纤维蛋白原在预防颅脑外伤后进展性出血性损伤中的应用研究 [J]. 现代实用医学, 2019, 31(4): 453-455.

作者简介:

张会杰, (1984—), 男, 汉族, 山西省长治市人, 硕士学历, 山西康宝生物制品股份有限公司, 研发, 血液制品方向