

人凝血因子Ⅷ上市前/后的稳定性比较

刘环¹ 顾蓓莉¹ 李健康² 郑皓仁² 江砚芳^{1*}

1 国药集团上海血液制品有限公司 2 国药集团昆明血液制品有限公司

DOI:10.12238/fcmr.v6i2.7435

[摘要] 目的: 比较国药集团上海血液制品有限公司(简称“上海血制”)生产的人凝血因子Ⅷ(Human Coagulation Factor Ⅷ, FⅧ)产品上市前/后稳定性差异。方法: 首先取上市前/后制备的各连续3批次FⅧ成品,重点考察外观、复溶时间、可见异物、渗透压摩尔浓度、水分含量、效价、蛋白含量、比活性和化学物残留等指标的差异性。然后开展成品的稳定性研究,比较关键质量指标(如外观、复溶时间、可见异物、效价和比活性等)在上市前/后各阶段的差异性。结果: 上市前/后各3批次的FⅧ成品检定结果均合格,差异均不具有统计学意义($P > 0.05$)。加速试验和长期试验结果显示,与0月相比各阶段指标检测结果(如外观和可见异物指标检查结果无明显差异,复溶时间、效价和比活性的检测值虽有所浮动)均符合《中华人民共和国药典(2020版)》三部的规定。FⅧ上市前/后效价和比活性指标的差异均不具有统计学意义($P > 0.05$)。结论: 上海血制公司生产的FⅧ产品上市前/后的各项质量指标变化无明显差异,稳定性较好且安全可靠。

[关键词] 人凝血因子Ⅷ; 稳定性; 加速试验; 长期试验; 差异显著性

中图分类号: TQ464 文献标识码: A

Comparison of the stability of Human Coagulation Factor Ⅷ before and after marketing

Huan Liu¹ Beili Gu¹ Jiankang Li² Haoren Zheng² Yanfang Jiang^{1*}

1 Sinopharm Shanghai Plasma-derived Biotherapies Co., Ltd

2 Sinopharm Kunming Plasma-derived Biotherapies Co., Ltd

[Abstract] Objective: To compare the stability of human coagulation factor Ⅷ (FⅧ) products produced by Sinopharm Shanghai Blood Products Co., LTD(SSPB). Methods: Firstly, three consecutive batches of FⅧ products before and after marketing were selected to investigate the differences in appearance, re-dissolution time, visible foreign bodies, osmolality, water content, titer, protein content, specific activity, and chemical residue. Then the stability test of the finished product was carried out to compare the differences of key quality indicators (such as appearance, re-dissolution time, visible foreign bodies, potency and specific activity) in each before and after marketing stage. Results: The verification results of three batches of FⅧ products before and after marketing were qualified, and the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). The results of accelerated test and long-term test showed that the test results of all stages compared with 0 month(the results of appearance and visible foreign body showed no significant difference, the detection values of re-dissolution time, titer and specific activity were fluctuated) still met the requirements of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 Edition (Part Ⅲ). There were no significant differences in the titer and specific activity of FⅧ before and after marketing ($P > 0.05$). Conclusion: The quality indicators of FⅧ products produced by SSPB had no significant changes before and after marketing, and the FⅧ products were stable and safe.

[Key words] human coagulation factor Ⅷ; stability; acceleration test; long-term test; significance of difference

人凝血因子Ⅷ(human coagulation factor Ⅷ, FⅧ)是一种来源于人血浆的大分子糖蛋白,临床上主要用于治疗和预防甲型血友病^[1]。由于FⅧ结构复杂,相对分子质量大,致使FⅧ很不稳定,在提取制备过程中和包装储存过程中容易失活^[2]。因此,

研究FⅧ的稳定性显得尤为重要。上海血制早在上世纪就已获得FⅧ的生产文号,产品通过了药品GMP认证,并于2019年成功上市销售。该FⅧ制剂是以人血浆冷沉淀为原料,采用聚乙二醇沉淀法结合离子交换层析法,经除菌、冻干、干热病毒灭活等工艺制

表1 FVIII上市前/后成品检定结果

批次	渗透压摩尔浓度/ (mOsmol/kg)		水分含量/(%)		比活性/(IU/mg)		TNBP 残留量/ (ug/ml)		Tween-80 残留量/ (ug/ml)	
	上市前	上市后	上市前	上市后	上市前	上市后	上市前	上市后	上市前	上市后
	1	257.0	270.0	1.2	1.0	43.3	30.7	1.9	0.8	41
2	304.0	270.0	0.6	1.0	32.5	34.6	1.0	0.8	46	60
3	302.0	258.0	0.6	1.0	40.0	43.7	1.1	0.6	44	39
$\bar{x}\pm s$	287.7±26.6	266.0±6.9	0.8±0.3	1.0±0.0	38.6±5.5	36.3±6.7	1.3±0.5	0.7±0.1	43.7±2.5	44.3±13.8
<i>F</i>	1.9		1.0		0.2		4.2		0.0	
<i>P</i>	0.2		0.4		0.7		0.1		0.9	

备而成^[3,4],且有效期为24个月。本研究对上市前/后各连续3批次生产的FVIII制品依据《中华人民共和国药典(2020版)》三部^[5](简称“药典三部”)和上海血制品公司暂定的《人凝血因子VIII制造检定规程》中的规定进行成品检定,在确认各项成品质量指标合格后开展稳定性研究,比较上市前/后FVIII各项质量指标的差异性,为生产安全有效的FVIII提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

上市前/后各3批次FVIII成品由国药集团上海血液制品有限公司按药典三部^[5]和企业制检规程制备,用批次1~3表示批号。

STA Compact型全自动血凝分析仪:法国STAGO公司;XD683型电解质分析仪:上海迅达医疗器械有限公司;QSMOMAT030型冰点渗透压仪:德国Gonotec公司。

1.2 方法

1.2.1 成品检定

选取上市前/后各3批次FVIII成品,按照药典三部^[5]要求检测外观、复溶时间、可见异物、渗透压摩尔浓、水分含量、比活性(效价与蛋白含量之比)、磷酸三丁酯(tri-n-butyl phosphate, TNBP)残留量、聚山梨酯80(Tween-80)残留。

1.2.2 稳定性研究

按照药典三部9402指导原则^[5]实施稳定性研究,主要考察FVIII成品的外观、复溶时间、可见异物、效价、比活性等指标上市前/后的变化情况,并对效价和比活性指标进行单因素方差分析,比较上市前/后两指标的差异性。

(1)加速试验:分别随机选取上市前/后各3批FVIII被测样品置于温度为(25±2)℃,相对湿度为(60±10)%且避光的条件下放置6个月。在试验期间3个月末、6个月末分别取样,检测相关质量指标。

(2)长期试验:分别随机选取上市前/后各3批FVIII被测样品

置于温度为(5±3)℃且避光的条件下放置24个月。在试验期间的第12个月末和第24个月末分别取样,检测相关质量指标。

1.2.3 统计学方法

采用Microsoft Office Excel 2021版软件统计分析数据,均值±标准差用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P>0.05$ 为不具有差异显著性。

2 结果

2.1 FVIII上市前/后成品检定结果

选取上市前/后各3批次的FVIII成品进行成品检定,结果显示FVIII冻干品外观成型较好且为乳白色疏松体,用25~37℃灭菌注射用水复溶后为无色澄明溶液,复溶时间均在30min以内,可见异物指标正常^[5]。渗透压摩尔浓度、水分含量、比活性、TNBP残留量和Tween-80残留量检测结果见表1,上市前/后各指标均符合药典三部标准^[5],且差异均不具有统计学意义($P>0.05$)。

2.2 加速试验结果

表2 FVIII上市前/后效价和比活性(加速试验)

月	效价 (IU/mL)		比活性 (IU/mg)	
	上市前	上市后	上市前	上市后
0	12.7±0.6	10.1±1.2	38.6±5.5	36.7±7.3
3	12.2±0.2	10.7±0.5	39.3±5.5	40.2±0.8
6	11.7±0.7	11.8±1.3	40.4±5.4	39.9±2.8
<i>F</i>	5.0		0.2	
<i>P</i>	0.1		0.7	

对上市前/后的FVIII成品在温度(25±2)℃和相对湿度(60±10)%条件下分别放置3个月和6个月后,外观、复溶时间和可见异物指标的检测结果显示均符合药典三部的要求^[5]。效价和比活性指标检测结果如表2所示,结果显示上市前/后FVIII的效价和比活性指标差异均无统计学意义(P均>0.05)。

2.3 长期试验结果

FVIII上市前/后各3批次制品在(5±3)℃且避光条件下保存24个月后,外观、复溶时间和可见异物指标的检测结果显示均符合药典三部的要求^[5]。效价和比活性指标检测结果如表3所示,结果显示上市前/后FVIII的效价和比活性指标差异均无统计学意义(P均>0.05)。

表3 FVIII上市前/后效价和比活性(长期试验)

月	效价 (IU/mL)		比活性 (IU/mg)	
	上市前	上市后	上市前	上市后
0	12.7±0.6	10.1±1.2	38.6±5.5	36.7±7.3
12	11.2±1.1	11.5±0.1	35.2±3.3	34.1±3.1
24	11.5±1.1	11.9±0.9	39.6±0.7	41.1±2.3
<i>F</i>	0.8		0.0	
<i>P</i>	0.4		0.8	

3 讨论与结论

药品的稳定性是关系到临床用药安全的重要信息。通常条件下,当药品受到温度、湿度以及微生物影响时,会发生物理或者化学反应,直接导致有效成分的减少和有害物质的增加,对临床用药安全带来风险^[6,7]。FVIII制剂是一种常用的输注型预防和治疗甲型血友病的药物,目前关于FVIII报道大多是关于生产工艺发明^[8,9]以及缓冲液配方的研究^[10,11],很少有关产品稳定性的报道。

本研究以上海血制品公司生产的FVIII制品(上市前/后各3批次)作为研究对象,根据药典三部^[5]的要求检测成品的各项质量指标,并重点考察外观、复溶时间、可见异物、渗透压摩尔浓度、水分含量、比活性、TNBP和Tween-80残留量等指标的差异性。在FVIII生产过程中,干热病毒灭活作为保证产品质量安全的最后一道防线,其高温处理可能会导致蛋白失活变性,从而产生絮状沉淀,因此需要进行外观检查。复溶时间则直接影响药物的易用性,尤其在急救场合,复溶时间过长会影响患者的用药及时性。渗透压摩尔浓度反映了溶液中各种溶质对溶液渗透压贡献的总和,会影响人体血液循环。FVIII冻干品的水分含量是确保产品质量的重要参数,其值会影响干热病毒灭活效果和产品质量。比活性是衡量FVIII产品质量的一个关键指标,由效价与蛋白含量的比值计算获得,其值越高,表明制品中的杂蛋白含量越低,临床使用越安全^[12]。TNBP和Tween-80是S/D灭活剂的主要成分,对人

体均有毒害作用,其含量必须控制在标准范围内。研究结果表明,FVIII上市前/后的外观、复溶时间和可见异物指标均合格,渗透压摩尔浓度、水分含量、比活性、TNBP和Tween-80残留量指标的差异不具有统计学意义(P均>0.05)。

对各批次生产的FVIII成品进行稳定性研究,比较FVIII上市前/后产品各项指标的变化差异。稳定性研究包括加速试验和长期试验两部分,加速试验是在超常的条件下进行的,其目的是通过加速药物的化学或物理变化,探讨药物的稳定性,为制剂设计、包装、运输及贮存提供必要的资料。长期试验是在接近药物的实际贮存条件范围内进行,其目的是为制定有效期提供依据。加速和长期稳定性研究结果显示FVIII上市前与上市后的各项质量指标(如外观、复溶时间、可见异物、效价和比活性等)与0月相比均有所变化,但全部符合药典三部的规定^[5]。对效价和比活性指标进行单因素方差分析,比较FVIII上市前/后两指标的差异性,结果表明差异不具有统计学意义(P均>0.05)。

综上所述,上海血制品公司能使用现有工艺能制备出安全、稳定、可靠的FVIII制剂,且该制剂在(5±3)℃且避光条件下至少可以保存24个月。

【参考文献】

- [1]于引航,郝斌,孙权,等.人凝血因子VIII在治疗血友病和相关疾病中的研究进展[J].药物生物技术,2020,27(5):472-478.
- [2]蒋桂香,张伟,洪好武.人凝血因子VIII制品稳定性的研究进展[J].中国生物制品学杂志,2015,28(1):95-99.
- [3]刘环,陈红霞,李勇,等.一种冻干型人凝血因子VIII制备方法的研究[J].生物化工,2022,8(6):75-77.
- [4]陈红霞,韦志翔,杨东伟,等.聚乙二醇沉淀法和离子交换层析法纯化人凝血因子VIII效果的比较[J].国际生物制品学杂志,2017,40(6):279-281.
- [5]国家药典委员会.中华人民共和国药典:三部[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [6]葛彩芹,刘桂军.稳定性研究在药品质量控制中的应用[J].亚洲临床医学杂志,2020,3(5):43-45.
- [7]韦金燕.药品稳定性试验研究进展[J].中文科技期刊数据库(文摘版)医药卫生,2021,(12):346-347.
- [8]匡青芬,罗二华.一种人血管性血友病因子/人凝血因子VIII复合物的制备方法及产物和应用:CN111592591A[P],2020-08-28.
- [9]周安,杨西建,刘文杰,等.一种血源人凝血因子VIII生产工艺:CN110922474A[P],2020-03-27.
- [10]马小伟,潘若文.一种平衡液以及人凝血因子VIII的制备方法和人凝血因子VIII制品:CN108059668A[P],2018-05-22.
- [11]马小伟,张宝献.一种洗脱液以及人凝血因子VIII的制备方法和人凝血因子VIII制品:CN108178791A[P],2018-06-19.
- [12]刘晓,韩国德,李青,等.离子交换层析法制备高纯度人凝血因子VIII的研究[J].中国新药杂志,2015,24(7):760-765.