

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03138928.7

[51] Int. Cl.

*A61K 38/02 (2006.01)*

*A61K 35/50 (2006.01)*

*A61K 9/14 (2006.01)*

*A61P 1/16 (2006.01)*

*A61P 31/12 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1299763C

[22] 申请日 2003.7.31 [21] 申请号 03138928.7

[73] 专利权人 张光曙

地址 271000 山东省泰安市解放军第 88  
医院感染科

[72] 发明人 张光曙

[56] 参考文献

CN1049119C 2000.2.9

审查员 温庭江

[74] 专利代理机构 济南信达专利事务所有限公司  
代理人 姜 明

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

抗乙肝人体胎盘转移因子粉针剂的制备方法

[57] 摘要

本发明提供一种抗乙肝人体胎盘转移因子粉针剂的制备方法，是将冻融后的符合 HBVM - AgB 阴性、HBsAb 阳性质量标准的人体胎盘切碎与等重量的蒸馏水混合送胶体磨磨成胎盘胶糊，向胎盘胶糊中加入胎盘原料等重量的浓度为 1% 的氯化钠溶液搅拌均匀制得胶状胎盘液，胶状胎盘液经灭活、超滤、灭菌、减压浓缩和冻干处理制得粉针剂成品。本发明的方法和现有技术相比，具有工艺合理、产品生物活性高，毒副作用小，使用方便以及贮藏周期长等特点。因而，具有很好的推广使用价值。

1、抗乙肝人体胎盘转移因子粉针剂的制备方法,其特征在于制备方法是由以下步骤组成:

a、将冻融后的符合HBVM—AgB阴性、HBsAb阳性质量标准的人体胎盘切碎与等重量的蒸馏水混合送胶体磨磨成胎盘胶糊,向胎盘胶糊中加入胎盘原料等重量的浓度为1%的氯化钠溶液搅拌均匀制得胶状胎盘液;

b、将胶状胎盘液置温度60°C的水浴中间歇搅拌加热10小时,然后将水浴加热后的胎盘液用3000转/分钟的离心机离心20分钟,取上清液备用;

c、将上清液用NaOH溶液调整PH为6.8~7.5,选用截流分子量100,000道尔顿的超滤膜过滤,滤液再用截流分子量10,000的超滤膜过滤,再用微孔滤膜除菌得无菌胎盘液备用;

d、按重量比称取无菌胎盘液60—80份加入15—30份浓度为20%甘露醇和3—10份浓度为6%的低右搅拌均匀,最后经常规减压浓缩和冻干处理制得粉针剂成品。

## 抗乙肝人体胎盘转移因子粉针剂的制备方法

### 1、技术领域

本发明涉及一种生物工程技术或一种注射用粉针剂的制备方法,具体地说是一种抗乙肝人体胎盘转移因子粉针剂的制备方法。

### 2、技术背景

本专利申请的发明人已在第931003571号专利申请中公开了一种利用胎盘制备抗乙肝胎盘转移因子注射液的方法,该专利公开的方法在实际生产和应用过程中所存在的不足是工艺复杂,在制备过程中需要添加36%的甲醛作为灭活剂,甲醛的含量为注射液体积比浓度的0.125%,因此甲醛在制剂中的毒副作用不可避免,另外水针剂在运输和贮藏过程中还存在有怕冻和稳定性差、存储时间短等诸多问题。

### 3、发明内容

本发明的目的是在931003571号专利的基础上对原有生产工艺加以改进和完善,提供一种制备工艺中不添加甲醛、临床使用不会产生毒副作用而且产品耐低温、生物活性稳定、产品易保存的抗乙肝胎盘转移因子粉针剂的制备方法。

### 4、实施方式

本发明的目的是按以下方式实现的,选用冻融后的符合HBVM—AgB阴性、HBsAb阳性质量标准的人体胎盘为原料,切碎后与等重量的蒸馏水混合送胶体磨磨成胎盘胶糊,再加入胎盘原料等重量的浓度为1%的氯化钠溶液搅拌均匀经灭活、超滤、灭菌和冻干处理制得本发明的抗乙肝胎盘转移因子粉针剂制品。

灭活处理是将胶状胎盘液体置60°C间歇搅拌水浴加热10小时,然后将水浴加热后的胎盘液体用3000转/分钟的离心机离心20分钟,取上清液备用。

超滤、灭菌处理、减压浓缩和冻干处理是将上清液用NaOH溶液调整PH为6.8~7.5,选用截流分子量100,000道尔顿的超滤膜过滤,滤液再用截流分子量10,000的超滤膜过滤,再用微孔滤膜除菌得无菌胎盘液备用。

按重量比称取无菌胎盘液60—80份,加入15—30份浓度为20%甘露醇和3—10份浓度为6%的低右,搅拌均匀后经常规减压浓缩和冻干处理制得粉针剂成品。

### 实施例

1、冻融处理:选用符合要求的HBVM-Ag、HCVAAb、HIVAb和TPHA阴

性、HBsAb阳性的人体胎盘，复查合格后用自来水反复冲洗至外观无血，剪切成 $0.5-1\text{cm}^2$ 大小的碎块，置清洁容器内于 $-20-23^{\circ}\text{C}$ 温度下反复冻融2-5次备用。

2、磨碎处理：称取化冻的胎盘碎块50公斤，加胎盘等重量的蒸馏水，过胶体磨共3-8次制成胶状胎盘液，向胶状胎盘液中加入等重量的1%NaCl溶液，使胶状胎盘液内NaCl的浓度为0.45-5.0%。

3、灭活处理：将胶状胎盘液装于玻璃容器内，间断搅拌水浴加热10小时，水浴温度控制在 $60^{\circ}\text{C}$ ，冷却至室温，使用LDS-10型离心机离心，转速控制在3000转/分，离心30分钟，取胎盘上清液备用。

4、超滤灭菌处理：取胎盘上清液用NaOH溶液调整PH为7.5，先经截留10万分子量超滤膜超滤，再以1万分子量的膜超滤，最后用微孔滤膜除菌，按重量比取灭菌后的胎盘溶液75公斤，加20%甘露醇20公斤，6%低右5公斤，配液总量为100公斤制成抗乙肝人体胎盘转移因子溶液半成品。

5、浓缩冻干处理：将超抗乙肝人体胎盘转移因子溶液半成品经常规减压浓缩、冻干即得抗乙肝胎盘转移因子粉针剂。

#### 产品质量标准

[性状]本品为白色疏松固体，溶解后成极微黄色的澄明液体。

[鉴别]取本品稀释，按照分光光度法（中国药典1990年版二部，附录）测定，在260nm与280nm波长处吸收度之比值不低于1.8。

#### [检查]

1、外观为白色疏松固体，溶解后成极微黄色的澄明液体，不应有异物、浑浊或沉淀物。

2、PH值应为6.8~7.5（中国药典1990年版，二部，附录44页）。

3、多肽含量检测：根据中国生物制品规程，（一部，1990年版，301页）多肽含量 $0.5\text{mg}(\pm 10\%) / \text{ml}$ 。

4、D-核糖含量：根据中国生物制品规程，（一部，1990年版，312页），D-核糖含量应 $\geq 120\text{ug/ml}$ 。

5、HBsAg检测：取冻干粉针剂稀释20~40倍，按ELISA法9中国人民解放军血液制品规范，1988年版，69页）检查HBsAg应为阴性。

6、HCVAb、HIVAb检查用ELISA法检测HCVAb、HIVAb应阴性。

7、无菌检验：检查符合中国生物制品规程。（一部，1990年版）

8、活性测定与等特展异免疫性活性测定：

白细胞粘附抑制试验（请参照总后卫生部医疗护理技术操作常规，

解放军战士出版社，1980年版，1488页），平均白细胞移动指数应小于0.8。

类别：生物制品

用法与用量：蒸馏水稀释，肌肉注射2ml，每日一次或两次。

规格：多肽0.5mg/ml，1.0mg/支。

贮存：避光、阴凉处保存。

有效期：两年。

抗乙肝胎盘转移因子粉针剂（PSTFp）的主要药效学和药理作用试验对免疫功能的影响，通过六个方面的实验证实，由HBVM-Ab阴性、HBsAb阳性胎盘提取的PSTFp，不但具有一般转移因子的免疫活性，更有意义的是具有对HBsAg特异免疫活性。具体实验如下：

1、对免疫器官和免疫细胞的影响 利用昆明种鼠体内注射PSTFp，或PSTFp+乙肝疫苗后，取血计白细胞总数及分类，观察到实验组白细胞数比注射盐水的对照组明显升高，以淋巴白细胞升高为主。经脂酶（ANAE）染鉴定增多者主要是ANAE阳性细胞尤其是T一样（主要代表T4）细胞增加更明显。并观察到胸腺平均重量和胸腺指数明显增加而脾脏平均重量和指数封锁变化，说明PSTFp主要促进细胞免疫功能。另外，PSTFp+乙肝疫苗组T一样细胞单纯PSTFp组又有明显增高，说明PSTFp不但具有非特异免疫活性，而且对HBsAg具有特异的免疫活性。

2、PSTFp转移迟发超 应 实验 给昆明种鼠注射PSTFp后，再给小鼠足掌皮下注射HBsAg，肉眼和病理切片都观察到注射侧足掌有水肿充血和淋巴细胞浸润，说明PSTFp可将HBsAg抗原的特异细胞免疫活性转移因子正常机体。

3、特异性淋巴细胞转化实验 Balb/C小鼠腹腔注射PSTFp一周后，取淋巴细胞在体外用HBsAg刺激，用NTT法测定淋漓尽致转；观察到可艰生特异性转化，刺激指数可达2.4。说明PSTFp已将对HBV的特异免疫活性传给了正常鼠淋巴细胞，成为HBsAg致敏的淋巴细胞，所以对HBsAg有增殖反应。另外，还观察到经PSTFp注射的鼠，其淋巴细胞对ConA的敏感度增强，子显示了非特异的免疫活性。

4、白细胞移动抑制实验 用PSTFp给小鼠腹腔注射后取淋巴细胞和腹腔巨噬细胞等量混合，用HBsAg刺激作琼脂板移动抑制实验，结果看出巨噬细胞的移动被抑制，平均抑制指数小规定的标准0.8。如用PSTFp在体外致敏

健康人白细胞，再用HBsAg刺激，则白细胞的移动被抑，抑制指数低于规定的标准0.8。说明PSTFp不论在体内还是在体外，都能将对HBV特异免疫活性转移给正常驻机体，使后者获得抗HBV的特异性免疫力，再次遇到抗原时释放出移动抑制因子。

5、白细胞粘附抑制试验 取注射过PSTFp小鼠腹腔的巨噬细胞或在体外用PSTFp致敏的健康人外周血白细胞，放在试管里，当加入适量HBsAg后，可看到细胞粘附试管壁的能力减弱即粘附能力被抑制，表明PSTFp已使常鼠或人的淋巴细胞获得了HBsAg免疫信息，再次遇到HBsAg后释放了粘附抑制因子，抑制了白细胞的粘附能力。

6、r-干扰素诱生试验： Balb/C小鼠PSTFp体内转移特异免疫活性后，取出脾脏制成悬液，培养中以HBsAg刺激，再取上清液，测定r-干扰素含量，结果证明实验组产生r-干扰素是显多于对照组。说明PSTFp能将对乙型肝炎病毒的特异免疫活性，通过注射转移给鼠脾细胞，随后脾细胞在HBsAg刺激下可产生r-干扰素。

### 抗乙肝胎盘转移因子粉针剂的稳定性

抗乙肝胎盘转移因子粉针剂（PSTFp）是由HBVM-Ag阴性、HBsAb阳性胎盘提取的生物制剂，主治慢性乙型肝炎、肝硬化。为确保制剂安全有效，采用室温自然条件下留样观察，对960624、960630和960701三批PSTFp进行了稳定性研究，为本制剂的保存、有效期和制备工艺提供较可靠的依据。

#### 一、稳定性试验方法

室温自然条件下留样观察：将灌装PSTFp的安瓿置于室内避光处保存，按药品质量稳定性研究的技术要求（国家卫生部《新药审批办法及有关法规汇编》225页）分别于1、2、3、6、12、18、24个月取样，进行外观、生化及免疫活性等检验。

#### 二、稳定性试验结果

1、外观性状及澄明度：取三批PSTFp在室温、避光保存二年内，仍为微黄色澄明液体，七次检验未发现有沉淀及絮状物，与初始状态一致，澄明度检验均合格。

2、安全试验：取三批制剂在室温、避光放置满二年，按《中国生物制品规程》，一部，1990；337页规定，进行安全试验，均合格。

3、紫外吸收：七次稳定性检验，其紫外吸收图谱均与初始状态基本相同， $E_{250nm} 1cm \geq 10$ 、 $E_{260nm}/E_{280nm} \geq 2.0$ 均符合PSTFp质量标准草案要求，且与初状态相似。

4、多肽与核糖含量：两年间共进行七次测定，其结果均符合要求，且与初始状态的多肽与核糖量无明显差别。

5、活性测定：采用白细胞粘附抑制试验，结果表明其指数无显著差别。表明PSTFp在室温、避光下保存二年，仍具有与新制品相同的生物活性。

6、PH值测定：二年间取三批PSTFp的PH值无显著改变，七次检测结果均符合质量标准。

结论：本发明的抗乙肝胎盘转移因子粉针剂在室温、避光条件下保存二年，其外观性状、澄明度、PH值、紫外吸收度、多肽与核糖含量及免疫活性均无明显变化，表明使用在性玻璃包装对其质量无影响，安全检验及热原质试验均合格。

本发明的抗乙肝胎盘转移因子粉针剂的制备方法和现有技术相比，具有其产品性能与水针剂产品比较，稳定性明显好，毒副作用小，使用范围广，避免了水针剂在冬天易冻结或冷凝起来且注射使人肌肉疼痛的缺陷。可大规模生产，加入注射用水后所得的注射液经检验，各项指标均符合相关要求。本发明所述的粉针剂不仅具有生产工艺简便、方法易行，运输方便，而且还较水针剂产品具有稳定性好，质量高，贮藏周期长。因而，具有很好的推广使用价值。