

综述

血液制品的现状与展望

王卓, 赵雄, 吕茂民, 章金刚

军事医学科学院野战输血研究所, 北京 100850

摘要: 血液制品特指血浆蛋白制品和相应的重组制品。根据临床应用的效能, 血液制品可以分为白蛋白类、免疫球蛋白类、凝血因子类和微量蛋白制品等不同种类。血浆白蛋白制品是最早应用于战伤救治的血液制品, 高纯白蛋白、重组白蛋白以及重组白蛋白融合药物的研发和上市开创了血液制品的新局面。肌肉注射用免疫球蛋白因其制备工艺相对简单, 使用方便, 价格低廉且不良反应可以接受而一直在临床实践中应用; 静脉注射用免疫球蛋白随着新的适应症不断发现, 其应用范围越来越广; 皮下注射用免疫球蛋白的出现使免疫球蛋白的使用更加方便, 已经成为静脉注射用免疫球蛋白安全有效的替代品; 针对特定病原体的特异性免疫球蛋白在临床上更具有不可替代的作用。凝血因子和重组凝血因子类制品主要用于相应的先天性遗传性缺陷患者, 纤维蛋白原、因子VII、因子VIII、von Willebrand 因子复合物、因子IX和凝血酶原复合物、因子XI、因子XIII等制品的应用取得了良好的治疗效果。因子VIIa和活化凝血酶原复合物对于治疗产生凝血因子抑制物的血友病患者具有十分明显的效果。纤维蛋白原类制品和凝血酶在外科止血方面发挥着重要的作用。多种微量血浆蛋白制品已经上市, 如蛋白C、抗凝血酶、 α_1 -抗胰蛋白酶和组织纤溶酶原激活剂等。部分微量血浆蛋白制品也在研发和临床试验过程中, 如C₁-抑制剂、补体系统I因子、 α_2 -巨球蛋白、血清胆碱酯酶、铜蓝蛋白以及纤维结合蛋白等。尽管多种重组血浆蛋白制品已经上市, 血浆来源的制品仍将具有其不可替代的特殊地位, 血浆蛋白新品种的研发仍是热点。目前, 我国血液制品的研发与国外存在着较大的差距, 我国血液制品企业面临着机遇与挑战。

关键词: 血液制品, 血浆蛋白, 重组血浆蛋白, 白蛋白, 免疫球蛋白, 凝血因子

Current status and trends in blood biologicals

Zhuo Wang, Xiong Zhao, Maomin Lv, and Jingang Zhang

Key Laboratory for Blood Products and Blood Substitutes, Institute of Transfusion Medicine, Academy of Military Medicine Science (AMMS), Beijing 100850, China

Abstract: Blood products are those biologicals derived from plasma or obtained by recombinant technologies. This overview covers the characteristics and classification of plasma proteins, the current status of products (albumin, immunoglobulins, coagulation

Received: December 22, 2010; **Accepted:** May 3, 2011

Supported by: Drug Major Project of National Innovation (No. 2008ZXJ09004-003), Military Medical and Health Plans (Nos. 01L042, 08G156), National Key Technology R&D Program (No. 2008BA154B08-4), Innovation Fund and Blood Transfusion Security of AMMS.

Corresponding author: Jingang Zhang. Tel: +86-10-66932221; Fax: +86-10-68164971; E-mail: zhangjg@nic.bmi.ac.cn

国家创新药物重大专项 (No. 2008ZXJ09004-003), 全军医药卫生计划 (Nos. 01L042, 08G156), 国家科技支撑计划 (No. 2008BA154B08-4), 军事医学科学院创新基金和输血保障工程项目资助。

factors and microcontent proteins), as well as the likely trends in the near future. Human serum albumin is one of the earliest, safest and most widely used proteins in the pharmaceutical field. The approval and development of high-purity plasma albumin, recombinant human albumin and HSA fusion proteins provide a favorable prospect for the therapeutic protein. Normal immunoglobulin contains antibodies to all the micro-organisms prevalent in the donor population. The IMIG is relatively simple to prepare and use, and the side effects are acceptable; IVIG is used mainly to treat patients with primary immunodeficiency syndromes; SCIG preparations can be used in selecting suitable patients for home therapy and have occurred fewer adverse systemic reactions; specific immunoglobulins contain concentrations of antibody to an individual organism or toxin at a higher titer than normal immunoglobulin and can not be replaced in clinical use. The plasma-derived or recombinant coagulation factors are used to treat the patients with congenital or acquired factor deficiency. The products such as Fibrinogen, FVII, FVIII, von Willebrand complex, FIX/PCC, FXI, FXIII and so on, have been widely used and proved to be effective. The development of recombinant FVIIa is now as a good bypassing product to haemophilia with inhibitors. The Fibrinogen and thrombin play a very important role in surgery hemostasis. Moreover, microcontent proteins including protein C, antithrombin, α_1 -AT, tPA have been licensed and used in clinical treatment; a number of other small field proteins are under produced research or pre-clinical investment. The ongoing development of new recombinant plasma proteins is providing alternatives for patients, but the distinct position and the potential impact of plasma-derived preparations are unique, furthermore the development of new plasma protein is still a hot spot in global pharmaceuticals. Nowadays, a relative difference exists in the development of blood products between our nation and developed countries, so the domestic manufacturers are faced with chances and challenges.

Keywords: blood biological, plasma protein, recombinant plasma protein, albumin, immunoglobulin, coagulation factor

血液制品 (Blood products) 是由健康人血浆或经特异免疫的人血浆, 经分离、提纯或由重组 DNA 技术制备的血浆蛋白组分, 以及血液细胞有形成分的统称^[1]。不同国家和学者对血液制品的理解稍有偏差, 一般分为“广义”和“狭义”两类。广义的血液制品是指经过物理、化学、生化、生物等技术制备的血液与血液相关的制品, 包括全血与成分血制品、血浆蛋白制品等; 狭义的血液制品则为经过生化提取、基因重组、转基因动植物等技术制备的血浆蛋白与重组血浆蛋白制品。其中, 血浆蛋白制品在国际上通常称为血浆衍生制品。

本文在简要归纳血浆蛋白特性与分类的基础上, 结合重组血浆蛋白制品的应用与研发, 分别重点介绍了白蛋白、免疫球蛋白、多种凝血因子以及其他血浆蛋白制品的现状, 并对其未来趋势进行了展望。

1 血浆蛋白的特性与制品分类

血浆是去除了红细胞、白细胞、血小板等有形成分后的血液无形成分, 为淡黄色的清亮液体, 约占全血体积的 55%。在血浆成分中, 水占 90%, 蛋

白质占 7%, 糖、脂、氨基酸、电解质、核苷类和其他代谢产物占 3%。

1.1 血浆蛋白的特性

与体内其他蛋白相比, 血浆蛋白具有其特殊性, 执行着机体的多种生理/病理学效应^[2]。不同血浆蛋白的含量与特性, 对血浆蛋白制品研发中的技术选择和成药性具有极其重要的意义。

1.1.1 种类繁多

常规技术可以鉴定的、具有特定生理功能的血浆蛋白成分达 200 余种, 已经分离纯化的已有数十种, 研究较多的有近百种。近年来随着蛋白质组技术的发展, 血浆蛋白的数量成指数增长, 可以证实的不同蛋白点达 10 000 以上。人们根据血浆蛋白的不同含量, 将其分为大量蛋白、中量蛋白、小量蛋白、微量蛋白和痕量蛋白。可以认为, 血浆蛋白质组学已经成为现代生命科学的热点之一, 并将对血浆蛋白的认识产生积极的影响。

1.1.2 功能多样

由于血浆蛋白的种类繁多, 其生理功能多种多样, 对机体的有序运行起着极为重要的作用。机体的免疫、凝血和抗凝血以及激素、药物、营养物质

传递等均与血浆蛋白有关。血浆蛋白质组技术的研究成果,将会发现许多新的血浆蛋白,赋予血浆蛋白更多的功能,进而推动重组技术的应用和重组产品的问世。

1.1.3 性质特殊

血浆蛋白因其种类和功能不同,而表现出不同的性质,使得血浆蛋白的重组表达与纯化技术具有很大的特殊性。白蛋白虽然结构相对比较简单,但其含量高,静脉输注量大,重组产品的杂蛋白总量很难达到安全性要求;免疫球蛋白、各种凝血因子往往存在复杂的结构和化学修饰,原核细胞表达难以获得与天然产物相近或相同的产品。尽管哺乳细胞表达可以获得与天然产物相近或相同的产品,但是其表达量很低,纯化也比较困难,难以达到产业化的目的。

1.2 血浆蛋白制品的原料来源与技术途径

一般来讲,血浆蛋白制品的来源是健康人的血浆。随着现代生物技术的发展,制备血浆蛋白的原料显然不仅限于人体来源,工程细胞株和转基因动物已经有多种产品上市,转基因植物的研究也呈现了良好的发展前景。

1.2.1 原料血浆

原料血浆是指以单采血浆术采集的供生产血浆蛋白制品用的健康人血浆。原料血浆是血浆蛋白工业的源头,保证充足而高品质的原料血浆供应是血浆蛋白工业发展的先决条件^[3]。

为确保原料血浆的质量,各国监管部门均有严格的标准。在对采集的血浆进行蛋白含量、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、HBsAg、梅毒、HIV-1 抗体、HIV-2 抗体和 HCV 抗体检测的同时,还要求有 3 个月的检疫期。

原料血浆采集后一般在-20 °C或-20 °C以下保存。用于分离人凝血因子Ⅷ的血浆保存期不应超过 1 年;用于特异性免疫球蛋白制备的血浆,单人份血浆及混合血浆的抗体效价应分别制定明确的合格标准;用于分类其他血浆蛋白制品的血浆保存期不

应超过 3 年。

1.2.2 基因工程细胞

基因重组的宿主系统一般分为大肠杆菌、酵母、昆虫细胞和哺乳动物细胞等。鉴于多数血浆蛋白制品存在复杂的结构和化学修饰,大肠杆菌系统难以满足要求。常用的工程细胞株通常有酵母和哺乳动物细胞,如用毕赤酵母表达白蛋白,中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 表达重组人凝血因子Ⅷ和Ⅸ,HEK293 细胞表达重组人蛋白 C 等。

1.2.3 转基因动物

转基因动物的一个重要应用就是生物制药,其中乳腺是外源基因在转基因动物体内最理想的表达场所^[4]。

目前,已经有转基因小鼠、兔、绵羊、山羊、猪、牛、鸡和鱼等多种转基因动物问世。多种蛋白已经实现了转基因动物的乳腺表达,如抗凝血酶和 α 1-抗胰蛋白酶等,其中转基因奶山羊的抗凝血酶已经在美国批准上市。

1.2.4 转基因植物

转基因植物作为药用蛋白表达系统,可以克服原核表达系统如细菌难以完成的外源蛋白修饰和正确折叠的缺陷,在规模化生产、安全性和生产成本方面比传统的细菌、动物细胞和转基因动物系统均具有较大优势^[5-6]。目前,已经有 35 科 120 多种植物转基因获得成功,如水稻、小麦、玉米等等。

转基因植物可以用于疫苗、药用蛋白以及抗体的生产,如乙型肝炎表面抗原、大肠杆菌不稳定肠毒素 (LT2B) 抗原、诺沃克病毒衣壳蛋白、口蹄疫病毒 VP1 抗原、霍乱抗原、狂犬病毒糖蛋白等。血浆蛋白,如人凝血因子Ⅸ也处于研究之中。

1.3 血浆蛋白制品的分类

血浆中现已明确分子结构的蛋白质有 100 多种,而已经分离出来用于临床的产品仅 20 余种。

在这 20 余种血浆蛋白制品,具有不同的分类方法。按照生理功能,可以分为转输蛋白类、免疫球蛋白类、凝血系统蛋白类和蛋白酶抑制物。按照原

料来源与技术途径, 可以分为血浆蛋白制品和重组血浆蛋白制品。按照应用于临床的种类, 可以分为白蛋白类、免疫球蛋白类、凝血因子类和微量蛋白。本文即按最后一种分类方法进行介绍。

2 白蛋白与重组白蛋白制品

2.1 白蛋白的特性与生理功能

白蛋白(又称清蛋白, albumin, Alb)是血浆中含量最多的蛋白质。人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)约占血浆蛋白质的50%~60%(35~55 g/L), 半衰期为13.5 d。HSA是由肝脏合成的单链、非糖基化蛋白质, 占肝脏合成蛋白总量的25%和分泌蛋白总量的50%。

成熟的HSA共有585个氨基酸残基, 肽链紧密折叠成13 nm×13 nm的球形蛋白, 含有17对链内二硫键。HSA的结构特点赋予了白蛋白分子的热稳定性和强可溶性, 进而在体内起着维持血浆胶体渗透压、营养运输、抗凝血、清除自由基和保护其他重要生物物质的作用^[7]。

白蛋白所产生的胶体渗透压约占血浆胶体总渗透压(25~33 mmHg)的75%~80%, 1 g白蛋白产生的渗透压相当于20 mL液体血浆或40 mL全血。白蛋白的分子结构使其能与游离脂肪酸、胆红素、某些类固醇激素、某些金属阳离子、酶和药物等多种物质结合, 并且还能结合有毒物质, 将其运送至解毒器官, 排出体外。组织蛋白和血浆蛋白可互相转化, 为组织提供营养, 促进肝细胞的修复和再生。白蛋白盐与白蛋白形成缓冲对, 参与维持血浆正常的pH。

除了用于治疗烧伤、失血引起的休克, 防治低蛋白血症及肝硬化或肾病引起的水肿或腹水, HSA还能作为许多宿主细胞和工程细胞株的培养基成分以及生物制品的稳定剂。

2.2 血浆来源的白蛋白制品

血浆白蛋白制品的研发动力来自于战争需求。第二次世界大战期间, 前线急需的大量全血或血浆

无法解决, 美国军方委托哈佛医学院的Cohn教授制备相应的替代品。最初的产品是采用动物血浆和动物血清白蛋白用于人体, 并且建立了一整套分离牛血浆中白蛋白的分离技术(Cohn氏法)。但是, 在抢救了许多伤病员的同时, 严重的后发不良反应陆续出现, 因此, Cohn在与美国红十字会合作时, 用上述低温乙醇沉淀法从人血浆中分离纯化出高纯度人血清白蛋白并进行了大量临床应用, 取得了良好的救治效果。现代血浆蛋白制备工艺和产业雏形也因Cohn氏法的推广得到了发展。

虽然Cohn氏法组分V制备的人血清白蛋白在体内具有很好的耐受性, 但其中仍含有能够引起不良反应的蛋白成分, 包括结合珠蛋白、血凝素、转铁蛋白、脂蛋白、变性白蛋白/聚集体、GC-球蛋白、内毒素、铝离子等。随后, 不同厂家和学者均致力于工艺改进和产品质量的提高, 加之巴氏灭活病毒工艺的引入, 人血白蛋白制品已经成为最为安全的生物制品之一。

近年来, 高纯度白蛋白成为一个发展方向。Kister-Nitschmann方法分离组分V, 再经离子交换层析纯化的白蛋白, 超过了欧洲药典的相关要求, 具有更高的纯度, 更高白蛋白单体含量, 其白蛋白纯度>98%, 单体含量>95%, 铝含量<25 μg/L, 降低了内毒素含量(无不合格批次), 改进了稳定性, 白蛋白颜色转变为绿色^[8]。一体化制造过程的引进和层析条件的优化, 使利用组分V生产高纯度血清白蛋白的方法能够运用到大规模的生产中, 提高了血清白蛋白临床使用的安全性。

2.3 重组白蛋白制品

鉴于血浆来源白蛋白的某些局限性, 应用基因工程技术表达重组人血清白蛋白(rHSA)一直是产业界关注的热点之一。从适应症来看, 重组白蛋白可以分为两大类, 即输注用重组白蛋白和培养基/辅料用重组白蛋白, 并且均已有的产品上市。

白蛋白已在多种系统中获得表达, 但是其临床用量决定了研发难度。rHSA最初在大肠杆菌中表

达成功, 表达量为细胞总蛋白的 7%, 但因为 HSA 含有大量的二硫键, 使大肠杆菌表达的蛋白难以正确折叠, 未能得到有生物功能的重组蛋白; 同时细菌细胞壁脂多糖造成热反应也带来很多麻烦^[9]。

酵母作为真核生物具有对所表达的蛋白翻译后修饰等功能, 适用于重组白蛋白的制备。目前, rHSA 主要在毕赤酵母中表达^[10]。在毕赤酵母表达系统中, 重组白蛋白的分泌量高 (可达到 10~20 g/L), 表达稳定, 可形成正确的折叠, 以成熟的蛋白分泌到培养基中。Ohnishi 等^[11]分析比较了毕赤酵母生产的 rHSA 和血浆纯化白蛋白的理化性质和免疫化学特性, 结果显示二者在分子组成、结构及生理功能上基本一致; Bosse 等^[12]还进行了 rHSA 在人体内的耐受性、安全性、及药物代谢动力学等研究, rHSA 与天然 HSA 表现出相同的性质。由此可见, rHSA 可作为天然 HSA 的替代品用于临床。

虽然世界上许多实验室及公司都在进行 rHSA 的研发, 但实现药物级 rHSA 的大规模生产仍是个极具挑战性的课题。目前, 在该领域领先的主要有日本的 Green Cross 公司, 美国的 Genetech 公司和英国的 Delta 公司。前者生产的 rHSA 已通过 III 期临床试验, 2008 年日本 Mitsubishi 公司 (前 Green Cross 公司) 推出纯度为 99.999 999% 的 rHSA (Medway), 是目前国际市场上纯度最高、生产规模最大且成本最低的重组白蛋白。英国的 Delta 公司已经完成 I 期临床试验, 美国 Genetech 公司处于临床前的中试研究阶段。近几年来, 我国多家单位已经开展基因重组白蛋白的研究并取得了一定的进展。

除注射用 rHSA 以外, 英国 Novozymes 公司和我国华北制药已获得辅料级 rHSA 生产的批文。2010 年 3 月, Novozymes 公布的最新数据显示, 作为药物保护剂的上市重组白蛋白产品 Recombumin 能够稳定蛋白质药品组分并防止其降解, 从而有效延长药品货架寿命、加强药品效能。

由于静脉输注的白蛋白用量大, rHSA 这一用途很难获得药品管理当局的批准。但是, 疫苗生产用

的培养基添加物和保护剂等对 rHSA 的需求量很大, 使得重组白蛋白的市场前景看好。

2.4 重组白蛋白融合药物

利用白蛋白作为融合蛋白制备的长效药物也已成为近年来研究和开发的重点, 并有部分产品正在进行临床试验。

美国 Human Genome Science 公司已经进行了一系列与 HSA 融合蛋白延长蛋白质药物半衰期的研究, 其蛋白质药物 HSA/IFN- α 已经完成了 II 期临床试验; 处于临床早期研发阶段的融合蛋白药物如 HSA/IFN- β (Albuferon- β)、HSA/rIL-2 (Albuleukin)、HSA/rG-GSF (Albugranin) 和 HSA/rHGH (Albutropin) 等, 都显示出了很好的安全性、耐受性以及较理想的半衰期; 我们将人内皮抑素与白蛋白通过柔性肽相连, 在毕赤酵母中所表达的重组融合蛋白可以有效抑制 ECV-304 细胞的增殖, 表现出较高的生物学活性^[13]。

另外, Wang 等^[14]的研究发现, 白蛋白 DNA 与四苯基卟啉结合形成融合蛋白 rHSA-FeP II, 在生理条件下能够可逆地结合或释放氧, 与血红蛋白的生理功能很相似, 并且其呈现出较好的人全血兼容性, 可在体内大量地运输氧气, 被认为是合成人红细胞代用品的理想材料。

由此可知, 白蛋白融合蛋白除具有该活性蛋白的生物学作用外, 还能提高蛋白在体内的稳定性和生物学活性, 为白蛋白的研究和开发提供了更广阔的市场前景。

3 免疫球蛋白与特异性免疫球蛋白制品

免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig) 是指具有抗体活性或分子结构上与抗体相似的一类球蛋白, 其主要作用是通过特异性结合相应抗原、活化补体以及结合 Fc 受体产生抗体依赖的细胞介导细胞毒作用和调理吞噬作用, 阻断或消除各种病原体对人体的致病作用。

3.1 免疫球蛋白的特性与制品分类

免疫球蛋白是血浆中除白蛋白外含量最丰富的血浆蛋白质, 约占血浆蛋白总量的 12%~15%。其中, 免疫球蛋白 G (IgG) 约占免疫球蛋白总量的 70%~80%, 是最重要的一类免疫球蛋白, 临床使用的免疫球蛋白制品中主要是 IgG。

免疫球蛋白分子的基本单位都是由 4 条肽链构成的对称结构, 包括 2 条相同的重链和 2 条相同的轻链, 其中, 轻链又分为 κ 和 λ 2 种结构类型。在人体内, 血浆免疫球蛋白可分为 5 种类型, 每种都有特殊的结构和功能, 分别命名为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。其中, IgG 又包括 4 个亚型, 即 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4, IgA 和 IgD 也分别由 2 个亚型, 这些差异是由 Ig 分子上氨基酸序列的不同所致, 很多情况是由 Ig 微小的抗原差异性造成的。

免疫球蛋白的应用可以追溯到 1891 年, Behring 等应用能中和白喉毒素抗体的羊血清治愈白喉患儿, 开创了免疫球蛋白治疗新时代。由于当时科学技术的限制, Behring 等的异源免疫球蛋白具有较大的副作用, 而且难以规模化制备。

直到上世纪中期, Cohn-Oncley 法^[15]和 Kistler-Nitchmann 法^[16]的建立使得规模化生产免疫球蛋白成为可能。上述两种方法, 已经成为当前制备免疫球蛋白的两种核心技术, 发展出了多种应用于临床的免疫球蛋白制品, 并且不断推出新的适应症。

目前, 已经上市的免疫球蛋白制品已有近 20 种。根据原料血浆的特性和制品的功能效应, 可以分为正常人免疫球蛋白和针对不同病原/抗原的各种特异性免疫球蛋白; 根据注射途径, 可以分为肌肉注射用免疫球蛋白、静脉注射用免疫球蛋白和皮下注射用免疫球蛋白 3 大类。

免疫球蛋白作为传统的抗体治疗制剂已经有了百年的历史, 历经了从动物源免疫球蛋白到人源免疫球蛋白, 从肌肉注射免疫球蛋白到静脉注射免疫球蛋白, 从正常免疫球蛋白到特异性免疫球蛋白的发展历程。免疫球蛋白的使用范围和适应症不断扩

大, 在疾病的预防和治疗领域的作用也日益增强。

3.2 肌肉注射用免疫球蛋白

传统免疫球蛋白制品, 特别是特异性免疫球蛋白制品的输注途径是肌肉注射。与异源抗血清相比, 可以避免相关不良反应的发生。其主要适应症为免疫低下症、替代治疗、预防某些病毒和细菌感染等。

最初制备的免疫球蛋白曾尝试用于静脉注射, 但是静脉注射后会产生比较严重的副作用, 所以当时的免疫球蛋白主要用于肌肉注射。由于肌肉注射的剂量受限, 大部分的免疫球蛋白在进入血液循环前被酶解, 使得其利用率较低。

尽管如此, 肌肉注射免疫球蛋白由于其制备工艺相对简单, 并且具有使用方便、价格低廉、不良反应可以接受等特点一直在临床实践中使用。

3.3 静脉注射用免疫球蛋白

上世纪 60 年代起, 免疫球蛋白静脉输注所产生的严重副反应原因被逐步揭示, 主要原因是制剂中存在着与 IgG 聚合物相关的抗补体活性 (ACA)。于是, 静注免疫球蛋白 (Intravenous immunoglobulin, IVIG) 研制的工作主要集中在防止 IgG 聚合体的出现, 从而减少 ACA 的研究上。

IVIG 的制备技术主要经历了 3 次变革和发展^[17], 即第 1 代的酶解法制备产品、第 2 代的化学修饰法制备产品和第 3 代的天然结构免疫球蛋白产品, 至今已形成了比较完善的制备工艺, 其中第 3 代产品既去除了抗补体活性, 又能够保持 IgG 的完整生物学功能。

目前上市的 IVIG 制品均为第 3 代制品, 同时又引入了两步病毒灭活工艺, 使得制品在输注安全和病毒安全等方面有了很大的提高。

IVIG 主要通过抗体补充和免疫调节作用对多种疾病起到治疗作用, 其应用范围和适应症有原发性及继发性免疫缺陷症、各种自身免疫性疾病、细菌性和病毒性感染等^[18-21]。新近的适应症还有周期性自发性流产、癌症以及预防过多胶原积聚^[22]。随着临床应用范围的不断扩大, 许多新的适应症也在不

断被发现^[23]。

3.4 皮下注射用人免疫球蛋白

皮下注射用人免疫球蛋白 (Subcutaneous injection immunoglobulin, SCIG), 是一种新的输注方式的免疫球蛋白。美国 FDA 分别于 2006 年和 2010 年批准了 ZLB Bering 公司的皮下注射用人免疫球蛋白 Vivaglobin 和 CSL 公司的皮下注射用人免疫球蛋白 Hizentra 上市。

该制品的优点是能够在室温 (不超过 25 °C) 下保存, 随时可用, 易于携带, 病人可在家自行接受治疗, 也适于静脉通路差或对 IVIG 有反应的病人。目前批准的适应症为治疗原发性免疫缺陷病 (PID), 其治疗效果与常规静脉注射效果相似, 是静脉注射用免疫球蛋白的安全和有效的替代品。

SCIG 含有纯度为 98% 的 IgG, 是浓度为 20% 的液体制剂。采用低温乙醇分离, 结合辛酸-阴离子交换层析制备工艺^[24], 通过 S/D 和纳米膜过滤两步病毒去除工艺确保制品的病毒安全性, 另外, 辛酸盐的使用也有助于病毒的去除^[25]。该制备工艺中 IgG 不会受到化学或酶的修饰, 保留了完整 IgG 分子的 Fc 和 Fab 功能。

SCIG 在皮下注射时需要专用输液泵进行输注, 输注时采用多部位输注, 每个部位最大输注量不超过 25 mL, 每个部位输注速率控制在 15~20 mL/h。多部位同时输注时, 最大输注速率不要超过所有合并输注部位总共 50 mL/h。

3.5 特异性免疫球蛋白

近一个世纪以来, 特异性免疫球蛋白 (Specific immunoglobulin) 一直用于预防和治疗一些发病率高、感染后果严重、无特效治疗方法的病原体感染, 在临床上具有非常重要和不可替代的作用。

特异性免疫球蛋白是指针对某一特定病原体的免疫球蛋白, 是用特定疫苗或抗原免疫献浆员, 或筛选自然感染者而获得。采用血浆蛋白分离和纯化技术可将原料血浆中的特异性免疫球蛋白 (IgG) 制备成相应的制品。与正常免疫球蛋白不同, 特异

性免疫球蛋白是一种有高度特异性、高比活性、高效价抗体的被动免疫制剂。

特异性免疫球蛋白的制备技术与工艺基本与肌肉注射免疫球蛋白或静脉注射免疫球蛋白的制备工艺相同, 其关键点和难点主要取决于能够获得高滴度特异性抗体的原料血浆和建立快速、准确的血浆特异性抗体效价筛查方法。由于原料血浆的特异性抗体滴度高低取决于单份血浆的检测, 在规模化生产的情况下, 所涉及的单份血浆检测量非常大, 因此要求筛查所采用的检测技术操作简单、快速而且准确; 选择适合的抗体检测方法并对方法学 (包括重复性和准确性) 进行充分的验证, 是保证检测结果准确可靠和原料血浆质量的关键。

目前, 以人血浆为原料制造的特异免疫球蛋白制品已经有十余种, 按其针对的抗原可以分为以下 4 类: 抗病毒类特异性免疫球蛋白, 包括巨细胞病毒 (CMV) 免疫球蛋白、呼吸道合胞病毒 (RSV) 免疫球蛋白、水痘-带状疱疹病毒 (VZV) 免疫球蛋白、痘苗特异性免疫球蛋白、风疹免疫球蛋白、麻疹免疫球蛋白、甲肝免疫球蛋白、乙型肝炎免疫球蛋白、狂犬病免疫球蛋白等; 抗细菌类的特异性免疫球蛋白, 包括布氏菌特异性免疫球蛋白、炭疽杆菌免疫球蛋白等; 抗毒素类的特异性免疫球蛋白, 如破伤风免疫球蛋白等; 此外还有抗 Rh (D) 免疫球蛋白等。

4 凝血因子类制品

凝血因子类制品种类繁多, 主要用于相应的先天性遗传性缺陷患者。现代的凝血因子制剂制备主要是基于低温乙醇法和其他新方法、新技术的结合, 即离子交换层析、亲和层析以及超滤法等, 并且采用了有效的病毒灭活/清除方法。上述方法制备的凝血因子制剂具有较高的纯度和活性, 而且使用安全, 发生 HIV、HBV 或 HCV 感染的可能性已经极小^[26]。

国内外已上市的凝血因子类制品, 按照来源可以分为血浆来源和重组来源两大类。血浆来源的凝

血因子类制品包括纤维蛋白原、凝血酶、因子Ⅶ、因子Ⅷ、von Willebrand 因子制剂、因子Ⅸ、凝血酶原复合物、因子Ⅺ和因子ⅩⅢ。重组来源凝血因子类制品包括凝血酶、因子Ⅶ、因子Ⅷ、因子Ⅸ。

4.1 纤维蛋白原

纤维蛋白原 (Fibrinogen, Fg) 即凝血因子 I, 是凝血过程中一连串凝血因子相继激活的最终底物。Fg 由两个相同的亚单位组成, 每个亚单位有 3 条不同的多肽链, 分别为 α 链、 β 链和 γ 链。凝血的第 3 阶段, 在凝血酶的作用下, 先由 α 链脱去 A 肽, 继而 β 链脱去 B 肽, 纤维蛋白原被水解成纤维蛋白。纤维蛋白分子相互聚合, 在 FXⅢ 的作用下, 交联成稳定的不可逆的多聚体, 进而发生凝血/止血效应。

早在 20 世纪 40 年代, 采用 Cohn 低温乙醇法分离出来的 Fg 制品就已应用于临床; 但当时 Fg 制品的生产工艺中尚不含对制品的病毒灭活处理, 这导致患者在输注后引起病毒性肝炎的危险性很大, 美国 FDA 于 1978 年 7 月禁止其使用。Fg 制品病毒灭活方法的研究取得成功, 使该制品又重新开始生产^[27]。

目前, Fg 制品有 2 类, 即注射用 Fg 制品和外用 Fg 制品。前者主要为冻干人 Fg, 适应证主要有先天性无或低纤维蛋白血症、继发性纤维蛋白原缺乏、弥漫性血管内凝血 (DIC) 及原发性纤维蛋白溶解症等; 后者是纤维蛋白胶 (Fibrin sealant), 其在外科止血方面发挥着极其重要的作用^[28-29], 对组织粘合、促进缝合创口愈合及封闭内空腔也有一定的作用^[30]。

在注射用 Fg 制品方面, 2009 年, 美国 FDA 重新批准了 CSL 公司的静脉输注人 Fg 制品 RiaSTAP 上市, 用于先天性无/低纤维蛋白原血症引起的急性出血。国内曾启动静脉注射用 Fg 的再注册机制, 目前已有多家厂商的产品上市或正在注册中。

在外用纤维蛋白制品方面, FDA 先后批准上市了 Baxter 公司的纤维蛋白胶 TISSEEL, Omrix 公司

的纤维蛋白胶 EVICEL, Baxter 公司生产的纤维蛋白胶 ARTISS, Nycomb 公司生产的纤维蛋白止血贴 TachoSil。

在国内, SFDA 先后批准了华兰生物、上海莱士等公司生产的人纤维蛋白胶上市, 尚未有纤维蛋白止血贴上市。我们开展了纤维蛋白止血贴的研制, 取得了可喜的进展^[31-32], 准备进一步开展临床试验。

4.2 凝血酶

凝血酶 (Thrombin) 是由 308 个氨基酸组成的蛋白水解酶, 相对分子质量约为 36 000, 由 A 链和 B 链组成。凝血酶 A 链的功能尚不十分清楚, 可能对凝血酶的整体结构与功能起稳定作用^[33]; B 链是其活性中性所在部位, 通过对多种凝血因子的蛋白水解作用而参与凝血过程。

作为局部止血药, 2003 年中国 SFDA 批准上海莱士血液制品有限公司的外用冻干人凝血酶上市, 辅助用于处理腹部切开创面的渗血。在 2005 年批准华兰生物工程股份有限公司的外用冻干人凝血酶上市。

2007 年, 美国 FDA 批准了 Omrix 公司生产的凝血酶, 商品名为 Evithrom, 用于处理毛细血管和小静脉的渗血。

2008 年, 美国 FDA 批准 ZymoGenetics 公司的重组凝血酶外用制剂 (Recothrom) 上市用于局部止血。该产品是首个和迄今唯一获准上市的用于局部止血的重组无血浆药品。Recothrom 采用经过基因修饰过的 CHO 细胞为表达细胞株, 其化学结构与功能与人凝血酶相类似^[34]。基于一项 411 例病人参加的 III 期临床关键试验, 该产品被证实与牛凝血酶有同等的功效和相似的副作用谱, 却显著减少抗体产生几率^[35-36]。

4.3 因子Ⅶ

凝血因子Ⅶ (FⅦ) 是一种维生素 K 依赖性血浆糖蛋白, 由肝脏实质细胞分泌, 在血浆中以酶原形式存在。活化前 FⅦ以单一多肽链形式存在, 经活

化转变成活性 FVII (FVIIa) 后, 其促凝活性明显增加, 与组织因子 (tissue factor, TF) 结合形成复合物 TF/FVIIa 激活下游凝血因子。另外, FVIIa 能够活化 FIX 进而参与内源性凝血。

Broze 等^[37]以新鲜冰冻血浆为原料, 经过硫酸钡吸附和硫酸铵分离以及三步层析, FVII 被浓缩 10^5 倍, 活力回收率达到 30%。Tomokiyo 等^[38]以冷沉淀为原料, 应用阴离子交换和免疫亲和层析获得 FVII, 然后分别采用纳米过滤和 Ca^{2+} 孵育激活 FVII, 从而建立大规模制备 FVIIa 的方法。

鉴于血浆 FVII 的来源有限, 重组 FVII 成为研发的重点之一。Novo Nordisk 公司为静脉注射 rhFVIIa 先后在欧洲、美国和我国注册, 用于先天性 FVII 缺乏或凝血因子产生抑制物的获得性血友病患者出血发作和预防手术出血。

国内对 rhFVIIa 进行了一系列的研究, 但相关报道不多。我们先后在不同哺乳动物细胞中实现了 rhFVIIa 的表达, 并建立了相应的纯化方法^[39-42]。

临床试验表明, rhFVIIa 具有良好的安全性和有效性, 为血友病人的治疗展示了乐观的前景^[43-44]。随着 rhFVIIa 临床应用范围的不断扩大, 许多新的适应症也在不断被发现^[40]。

4.4 因子VIII

凝血因子VIII (FVIII), 又称为抗血友病因子, 在内源性凝血体系中具有十分重要的作用, 是激活凝血因子IX的辅助因子。FVIII由血管内皮细胞分泌入血, 是来自肝外的唯一凝血因子, 由高分子量部分 (VIII: Ag) 和小分子量部分 (VIII: C) 两种成分组成。

已有多种方法用于从冷沉淀中提取因子VIII浓制剂, 如低温乙醇沉淀、聚乙二醇沉淀、甘氨酸萃取法、氢氧化铝纯化法、离子交换层析和亲和层析等。1996年FDA首次批准Baxter公司血浆来源的人抗血友病因子Hemofil M。2000年批准ZLB公司的巴氏消毒, 单克隆抗体纯化的血浆来源的人抗血友病因子Monoclate-P。2002-2003年, SFDA先后批准上海莱士、华兰生物等公司生产的冻干人凝血

因子VIII。

基因重组因子VIII (rFVIII) 是第1个上市的重组凝血因子制品。1992年FDA批准了Baxter公司的第1代rhFVIII产品Recombinate, 该产品是用经遗传工程化CHO细胞株合成的糖蛋白。1993年FDA批准了Bayer公司利用经人因子VIII转染的BHK细胞生产的Kogenate FS。1999年和2000年欧洲和美国分别批准Genetics Institute的缺失B-结构区rhFVIII产品ReFacto。2003年FDA批准了Baxter公司的第2代无血浆白蛋白rhFVIII制品Avate。2007年, SFDA批准了首个国内上市的rFVIII拜科奇。

长达20年的临床应用表明, rFVIII与天然FVIII具有相似的生化、免疫及药理学特性, 能有效纠正血友病患者的出血倾向, 具有良好的治疗效果^[45]。由于rFVIII具有较为明确的临床疗效指标, 普遍认为它是一个具有良好应用前景和巨大经济效益的基因工程药物。目前, 加拿大与爱尔兰几乎所有血友病患者、美国70%以上重症血友病患者使用rhFVIII进行治疗。

4.5 von Willebrand 因子复合物

von Willebrand 因子复合物作为凝血因子VIII的载体蛋白, 用于血管性假性血友病 (vWD) 等的治疗。vWD是由于血浆中vWF的质和量的缺陷而引起的出血倾向为主的疾病, 一般采用新鲜冰冻血浆、冷沉淀和von Willebrand 因子复合物进行治疗。

1978年, Grifols公司的von Willebrand 因子复合物Alphanate上市。1991年法国里尔输血中心通过氢氧化铝吸附和3次层析, 研制出一种高纯von Willebrand 因子复合物。2000年CSL公司的von Willebrand 因子复合物Humate-P上市。

4.6 因子IX

因子IX (FIX) 为一种维生素K依赖性血浆蛋白, 在肝脏中合成并经过了糖基化修饰分泌至血液, 正常人血浆含量为50~70 mg/L。FIX在凝血级联反应中不仅是必须的蛋白因子, 而且当FIX与调控蛋白FVIII形成复合物后, 使反应速度成千倍增加, 致

使凝血过程仅在几分钟内即可完成。当人体内缺乏 FIX 时, 会导致乙型血友病, 表现为自发性或微外伤后出血不止, 严重者可因关节出血而导致关节变形和残废或因内脏或颅内出血而死亡。

人血浆来源凝血因子 IX 制剂 (Mononine, ZLB 公司) 于 2000 年由美国 FDA 批准上市。Mononine 通过免疫亲和层析纯化, 对于乙型血友病具有良好的治疗效果和安全性^[46-47]。

重组人凝血因子 IX (rhFIX) 于 1997 年由美国 FDA 批准上市, 由 Genetics Institute 和 Wyeth 公司研制, 商品名为 BeneFIX。BeneFIX 由通 CHO 细胞株生产, 具有较好的治疗效果, 能够增加血浆中 FIX 的水平, 纠正病人的凝血缺陷^[48-49]。

4.7 凝血酶原复合物

凝血酶原复合物 (Prothrombin complex concentrate, PCC), 由凝血因子 II、VII、IX 和 X 组成, 此 4 种凝血因子均为维生素 K 依赖性因子, 理化性质相近, 在规模生产过程中一般的方法很难将其分开。PCC 在临床上主要用于乙型血友病及维生素 K 缺乏或患肝病而引起的出血治疗。

PCC 制备的原料主要为新鲜冷冻血浆、去冷沉淀的血浆和低温乙醇法分离出的组分 I 上清或组分 III 沉淀。1971 年 Bruning 等^[50]报道用氢氧化铝吸附制备 PCC, 随后 Wickerhauser、Heystek 等^[51-52]采用 DEAE-cellulose、DEAE-Sephadex A50 等阴离子交换剂制备 PCC。

4.8 活化凝血酶原复合物

活化凝血酶原复合物 (Activated Prothrombin Complex Concentrate, APCC) 主要用于存在 FVIII 抑制物的血友病病人的治疗, 于 20 世纪 70 年代开发上市。“活化 PCC”和内含肝素对已产生抑制物的血友病病人有一定的效果。APCC 止血的确切机制尚不清楚, 可能与绕过 FVIII 的旁路凝血反应有关。

1980 年美国 Hyland 公司的 APCC Autoplex 获得 FDA 的生产许可, 1982 年 Immumo 公司的 FEIBA 由 FDA 批准上市。但是, APCC 在临床应

用中有潜在血栓形成的风险, 使用过程中应对患者进行监测。

4.9 因子 XI

凝血因子 XI (FXI) 由 2 个相同的亚单位组成的二聚体, 亚单位间由二硫键相连。在凝血过程中, 被活化的因子 XII 激活, 进一步激活因子 IX, 促进凝血。FXI 缺乏会导致丙型血友病。

FXI 的规模化制备方法通常有两种: 一是以去冷沉淀血浆为原料, 经过 DEAE-cellulose 和 heparin-Sepharose 两步层析, 再进一步纯化获得 FXI; 二是以血浆为原料, 经过阴离子和阳离子交换层析获得 FXI。

Burnouf-Radosevich 等^[53]以血浆为原料, 通过过滤吸附和阳离子交换层析制备 FXI, 该 FXI 具有高比活性 (130~150 U/mg) 和高效价 (约 100 U/mL)。

4.10 因子 XIII

凝血因子 XIII (FXIII) 是由 2 个 α 亚单位和 2 个 β 亚单位组成的四聚体, 活性中心位于 α 亚单位。在凝血过程中, FXIII 催化相邻的纤维蛋白单体共价交联, 使可溶性纤维蛋白转变为不溶的纤维蛋白多聚体, 从而形成稳定的纤维蛋白凝块。FXIII 制品主要用于先天性 FXIII 缺乏。

血浆来源 FXIII 的制备原料有血浆和胎盘血。Winkelman 等^[54]报道了利用血浆分级分析、色谱纯化等步骤获得 FXIII 的方法。Backer 等^[55]报道了以人胎盘血为原料经过乙醇沉淀、DEAE-Cellulose 以及分子筛等步骤制备 FXIII 的方法。

重组来源 FXIII 也处于研究之中, Board 等^[56]开展了在大肠杆菌中表达 rFXIII 的研究, Bishop 等^[57]尝试在酵母中表达 rFXIII, 取得一定的进展。针对 FXIII 缺乏患者开展的 I 期临床试验结果表明, rFXIII 与血浆来源的 FXIII 具有相似的半衰期, 还有较好地促进凝固能力和抵抗纤维蛋白降解的能力。

5 微量血浆蛋白成分

近年来, 随着分离技术的进步, 特别是离子交

换层析和亲和层析的应用, 血浆中的许多少量或微量蛋白成分被分离提纯, 用于治疗先天或后天缺乏这些蛋白所导致的疾病。因此, 微量血浆蛋白成分已经成为血液制品研究的热点之一。

5.1 蛋白 C

人蛋白 C (Protein C, PC) 是存在于血浆中的丝氨酸蛋白酶前体, 由肝细胞合成, 血浆中的正常浓度为 4 mg/L, 是抗凝系统的主要成分。内皮细胞膜上的凝血酶-凝血调节蛋白复合物激活 PC 后, 生成抗凝剂活化蛋白 C (aPC)^[58]。aPC 能降解活化的凝血因子 Va 和 VIIIa, 减弱其促凝活性。aPC 还在感染性疾病, 特别是严重脓毒血症、内毒素血症和弥散性血管内凝血 (DIC) 等治疗中起到了很好的作用。

自从 1976 年 Stemflo 等^[59]从牛血清中纯化得到 PC 以来, 其临床效果已经得到认可。欧盟与美国分别于 2001 年和 2007 年批准了奥地利 Baxter 公司的蛋白 C 制品 Ceprotrin。该产品采用鼠源单抗法对血浆中的 PC 纯化获得, 浓缩超过 20 000 倍, 浓缩物无蛋白水解活性, 体内外试验未发现其具有潜在的血栓形成能力, 可用于蛋白 C 缺乏病人的紫癜爆发、香豆素引起的皮肤坏死及严重蛋白 C 缺乏患者的短期预防。

重组人活化蛋白 C (商品名为 Xigris) 由 Eli Lilly 公司生产, 先后于 2001 年和 2002 年获准在美国、欧盟批准上市。Xigris 是一种丝氨酸蛋白水解酶, 氨基酸序列和糖基化位点与人血浆来源的 aPC 相同, 其作用可以缓解脓毒血症的多种主要症状, 包括血液凝结和促进纤维蛋白溶解。重组人活性蛋白 C 治疗重度脓毒血症的 III 期临床研究结果表明, Xigris 使重度脓毒血症病人的死亡风险降低了近 20%^[60]。本实验室在近年来也开展了重组蛋白 C 的研究。经过鉴定, 由 HEK293 细胞表达的重组蛋白 C 具有与血浆白 C 一致的生物学功能。目前我们对培养条件进行优化, 以期提高表达量^[61]。

5.2 抗凝血酶

抗凝血酶 (Antithrombin, AT) 是体内重要的抗

凝物质之一, 占血浆总抗凝酶活性的 50%~60%, 血浆中的含量为 0.1~0.2 g/L。AT 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂, 对凝血因子 IIa、Xa、IXa、XIa 以及纤溶酶、激肽释放酶和补体均有灭活作用, 在维持机体的出凝血平衡中起重要作用。因此, AT 制品适用于有先天性或获得性缺乏所致的静脉血栓和肺栓塞。

AT 浓缩剂的临床试用开始于 20 世纪 70 年代。近年来, 使用肝素亲和层析法从血浆中提取、纯化的 AT, 并经 60 °C, 10 h 灭活处理, 制备的静脉注射用 AT 浓缩制剂已在欧美等国得到较普遍的应用。该制剂可用于治疗先天性或获得性 AT 缺乏症, 如肝病或口服避孕药后引起的 AT 水平降低、DIC 或一些血栓性疾病的预防和治疗。

英国的 Genzyme Transgenics 公司利用转基因山羊生产的重组 AT (ATryn), 先后于 2006 年和 2009 年经欧盟和美国批准上市, 用于先天性抗凝血酶缺乏患者术前预防静脉血栓形成, 而作为围产期妇女的预防和治疗效果目前处于临床研究阶段。

5.3 α_1 -抗胰蛋白酶

α_1 -抗胰蛋白酶 (α_1 -antitrypsin, α_1 -AT) 是血浆中最重要的蛋白酶抑制剂, 血浆总蛋白酶抑制活性的 70% 来源于 α_1 -AT, 其在正常人血清中的浓度为 1.8~2.8 g/L。 α_1 -AT 的生理功能主要是平衡出凝血系统和调节激肽系统; 作为一种急性期蛋白, 它还能够抑制蛋白水解酶对组织的破坏。 α_1 -AT 缺乏的直接相关疾病主要是肺气肿和肝硬化, 可使用 α_1 -AT 替代治疗, 以恢复病变组织的弹性蛋白酶-抗弹性蛋白酶的平衡。

以低温乙醇法分离组分上清为原料, 是制备 α_1 -AT 浓缩制品的常规方法。Chen 等^[62]利用阴离子、阳离子交换层析、TNBP-胆酸盐处理的方法获得了高纯度的 α_1 -AT, 最终产品的纯度近 95%, 活性 > 90%, 收率 > 70%, 适用于大规模生产。Bayer 公司生产的血浆来源的 α_1 -AT (Prolastin) 在 1987 经美国 FDA 批准上市; Alpha Therapeutic 公司和 Aventis Behring 公司生产的 α_1 -AT 浓缩制剂也于 2003 年获

准上市。

此外, 重组 α_1 -AT 已经在许多细胞和生物体得到成功表达。Nada 等^[63]已在烟草中获得高表达的重组 α_1 -AT; Flotte 等^[64]构建出腺病毒 α_1 -AT 重组质粒, 将其肌肉注射给 α_1 -AT 缺乏患者, 该试验已于 2010 年 7 月进入 II 期临床试验; 2010 年 2 月, Arriva 公司研制的重组 α_1 -AT 喷雾制剂, 已经通过 I 期临床试验, 结果显示该制剂在治疗由 α_1 -AT 缺乏导致的肺纤维化时, 具有很好的安全性和免疫原性, 并且该药物直接作用于肺部组织, 因此所需治疗剂量远低于血浆来源的制品。

5.4 组织纤溶酶原激活剂

组织纤溶酶原激活剂 (Tissue plasminogen activator, tPA) 由血管内皮细胞产生, 血浆中的浓度为 4.0 ± 1.8 mg/L。tPA 可使纤溶酶原转化成纤溶酶, 纤溶酶水解纤维蛋白凝块 (纤维蛋白性血栓) 成为纤维蛋白降解产物, 从而使血栓得到溶解。因此, tPA 可用于急性心肌梗塞、肺梗塞和其他血栓倾向的治疗。

由于 tPA 在血浆中的含量极少, 通过血浆纯化的方法提取是不现实的。1987 年美国 Genetech 公司用 CHO 细胞生产的 tPA 重组制剂 “Active Alteplase” 成为第一个被美国 FDA 批准的动物细胞大规模生产的基因工程产品, 其特异活性达到 $550\ 000 \sim 667\ 000$ IU/mg。但重组 tPA 存在的主要缺点是半衰期很短, 因此研究者基于分子结构原理, 运用定点突变的手段来实现缺失某一结构或功能域, 或者复制特异区域, 进而增加 tPA 的专一性和体内的半衰期^[65]。

5.5 α_2 -巨球蛋白

α_2 -巨球蛋白 (α_2 -macroglobulin, α_2 -MG) 分子量约为 800 kDa, 是血浆中分子量最大的蛋白质, 在血浆中的含量约 $1 \sim 3$ g/L。 α_2 -MG 是一种广谱的蛋白酶抑制剂, 具有清除血液循环中外源性蛋白酶、维持机体内环境的稳定的重要作用。由于 α_2 -巨球蛋白能够增强骨髓产生白细胞的能力, 因此多用于防治

放射性损伤, 对放射治疗引起的溃疡病人有促进伤口愈合的功能; 另外, α_2 -MG 对组织肿瘤生长还具有抑制作用。

α_2 -MG 可由人血清、胎盘血、Cohn 组分 III 或组分 IV 中制备。可用硫酸铵、乙醇沉淀等沉淀法先进行粗提, 随后再经离子交换树脂进行进一步的纯化。由于 α_2 -MG 是大分子蛋白质, 因此在纯化的最后阶段, 一般都采用合适的凝胶介质, 如葡聚糖 G-200 等进行凝胶过滤, α_2 -MG 可在流过缓冲液中收集。

5.6 补体脂酶抑制剂 (C1-抑制剂)

C₁-抑制剂 (C₁-esterase inhibitor, C₁-INH) 是一种在肝脏中合成的单链糖蛋白, 血浆含量为 $180 \sim 350$ mg/L, 对补体、凝血、纤溶、激肽四大系统均有抑制作用, 能够灭活已激活的补体 C_{1r} 和 C_{1s}、内源性凝血因子 XIa、FXIIa 及激肽释放酶, 对纤溶系统的纤溶酶和 t-PA 也有灭活作用。遗传性缺乏 C₁-INH 可引起血管水肿, 因此需要用特异性的 C₁-INH 制剂进行补偿疗法^[66]。

Poulle 等^[67]报道了用两步层析法来纯化 C₁-INH。去除冷沉淀的血浆经阳离子交换介质和 SO₃ Francto gel EMD 层析, 每升血浆中可以得到 $60 \sim 70$ mg 的 C₁-INH。在加拿大获准上市的 C₁-INH 浓缩剂 “Berinet P” 经过近 30 年的临床应用, 证明是安全有效的。由 Pharming 和 Baxter 公司共同研制的重组人 C₁-INH 分别获得美国 FDA 和欧盟 EMEA 批准上市, 用于治疗遗传性血管性水肿。

5.7 其他微量血浆蛋白

血清胆碱酯酶 (Serum cholinesterase, CE) 为一种酰基水解酶, 对含胆碱的酯有极强的催化水解作用。法国国家输血中心和德国的 Behringwerke 公司以 Cohn 组分 IV 为原料, 分离血清胆碱酯酶, 制品相当于将血浆 200 倍浓缩, 治疗有机磷中毒和琥珀酰胆碱麻醉后过长窒息的急救等具有明显的临床功效, 已作为正式的产品供应市场。

补体系统 I 因子是一种肽链内切酶, 能裂解结合于细胞表面或存在于血浆中的 C3b 分子的 α 链,

使其失去活性, 从而实现对补体激活系统经典途径和替代途径的调节作用。先天性 I 因子缺乏将会导致机体不能发挥其正常的抗感染等防御作用, 因此常发生严重的复发性感染, 需输注血浆纯化的 I 因子制剂, 以纠正患者的补体功能。

转铁蛋白 (Transferrin, Tr) 是一种分子量为 765 kDa 的糖蛋白, 血浆浓度为 0.2~0.5 mg/L, 能够附着于细胞膜表面, 有利于铁的生理转换。此外 Tr 还能灭活铁的毒性作用, 参与铁吸收的调控。Tr 可由 Cohn 氏组分 IV 作为起始原料进行纯化, 在治疗儿童急性白血病及铁中毒有一定疗效, 但迄今未作进一步推广, 仅作为试剂用于无血清细胞的培养。

铜蓝蛋白 (Ceruloplasmin, Cp) 由于结合 Cu^{2+} 并成蓝色而被命名, 是一种氧化酶, 在有氧存在的条件下, 可促进多种化合物的氧化活性。Cp 在体内参与铜和铁的代谢, 遗传缺乏可导致肝豆状核变性 (威尔逊氏病)。以 Cohn 氏组分 IV 或分离凝血酶原复合物的亚组分为原料, 可获得浓缩的 Cp。由于其临床作用有待于进一步研究, 因此 Cp 至今未见临床应用。

纤维结合蛋白 (Fibronectin, Fn) 是存在于细胞表面和血浆中的高分子糖蛋白。该蛋白具有广泛的生物学活性, 除能促进单核-巨噬细胞系统 (RES) 的吞噬作用外, 还参与细胞的各种活动, 并在组织修复中起重要作用。采用肝素亲和层析法, 可以从血浆或冷沉淀中提取、纯化 Fn。静脉输注 Fn 可以增强机体的 RES 功能; 局部外用促进细胞的黏附、生长和伤口愈合, 但其作用尚需进一步临床研究。

高密度脂蛋白 (High density lipoprotein, HDL) 是由蛋白质与脂质结合而成的复合蛋白质, 在肝脏和小肠中合成, 是血浆脂蛋白家族中重要的成员。HDL 粒子中的蛋白质和脂类各占约 50%, 含有少量的糖类; 其中的蛋白质称为载脂蛋白, 在脂类传递中起着重要作用。HDL 功能的研究推动了应用研究, CSL 公司开发的重新组合的 HDL 用于急性冠脉综合征, 已经完成临床试验。

6 发展趋势与未来展望

通过以上对血浆蛋白与重组血浆蛋白制品现状的简要介绍可以看出, 血液制品或血浆蛋白产品既是一个传统产业, 也是一个新兴产业。现代生物技术, 特别是基因重组技术和制备工艺的发展, 为血液制品的研发提供了更为广阔的空间。

6.1 血浆来源的制品仍将具有其不可替代的特殊地位

血液是人类赖以生存的命脉, 血液与血液制品具有医疗产品和药品的双重特性, 具有其他药物无法比拟和替代的优点。全球性的医用血源紧张已成为各国医疗机构所面对的难题, 新型血液成分制品、血浆蛋白制品的制备与鉴定技术已经成为药物研制和开发的重要组成部分, 甚至是衡量一个国家或地区发达程度的指标之一。

随之血浆蛋白制品制备过程中病毒灭活工艺的增加、GMP 的强制执行和产品注册要求的提高, 使得人们以往担心的传播病毒性疾病的可能性已经降至最低。多年的临床实践表明, 几乎未能发现人血白蛋白传播病毒性疾病的病例。同时, 静脉注射免疫球蛋白制品已经成为欧洲某些国家的家庭用药。可以认为, 血浆蛋白制品已经成为最为安全的药品之一^[68]。

鉴于重组技术及其产品的局限性和血源性制品的特殊性, 在可以预见的将来, 重组产品完全取代血源性制品几乎没有可能。

6.2 血浆蛋白新品种的研发仍是热点

传统工艺与现代技术的结合、改进与完善, 使得血浆蛋白新制品不断出现, 使以往因为技术和成本限制的微量蛋白制品的研发成为可能, 一份血浆制备多达十几种不同产品已在领先的血液制品企业实施^[69]。

当今新发传染病时有发生以及生物战剂与生物恐怖的潜在威胁, 特异性免疫球蛋白在未来将会发挥更大的作用, 用作烈性传染病应急预防和治疗的特异性免疫球蛋白, 诸如抗天花病毒免疫球蛋白、

抗 SARS 免疫球蛋白、抗炭疽血清等应该成为各国的常规贮备制品^[70]。

特异性免疫球蛋白不断问世,加之免疫球蛋白的新使用途径和适应症的不断扩展,使得人源免疫球蛋白产品的研发始终保持着旺盛不衰的势头。

6.3 重组血浆蛋白制品正在迅速发展

自从 1992 年美国 FDA 批准第一代 rhFⅧ产品 Recombinate,重组血浆蛋白制品已经走过了将近 30 个年头。随后,多个厂家和不同制品在世界许多国家和地区获得了注册。鉴于 rhFⅧ制品的巨大需求,目前仍有诸多企业正在进行研发或新一代产品改进^[10]。

HSA 是迄今为止产量最大、用量最多的血浆蛋白药物,在临床和生物产品中的广泛应用使其在国内外均具有很大市场。随着输注用重组白蛋白的问世,弥补了血浆来源白蛋白的诸如原料血浆价格上涨、病毒灭活过程增加等缺陷。由于 rHSA 批次之间的产品均一度好、纯度高、生产规模不受限制、无病毒传播风险,从而赋予其巨大的市场前景。

随着重组凝血因子Ⅶ、凝血因子Ⅷ、凝血因子Ⅸ、人蛋白 C 以及转基因动物来源的抗凝血酶Ⅲ和 α 1-抗胰蛋白酶等的上市,既给传统血液制品企业提出了挑战,也为血液制品企业带来了机遇。目前,重组血浆产品的研发重点在于解决生产力不足、使重组药物结构更加合理化以及给药途径的多样化。尽管面临种种挑战,但随着市场的发展和临床需求的不断增加,相信其必将有广阔的发展空间^[71]。

6.4 我国血液制品的研发与国外存在着较大的差距

血浆综合利用率低、上市品种少是我国血液制品行业的现实,与发达国家,特别是国际血浆蛋白治疗协会 (PPTA) 的成员企业相比存在着较大的差距。

国内多大企业仍然沿用传统的低温乙醇工艺,而欧美企业普遍对传统工艺进行了改良,同时引入了层析工艺,使得其相关血液制品的产品质量高、

产品品种多。国外已经上市或正在进行临床试验的血浆蛋白产品有近 30 种,国内超过 10 种的企业只有 1 家,一般企业均不足 10 种,甚至不足 4 种,这也使得国内血液制品企业的百吨效益明显较低。

可喜的情况是,我国部分企业已经认识到了差距的存在,正在加速新产品的研发和制备工艺的改进。

6.5 我国血液制品企业面临着机遇与挑战

纵观近年来国际血浆蛋白制品产业的发展,市场竞争日益激烈,全球一体化似乎是一大发展趋势,血浆白蛋白的进口已经对我国血液制品行业产生了很大的冲击。

我国现有 30 余家血液制品企业的规模较小,年投浆量不及澳大利亚的 CSL 公司,存在着严重血浆短缺问题。2006 年,全国总投浆量不到 5 000 吨,近两年的投浆量更少,而 CSL 公司的 2005 年投浆量接近 6 000 吨。目前,年血浆加工能力在 2 000 吨以上的制造商主要是血浆蛋白治疗协会 (PPTA) 的会员,其中 CSL、Bayer Biologicals、Baxter、Grifols 等陆续成为跨国集团,全球血浆蛋白制造企业的数量不断减少。我国血液制品企业的整合也已或即将成为不争的事实。

我国政府高度重视血液制品行业的监管,出台了一系列整顿整治政策法规,包括适当限制进口(人血白蛋白除外)、不再批准新血液制品企业(2001 年起)、单采血浆站的“GMP”认证、窗口期制度等等,这些措施有利于我国血液制品市场的净化和长期健康发展。目前,原料血浆的短缺问题正在逐步改善,血浆资源向优势企业集中也将是一个必然的发展趋势。

REFERENCES

- [1] Committee of National Pharmacopoeia. Pharmacopoeia of the People's Republic of China. Beijing: Press of Medicinal Science and Technology, 2010.
国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医

- 药科技出版社, 2010.
- [2] Zhang JG. The current situation and the future of recombinant plasma protein products//National Academic Communication for Blood Products. Chengdu, 2009: 45-49.
章金刚. 重组血浆蛋白制品的现状与展望//全国血液制品学术交流会. 成都, 2009: 45-49.
- [3] Liu TY, Liu WF. Overview of source plasma collection and management in worldwide. *Chin J Blood Transfusion*, 2009, 22(2): 165-167.
刘通一, 刘文芳. 世界原料血浆采集及其管理概况. *中国输血杂志*, 2009, 22(2): 165-167.
- [4] Kind A, Schnieke A. Animal pharming, two decades on. *Transgenic Res*, 2008, 17(6): 1025-1033.
- [5] Goldstein DA, Thomas JA. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *QJM*, 2004, 97(11): 705-716.
- [6] Twyman RM, Schillberg S, Fischer R. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2005, 10(1): 185-218.
- [7] Li Y. *Genetically Engineered Pharmaceuticals*. 2nd ed. Beijing: Press of Chemical industry, 2007.
李元. *基因工程药物*. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [8] More JE. Production of a high purity albumin. Boston Biological Safety and Production IBC Conference, 1999: 19-23.
- [9] Lawn RM, Adelman J, Bock SC, et al. The sequence of human serum albumin cDNA and its expression in *E. coli*. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9(22): 6103-6114.
- [10] Kibayashi K. Summary of recombinant human serum albumin development. *Biologicals*, 2006, 34(1): 55-59.
- [11] Ohnishi K, Kawaguchi A, Nakajim S, et al. A comparative pharmacokinetic study of recombinant human serum albumin with plasma-derived human serum albumin in patients with liver cirrhosis. *Clin Pharmacol*, 2008, 48(2): 203-208.
- [12] Bosse D, Praus M, Kiessling P, et al. Phase I comparability of recombinant human albumin and human serum albumin. *Clin Pharmacol*, 2005, 45(1): 57-67.
- [13] Zhao YY, Lv MM, Yang M, et al. Constructure and expression of the endostatin-HSA fusion protein in *Pichia pastoris*. *Chin J Blood Transfusion*, 2010, 23(4): 255-258.
赵媛媛, 吕茂民, 杨梅, 等. 人内皮抑素-白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的表达与鉴定. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 255-258.
- [14] Wang MR, Komatsu T, Nakagawa A, et al. Human serum albumin bearing covalently attached iron (II) porphyrins as O₂-coordination sites. *Bioconjug Chem*, 2005, 16(1): 23-26.
- [15] Cohn EJ, Strong LE, Hughes WI, et al. Preparation and properties of serum and plasma protein. *J Am Chem Soc*, 1946, 68: 459-475.
- [16] Kistler P, Nitschmann H. Large scale production of human plasma fractions. *Vox Sang*, 1962, 7: 414-424.
- [17] Morell A. Various immunoglobulin preparations for intravenous use. *Vox Sang*, 1986, 51(S2): 44-49.
- [18] Sethi S, Murphy TF. RSV infection-not for kids only. *N Engl J Med*, 2005, 352: 1810-1812.
- [19] Snyderman DR. Historical overview of the use of cytomegalovirus hyperimmune globulin in organ transplantation. *Transpl Infect Dis*, 2001, 3(S2): 6213.
- [20] Meissner HC, Long SS. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus Infections. *Pediatrics*, 2003, 112: 1447-1452.
- [21] Buxbaum S, Doerr HW, Allwinn R. Epidemiological analysis of immunity against vaccine-preventable diseases: rubella, measles, mumps and chickenpox. *Dtsch Med Wochenschr*, 2001, 126(46): 1289-1293.
- [22] Kajii M, Suzuki C, Kashiwara J, et al. Prevention of excessive collagen accumulation by human intravenous immunoglobulin treatment in a murine model of bleomycin-induced scleroderma. *Clin Exp Immunol*, 2010, 163(2): 235-241.
- [23] Fillit H, Hess G, Hill J, et al. IV immunoglobulin is associated with a reduced risk of Alzheimer disease and related disorders. *Neurology*, 2009, 73(3): 180-185.
- [24] Parkkinen J, Rahola A, von Bonsdorff L, et al. A modified caprylic acid method for manufacturing immunoglobulin G from human plasma with high yield and efficient virus clearance. *Vox Sang*, 2005, 90(2): 97-104.
- [25] Lebing W, Remington KM, Schreiner C, et al. Properties of a new intravenous immunoglobulin (IGIV-C, 10%) produced by virus inactivation with caprylate and column chromatography. *Vox Sang*, 2003, 84(3): 193-201.
- [26] Kim IS, Choi YW, Kang Y, et al. Dry-heat treatment process for enhancing viral safety of an antihemophilic factor VIII concentrate prepared from human plasma.

- Microbiol Biotechnol, 2008, 18(5): 997-1003.
- [27] Zhao X, Yin HQ, Zhang JG. The development of virus inactivation methods for fibrinogen products. *Chin J Blood Transfusion*, 2008, 21(2): 141-144.
赵雄, 尹惠琼, 章金刚. 纤维蛋白原制品病毒灭活方法研究进展. *中国输血杂志*, 2008, 21(2): 141-144.
- [28] Kheirabadi BS, Acheson EM, Deguzman R, et al. The potential utility of fibrin sealant dressing in repair of vascular injury in swine. *Trauma*, 2007, 62(1): 94-103
- [29] Schenk WG III, Burks SG, Gagne PJ, et al. Fibrin sealant improves hemostasis in peripheral vascular surgery: a randomized prospective trial. *Ann Surg*, 2003, 237(6): 871-876.
- [30] Kubota M, Okuyama N, Hirayama Y. A new method to close an intestinal wall defect using fibrin glue and polyglycolic acid felt sealant. *Peditr Surg*, 2007, 42(7): 1225-1230.
- [31] Zhao X, Cao XH, Ma YY, et al. Hemostatic efficacy of fibrin dressing. *Chin J Blood Transfusion*, 2010, 23(4): 250-252.
赵雄, 曹晓涵, 马玉媛, 等. 纤维蛋白止血敷料的止血效果. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 250-252.
- [32] Zhao X, Cao XH, Ma YY, et al. The biocompatibility study of fibrin dressing. *Chin J Blood Transfusion*, 2010, 23(4): 247-249.
赵雄, 曹晓涵, 马玉媛, 等. 纤维蛋白止血敷料的生物相容性研究. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 247-249.
- [33] De Cristofaro R, Akhavan S, Altomare C, et al. A natural prothrombin mutant reveals an unexpected influence of A-chain structure on the activity of human α -thrombin. *J Biol Chem*, 2004, 279(13): 13035-13043.
- [34] Bishop PD, Lewis KB, Schultz J, et al. Comparison of recombinant human thrombin and plasma-derived human alpha-thrombin. *Semin Thromb Hemost*, 2006, 32(S1): 86-97.
- [35] Chapman WC, Singla N, Genyk Y, et al. A phase 3, randomized, double-blind comparative study of the efficacy and safety of topical recombinant human thrombin and bovine thrombin in surgical hemostasis. *Am Coll Surg*, 2007, 205(2): 256-265.
- [36] Anderson CD, Bowman LJ, Chapman WC. Topical use of recombinant human thrombin for operative hemostasis. *Expert Opin Biol Ther*, 2009, 9(1): 133-137.
- [37] Broze GJ Jr, Majerus PW. Purification and properties of human coagulation factor VII. *J Biol Chem*, 1980, 255(4): 1242-1247.
- [38] Tomokiyo K, Yano H, Imamura M, et al. Large-scale production and properties of human plasma-derived activated factor VII concentrate. *Vox Sang*, 2003, 84(1): 54-64.
- [39] Lv MM, Wang N, Wang D, et al. Construction of coagulant factor VII gene expression vector in BHK cell line. *China Biotech*, 2005, 25(1): 44-47.
吕茂民, 王娜, 王栋, 等. 凝血因子VII基因表达载体的构建及其在 BHK 细胞中的表达. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(1): 44-47.
- [40] Lv MM, Zhou HL, Yao ZX, et al. Cloning and sequencing of human coagulation factor VII cDNA gene from embryonic liver. *Biotechnol Bull*, 2007, 4: 132-134.
吕茂民, 周华蕾, 姚站馨, 等. 人凝血因子VII cDNA 基因的克隆与鉴定. *生物技术通报*, 2007, 4: 132-134.
- [41] Lv MM, Wang Z, Feng JJ, et al. Purification and identification of recombinant coagulation factor VII using monoclonal antibody immunoaffinity chromatography. *Chin J Blood Transfusion*, 2010, 23(4): 252-255.
吕茂民, 王卓, 冯晶晶, 等. 重组人凝血因子VII的纯化与鉴定. *中国输血杂志*, 2010, 23(4): 252-255.
- [42] Wang Z, Lv MM, Feng JJ, et al. Expression of recombinant human coagulation factor VII in Flp-In-CHO cells and identification of expressed product. *Chin J Biol*, 2010, 23(3): 248-251.
王卓, 吕茂民, 冯晶晶, 等. 重组人凝血因子VII在 Flp-In-CHO 细胞中的表达及鉴定. *中国生物制品学杂志*, 2010, 23(3): 248-251.
- [43] Abshire T, Kenet G. Safety update on the use of recombinant factor VIIa and the treatment of congenital and acquired deficiency of factor VIII or IX with inhibitors. *Haemophilia*, 2008, 14(5): 898-902
- [44] Hedner U. History of rFVIIa therapy. *Thromb Res*, 2010, 125(S1): s4-s6.
- [45] D'Amici GM, Timperio AM, Gevi F, et al. Recombinant clotting factor VIII concentrates: Heterogeneity and high-purity evaluation. *Electrophoresis*, 2010, 31(16): 2730-2739.
- [46] Hoots WK, Leissing C, Stabler S, et al. Continuous intravenous infusion of a plasma-derived factor IX concentrate (Mononine[®]) in haemophilia B. *Haemophilia*, 2003, 9(2): 164-172.
- [47] Oza VM, Jabbar AA, Hakobyan N, et al. Transfusion-transmitted virus is not present in factor IX concentrates

- commonly used to treat haemophilia B. *Haemophilia*, 2004, 10(6): 732–734.
- [48] Lambert T, Recht M, Valentino LA, et al. Reformulated BeneFIX[®]: efficacy and safety in previously treated patients with moderately severe to severe haemophilia B. *Haemophilia*, 2007, 13(3): 233–243.
- [49] Monahan PE, Liesner R, Sullivan ST, et al. Safety and efficacy of investigator-prescribed BeneFIX[®] prophylaxis in children less than 6 years of age with severe haemophilia B. *Haemophilia*, 2010, 16(3): 460–468.
- [50] Bruning PF, Loeliger EA. Prothrombal: a new concentration of human prothrombin complex for clinical use. *Br J Haematol*, 1971, 21(4): 377–398.
- [51] Wicherhauser M, Sagouris JT. Development of large-scale fractionation methods II. Isolation of a factor IX concentrate (prothrombin complex) for clinical use. *Vox Sang*, 1973, 25(2): 177–183.
- [52] Heystek J, Bummelhuis HG, Krunen HW. Contributions to the optimal use of human blood II. The large-scale preparation of prothrombin complex. A comparison between two methods using the anion exchangers DEAE-cellulose DE 52 and DEAE-Sephadex A-50. *Vox Sang*, 1973, 25(3): 113–123.
- [53] Burnouf-Radosevich M, Burnouf T. A therapeutic, highly purified factor XI concentrate from human plasma. *Transfusion*, 1992, 32(9): 861–867.
- [54] Winkelman L, Sims GE, Haddon ME, et al. A pasteurized concentrate of human plasma factor XIII for therapeutic use. *Thromb Haemost*, 1986, 55(3): 402–405.
- [55] De Backer-Royer C, Traoré F, Meunier JC. Purification and properties of factor XIII from human placenta. *Int J Biochem*, 1992, 24(1): 91–97.
- [56] Board PG, Pierce K, Coggan M. Expression of functional coagulation factor XIII in *Escherichia coli*. *Thromb Haemost*, 1990, 63(2): 235–240.
- [57] Bishop PD, Teller DC, Smith RA, et al. Expression, purification, and characterization of human factor XIII in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 1990, 29(7): 1861–1869.
- [58] Bruley DF. Anticoagulant blood factor deficiencies (protein C). *Adv Exp Med Biol*, 2007, 599: 1–6.
- [59] Stenflo J. A new vitamin K-dependent protein. Purification from bovine plasma and preliminary characterization. *J Biol Chem*, 1976, 251(2): 335–363.
- [60] Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*, 2001, 344: 699–709.
- [61] Jia LW, Lv MM, Xu SRGL, et al. Expression of recombinant human protein C in HEK293 cells and identification of express product. *Chin J Biol*, 2005, 18(4): 294–296.
贾莉玮, 吕茂民, 徐斯日古楞, 等. 重组人蛋白 C 在 HEK293 细胞中的表达与鉴定. *中国生物制品学杂志*, 2005, 18(4): 294–296.
- [62] Chen SX, Hammond DJ, Lang JM, et al. Purification of α_1 proteinase inhibitor from human plasma fraction IV-1 by ion exchange chromatography. *Vox Sang*, 1998, 74(4): 232–241.
- [63] Nada IM, Bally J, Vitel M, et al. High-level expression of active human alpha1-antitrypsin in transgenic tobacco chloroplasts. *Transgenic Res*, 2009, 18(2): 173–183.
- [64] Flotte TR, Brantly ML, Spencer LT, et al. Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(1): 93–128.
- [65] Klement P, Rak J. Emerging anticoagulants: mechanism of action and future potential. *Vnitr Lek*, 2006, 52(S1): 119–122.
- [66] Alsenz J, Lambris JD, Bonk K, et al. Acquired C₁-inhibitor (C₁-IHN) deficiency type II-replacement therapy with C₁-INH and analysis of patients' C₁-INH and anti-C₁-INH autoantibodies. *Clin Invest*, 1989, 83(6): 1794–1799.
- [67] Poulle M, Burnouf-Radosevich M, Burnouf T. Large-scale preparation of highly purified human C₁-inhibitor for therapeutic use. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1994, 5(4): 543–549.
- [68] Buchacher A, Iberer G. Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma-aspects of yield and virus safety. *Biotechnol J*, 2006, 1(2): 148–163.
- [69] Burnouf T. Morden plasma fractionation. *Transfu Med Rev*, 2007, 21(2): 101–117.
- [70] Vo A, Jordan SC. IVIG therapy: an emerging role in organ transplantation. *Pharmacist*, 2004, 29(3): 20–25.
- [71] Burnouf T. Recombinant plasma proteins. *Vox Sang*, 2011, 100(1): 68–83.