

· 技术方法 ·

免疫亲和层析法制备马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂

包正琦,段丽娟,戴于栋,孙伟,杨凯,高建军

兰州生物制品研究所有限责任公司,甘肃 兰州 730046

摘要: 目的 采用免疫亲和层析法纯化制备马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂。方法 破伤风类毒素(tetanus toxoid ,TT)免疫马血浆经胃酶消化、加温变性、硫酸铵盐析、明矾吸附、超滤,获得破伤风抗毒素,再经 CNBr activated Sepharose 4FF 介质偶联 TT 制成的亲和层析柱纯化,获得马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂。检测其蛋白质含量、分子大小分布、纯度、效价、比活性,并与破伤风抗毒素进行比较。将马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 置(25 ± 2) °C 分别保存 1、2、3、6 个月,测定效价。结果 与破伤风抗毒素比较,马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的蛋白质含量平均值由 45.6 mg/mL 下降至 20.03 mg/mL,降低了 56%, F(ab')₂ 含量变化较小,聚合物含量由 2.92% 下降至 1.22%,降低了 59%,纯度略有降低,效价平均值由 2 533 IU/mL 升高至 3 733 IU/mL,提高了 47%,比活性平均值由 55 563 IU/g 升高至 186 277 IU/g,提高了 335%。加速稳定性试验 6 个月,马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 效价及 F(ab')₂ 含量均在合格范围之内。结论 采用免疫亲和层析方法制备了高效价及高比活性的马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂,且稳定性良好。

关键词: 免疫亲和层析;马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂;破伤风抗毒素;效价;比活性

中图分类号: R392-33 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2022)05-0598-05

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.003608

Preparation of equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ by immunoaffinity chromatography

BAO Zheng-qi, DUAN Li-juan, DAI Yu-dong, SUN Wei, YANG Kai, GAO Jian-jun

Lanzhou Institute of Biological Products Co., Ltd., Lanzhou 730046, Gansu Province, China

Corresponding author: GAO Jian-jun, E-mail: gao5369@163.com

Abstract: **Objective** To prepare equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ by immunoaffinity chromatography. **Methods** The equine plasma immunized with tetanus toxoid (TT) was digested with pepsin, denaturalized by heating, salted out with ammonium sulphate, adsorbed with alum and ultrafiltrated. The obtained tetanus antitoxin (TAT) was purified by affinity chromatography with cyanogen bromide activated Sepharose 4FF medium coupled with TT. The prepared equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ was determined for protein content, molecular size distribution, purity, titer and specific activity, and the results were compared with those of TAT. The equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ was stored at (25 ± 2) °C for 1, 2, 3 and 6 months, and determined for titer. **Results** Compared with those of TAT, the mean protein content of equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ decreased by 56% from 45.6 to 20.03 mg/mL, while the F(ab')₂ showed no significant change, the polymer content decreased by 59% from 2.92% to 1.22%, the purity showed a slight decrease, the mean titer increased by 47% from 2 533 to 3 733 IU/mL, and the mean specific activity increased by 335% from 55 563 to 186 277 IU/g. The accelerated stability test result after storage for 6 months showed that both the titer and F(ab')₂ content of equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ were within the range of qualification. **Conclusion** Equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂ with high titer, high specific activity and high stability was successfully prepared by immunoaffinity chromatography.

Key words: Immunoaffinity chromatography; Equine tetanus immunoglobulin F(ab')₂; Tetanus antitoxin; Titer; Specific activity

马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 是由破伤风类毒素(tetanus toxoid ,TT)免疫马所得血浆,经胃酶消化后采用硫酸铵盐析、超滤和柱色谱等工艺纯化制成的液体免疫球蛋白 F(ab')₂ 制剂,用于预防和治疗破

伤风梭菌引起的感染^[1]。与破伤风抗毒素制备工艺比较,马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 增加了一步柱色谱纯化工艺。柱层析工艺作为现代常用的蛋白质纯化技术手段,其纯化过程快速简单、易于放大和控制,已广泛用于生物制品行业。亲和层析(affinity chro-

通信作者:高建军 E-mail: gao5369@163.com

matography, AC) 是基于目的产物与其固相介质上的配体能够特异性结合和可逆结合的性质而分离获得目的产物的层析技术^[2]。免疫亲和层析(immunoaffinity chromatography, IAC) 是亲和层析的一种, 是利用生物体内存在的抗原、抗体之间高度特异性亲和力进行分离的方法^[3]。亲和层析法由于具有高选择性和快速性而成为使用最广泛的抗体纯化方法之一, 随着层析介质和固定化方法的发展, 免疫亲和层析法在生命科学中已成为一种较有价值的技术^[46]。

本实验将 TT 免疫马所得的血浆经胃酶消化、加温变性、硫酸铵盐析、明矾吸附、超滤, 再经免疫亲和层析法纯化制备马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂, 并对其关键质量指标进行测定, 以评价免疫亲和层析制备马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的可行性及所制备产品的质量。

1 材料与方法

1.1 血浆 TT 免疫马血浆由张掖市长丰生物科技有限公司提供。

1.2 主要试剂及仪器 SDS、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺均购自美国 Sigma 公司; N,N,N',N'-四甲基乙二胺、过硫酸铵、甲醇、考马斯亮蓝、NaHCO₃、NaCl、HAc、HCl、H₂SO₄、CuSO₄、K₂SO₄、乌酸钠、NaOH 及 Tris-HCl 均购自国药集团化学试剂有限公司; 宽分子量蛋白质 marker 购自宝生物工程(上海)有限公司; TT(批号: HP201208001) 由兰州生物制品研究所有限责任公司第一研究室提供; CNBr activated Sepharose 4FF、Superdex 200 Increase 10/300 GL 凝胶介质及 ATKA purifier 蛋白快速纯化系统均购自美国 GE 公司。

1.3 免疫亲和介质制备 称取 140 g CNBr activated Sepharose 4FF 干粉介质, 用 560 mL 1 mmol/L HCl 溶液充分溶解, 倒入层析柱中, 1 mmol/L HCl 溶液冲洗 10~20 个柱体积。用含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.3) 置换 TT 的缓冲体系后, 与上述介质混合, 室温振荡 2 h; 装柱, 用含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L NaHCO₃ (pH 8.3) 冲洗 5~10 个柱体积, 采用 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 低流速冲洗层析柱 5~10 个柱体积, 封闭未结合位点。再依次用含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0~9.0) 洗涤 5~10 个柱体积, 含 0.5 mol/L NaCl 的 0.1 mol/L HAc (pH 3.0~4.0) 洗涤 3~6 个柱体积, 即完成介质的偶联与装柱。

1.4 纯化方法 马血浆经胃酶消化、加温变性、硫酸铵盐析、明矾吸附后, 用平衡液(50 mmol/L PB +

0.15 mol/L NaCl, pH 7.0) 超滤浓缩至原血浆体积的 20%, 获得 3 批破伤风抗毒素, 批号分别为 M-20160302、M-20160303、M-20160304, 再进行柱层析纯化。装好的层析柱用平衡液平衡至少 3~5 个柱体积, 至 UV 达到基线, 开始上样, 上样体积为 3 个柱体积, 经平衡液平衡至 UV 达到基线, 再用洗脱液(0.25 mol/L HAc) 进行洗脱, UV 大于 100 mAU 时开始收集洗脱峰, 收集至 UV 降至 100 mAU 以下结束。用 1 mol/L NaOH 溶液调节洗脱液 pH 至 6.5, 超滤浓缩, 用 0.22 μm 滤芯除菌, 获得相应 3 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 原液, 批号分别为 S-20161013、S-20161028、S-20161103。平衡和上样过程的线性流速均为 150 cm/h, 洗脱过程的线性流速为 250 cm/h。

1.5 质量检测

对 3 批破伤风抗毒素及相应 3 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 进行质量检测。

1.5.1 蛋白质含量 按照《中国药典》三部(2020 版)^[1]附录通则 0731 蛋白质含量测定法第一法检测制品的蛋白质含量, 破伤风抗毒素及马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的蛋白质含量应分别不高于 100 和 50 mg/mL。

1.5.2 分子大小分布 采用分子排阻色谱法测定样品的聚合物含量及 F(ab')₂ 含量^[7], 色谱柱为 Superdex 200 Increase 10/300 GL 凝胶过滤预装柱, 流动相为 50 mmol/L PB + 0.15 mol/L NaCl (pH 7.0)。样品蛋白浓度为 2~2.5 mg/mL, 进样量为 60 μL, 检测波长为 280 nm, 线性流速为 30 cm/h, 检测时长为 70 min, 按照面积归一化法计算色谱图中 F(ab')₂、完整 IgG 和聚合物的相对含量。破伤风抗毒素及马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的聚合物总和均不应高于 5%。

1.5.3 纯度 参照《中国药典》三部(2020 版)^[1]附录通则 0541 电泳法中的第五法, 采用 7.5% SDS-PAGE 分析样品的纯度, 破伤风抗毒素及马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的 IgG 含量应不高于 5%, F(ab')₂ 含量应不低于 70%。

1.5.4 效价 按照《中国药典》三部(2020 版)^[1]附录通则 3508 破伤风抗毒素效价测定法测定效价, 马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 和破伤风抗毒素的效价均应不低于 2 000 IU/mL。

1.5.5 比活性 每 1 g 蛋白质所含的抗体总效价即为比活性。按照《中国药典》三部(2020 版)^[1]提供的公式计算马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 和破伤风抗毒素的比活性[比活性(IU/g) = 效价(IU/mL) / 蛋白

质含量(mg/mL) $\times 1\,000$]。破伤风抗毒素及马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 的比活性应分别不低于 45 000 和 75 000 IU/g 。

1.6 稳定性评价 将 1.4 项制备的马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 按 1 mL/瓶 分装,置 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 保存,于保存 1、2、3、6 个月时取样,分别按 1.5.3 项方法测定效价。

2 结果

2.1 质量检测结果

2.1.1 蛋白质含量 S-20161013、S-20161028、S-20161103 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 的蛋白质含量分别为 20.4、19.5、20.2 mg/mL ,均值为 20.03 mg/mL ; M-20160302、M-20160303、M-20160304 批破伤风抗毒素的蛋白质含量分别为 46.1、45.3、45.4 mg/mL ,均值为 45.6 mg/mL 。前者的蛋白质含量均远小于后者,降低了 56%。

2.1.2 分子大小分布 3 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 和 3 批破伤风抗毒素的 F(ab')_2 含量均值分别为 91.84% 和 91.02%,含量变化较小;聚合物含量均值分别为 1.22% 和 2.92%,前者比后者下降了 59%。见表 1。3 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 的分子大小分布图谱重合度较高,见图 1。

表 1 分子大小分布的检测结果(%)

Tab. 1 Detection result of molecular size distribution (%)

样品	批号	聚合物含量	F(ab')_2 含量
马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2	S-20161013	1.34	90.64
	S-20161028	1.19	92.32
	S-20161103	1.13	92.63
破伤风抗毒素	M-20160302	2.65	90.54
	M-20160303	2.97	90.78
	M-20160304	3.21	91.74

2.1.3 纯度 经 7.5% SDS-PAGE 分析,3 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 和 3 批破伤风抗毒素于相对分子质量约 100 000 处可见 F(ab')_2 条带,但前者比后者的小分子杂质含量少。S-20161013、S-20161028、S-20161103 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 的 F(ab')_2 含量分别为 90.7%、91.5%、94.3%,M-20160302、M-20160303、M-20160304 批破伤风抗毒素的 F(ab')_2 含量分别为 89.2%、89.5%、90.8%,两者的 IgG 含量均为 0。见图 2。

2.1.4 效价 S-20161013、S-20161028、S-20161103 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 的效价分别为 3 800、

3 500、3 900 IU/mL ,均值为 3 733 IU/mL ; M-20160302、M-20160303、M-20160304 批破伤风抗毒素的效价分别为 2 500、2 600、2 500 IU/mL ,均值为 2 533 IU/mL 。前者效价比后者提高了 47%。

2.1.5 比活性 S-20161013、S-20161028、S-20161103 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 的比活性分别为 186 275、179 487、193 069 IU/g ,均值为 186 277 IU/g ; M-20160302、M-20160303、M-20160304 批破伤风抗毒素的比活性分别为 54 229、57 395、55 066 IU/g ,均值为 55 563 IU/g 。前者的比活性比后者提高了 335%。

2.2 稳定性 马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 放置 6 个月后,效价均在合格范围之内,见表 2。

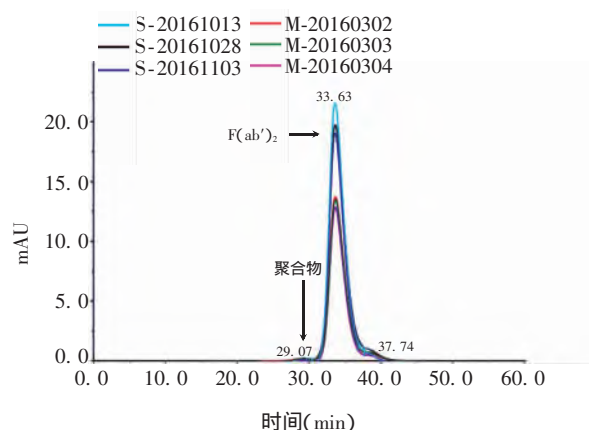
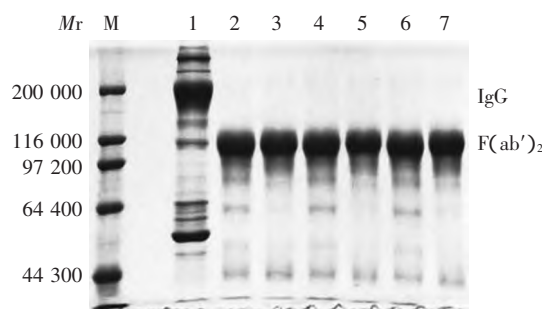


图 1 马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 和破伤风抗毒素的分子大小分布图谱

Fig. 1 Molecular size distribution map of equine tetanus immunoglobulin F(ab')_2 and TAT



M 宽分子量蛋白质 marker; 1 马血浆; 2~4 分别为 M-20160302、M-20160303 和 M-20160304 批破伤风抗毒素; 5~7 分别为 S-20161013、S-20161028 和 S-20161103 批马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 。

图 2 马破伤风免疫球蛋白 F(ab')_2 及破伤风抗毒素的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE profile of equine tetanus immunoglobulin F(ab')_2 and TAT

表 2 马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的稳定性检测结果

Tab. 2 Stability test result of equine tetanu immunoglobulin F(ab')₂

批号	放置时间(月)									
	0		1		2		3		6	
	F(ab') ₂ 含量(%)	效价 (IU/mL)	F(ab') ₂ 含量(%)	效价 (IU/mL)	F(ab') ₂ 含量(%)	效价 (IU/mL)	F(ab') ₂ 含量(%)	效价 (IU/mL)	F(ab') ₂ 含量(%)	效价 (IU/mL)
S-20161013	90.6	3 800	91.4	3 700	90.2	3 800	91.5	3 700	90.7	3 600
S-20161028	92.3	3 500	92.7	3 600	91.8	3 500	91.7	3 400	92.6	3 400
S-20161103	92.6	3 900	91.5	3 900	91.8	3 800	92.1	3 900	92.4	3 700

3 讨论

破伤风抗毒素的临床应用非常广泛,作为预防和治疗破伤风感染的特殊药品,进入体内与血液中的游离毒素结合后被机体免疫系统清除而发挥作用^[8]。马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 作为破伤风抗毒素的升级产品,与破伤风抗毒素相比,蛋白质含量大幅降低,同时效价和比活性得到了较大提高,聚合物也得到了大幅降低。两者同属于动物源性制品,对于人体而言是外源性蛋白,输入人体不良反应发生率较高^[9-10],输入外源性蛋白的总量越多则发生不良反应的发生率也越高^[11]。另外,据有关文献报道,聚合物含量可能是影响不良反应发生的因素之一^[12],马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 与破伤风抗毒素比较,蛋白质含量和聚合物含量大幅降低,进一步降低了发生不良反应的发生率^[13]。本实验采用免疫亲和层析法制备的马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂,其蛋白质含量和聚合物含量更低,因此发生不良反应的可能性较破伤风抗毒素更小。

李景玉等^[14]在专利申请中采用 DEAE 柱层析纯化的马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 比活性为 80 000 ~ 100 000 IU/g,杨俊杰等^[7]采用辛酸沉淀结合 DEAE 柱层析技术纯化马 IgG 比活性为 60 000 ~ 80 000 IU/g;ZHANG 等^[15]采用两步盐析加一步蛋白 G 亲和层析制备的马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 片段,比活性为 90 000 IU/g。综上所述,增加一步层析步骤均可提高马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的比活性,但上述层析方法均是非特异性方法,因此比活性提高幅度较低。本研究采用的免疫亲和层析技术属于特异性方法,纯化过程中收集的均是具有中和活性的目的蛋白,因此获得马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 的比活性平均值可达 186 277 IU/g,远高于其他方法。本研究纯化过程中去除的主要是无中和活性的杂蛋白,纯化后目的蛋白收率范围为 40% ~ 60%,在今后的大规模生产中会导致从马血浆中提取蛋白效价的总收率下降,基于获得更高比活性的马破伤风免疫球

蛋白 F(ab')₂,收率下降是可以接受的。

亲和层析是分离纯化蛋白质等生物大分子特异而有效的层析技术,分离过程简单、快速,分辨率高,具有高度的选择性、分辨率和优良的载量^[16-17]。与其他层析技术相比,免疫亲和层析技术更具专一性、高效性、特异性^[18-19]。本实验采用免疫亲和层析法制备马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂,可进一步降低聚合物含量和制品的蛋白含量,从而得到高效价和高比活性的破伤风马免疫球蛋白 F(ab')₂ 制剂。本研究稳定性研究结果显示,采用免疫亲和层析制备的马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 于(25 ± 2) °C 放置 6 个月,效价均在合格范围之内,稳定性较好。本研究为马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 制剂及同类产品的制备提供了新的思路。

参考文献

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Vol.) [S]. Beijing : China Medical Science Press , 2020 : 211-216. (in Chinese)
国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (三部) [S]. 北京 : 中国医药科技出版社, 2020 : 211-216.
- [2] ARORA S, SAXENA V, AYYAR B V. Affinity chromatography : A versatile technique for antibody purification [J]. Methods , 2016 , 116 (complete) : 84-94.
- [3] KAVRAN J M, LEAHY D J. Immunoaffinity purification of proteins [J]. Mtd Enzymol , 2015 , 559 : 27-36.
- [4] ÇETIN , KEMAL , DENIZLI A. Immunoaffinity microcryogels for purification of transferrin [J]. J Chromatogr B , 2019 (1114-1115) : 5-12.
- [5] BAKHSHPOUR M , TOPCU A A , BERELI N , et al. Poly (hydroxyethyl methacrylate) immunoaffinity cryogel column for the purification of human immunoglobulin M [J]. Gels , 2020 , 6 (4) : 1-13.
- [6] KARAM , CHAND , SANCHAY , et al. Isolation and characterization of bluetongue virus recovered from blood samples by immunoaffinity purification [J]. Indian J Microbiol , 2018 , 58 : 433-439.

- [7] YANG J J , DUAN L J , JIN X M , *et al.* Fractionation of equine IgG using caprylic acid precipitation in combination with anion exchange chromatography [J]. *Prog Microbiol Immunol* , 2015 (1) : 17-20. (in Chinese)
- 杨俊杰,段丽娟,金学敏,等. 辛酸沉淀结合阴离子交换层析纯化马 IgG 的研究 [J]. *微生物学免疫学进展* , 2015 (1) : 17-20.
- [8] 包正琦,段丽娟,张玲玲,等. 有机溶剂/去污剂病毒灭活处理对破伤风抗毒素质量的影响 [J]. *微生物学免疫学进展* , 2019 (3) : 38-42.
- [9] 黄志聪,成石阳,罗海杰. 破伤风人免疫球蛋白与马血清破伤风抗毒素的使用比较 [J]. *深圳中西医结合杂志* , 2020 , 30 (12) : 3.
- [10] KABURA L , ILIBAGIZA D , MENTEN J , *et al.* Intrathecal vs. intramuscular administration of human antitetanus immunoglobulin or equine tetanus antitoxin in the treatment of tetanus : a meta-analysis [J]. *Trop Med & Int Health* , 2010 , 11 (7) : 1075-1080.
- [11] STUBBE M , MORTELMANS L J M , DESRUELLES D , *et al.* Improving tetanus prophylaxis in the emergency department : a prospective , double-blind cost-effectiveness study [J]. *Emerg Med J* , 2007 , 24 (9) : 648-653.
- [12] SQUAIELLA-BAPTISTO C C , MAGNOLI F C , MARCELINO J R , *et al.* Quality of horse F(ab')₂ antitoxins and anti-rabies immunoglobulins : protein content and anticomplementary activity [J]. *J Venomous Animals Toxins Including Trop Dis* , 2018 , 24 : 16.
- [13] 蔡艳霞,郑晓秋. 马破伤风免疫球蛋白 F(ab')₂ 与破伤风抗毒素皮试效果比较 [J]. *中国乡村医药* , 2017 , 24 (17) : 1.
- [14] 李景玉,陈孝婷,石碧珠. 一种无防腐剂的注射用马破伤风免疫球蛋白制剂及其制备方法 [P] : CN106039308A. 2016-10-26.
- [15] ZHANG X J , LI H L , DENG D Y , *et al.* Functional and proteomic comparison of different techniques to produce equine anti-tetanus immunoglobulin F(ab')₂ fragments [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed & Life Sci* , 2018 , 1092 : 29-39.
- [16] TUSTIAN A D , LAURIN L , IHRE H , *et al.* Development of a novel affinity chromatography resin for platform purification of bispecific antibodies with modified protein a binding avidity [J]. *Biotechnol Prog* , 2018 , 34 (3) : 650-658.
- [17] KR A , PPA B , VW A , *et al.* Separation of virus-like particles and extracellular vesicles by flow-through and heparin affinity chromatography [J]. *J Chromatogr A* , 2019 , 1588 : 77-84.
- [18] SINTIPRUNGRATK , CHAISURIYAP , WATCHARATANYATIPK , *et al.* Immunoaffinity chromatography in antivenomics studies : Various parameters that can affect the results [J]. *Toxicon* , 2016 , 119 : 129-139.
- [19] MFBA B , NUAB C , DBHB D , *et al.* Single-step purification of equine chorionic gonadotrophin directly from plasma using affinity chromatography-Science direct [J]. *J Biotechnol* , 2020 , 323 : 174-179.

收稿日期 2021-07-26 编辑 李靓

(上接第 597 页)

- [15] THACKABERRY E A , KOPYTEK S , SHERRATT P , *et al.* Comprehensive investigation of hydroxypropyl methylcellulose , propylene glycol , polysorbate 80 , and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin for use in general toxicology studies [J]. *Toxicol Scie* , 2010 , 117 (2) : 485.
- [16] KÖHLER M. Thrombogenicity of prothrombin complex concentrates [J]. *Thromb Res* , 1999 , 95 (4 Suppl 1) : 13-17.
- [17] GILES A R , NESHEIM M E , HOOGENDOORN H , *et al.* The coagulant-active phospholipid content is a major determinant of in vivo thrombogenicity of prothrombin complex (factor IX) concentrates in rabbits [J]. *Blood* , 1982 , 59 (2) : 401-407.

收稿日期 2021-11-08 编辑 王佳凤