

七天脱离冷链对静注人免疫球蛋白 (pH4) 质量的影响

赵小洁 窦 姿 赵云飞 宋明祥 徐永浩 张齐朋^{通讯作者}

兰州兰生血液制品有限公司 甘肃兰州 730046

【摘要】目的 通过对七天脱离冷链条件 (2 ~ 8℃) 下静注人免疫球蛋白 (pH4) 的关键质量指标的考察, 寻找可作为短时间脱离冷链条件时静注人免疫球蛋白 (pH4) 的质量监控项目。**方法** 将三批随机抽样的静注人免疫球蛋白 (pH4) 样品放置在 (25±2)℃ 条件下, 每日随机抽取每批各三瓶样品, 保存在 2 ~ 8℃ 冰箱, 共计 7 天, 待 7 天结束后对样品统一进行纯度、分子大小分布、抗补体活性关键质量指标的检测, 并对均值进行统计学分析。**结果** 纯度、分子大小分布与抗补体活性变化均无统计学意义, 但在放置过程中, 二聚体含量有显著上升。**结论** 静注人免疫球蛋白 (pH4) 短时间脱离冷链, 其关键质量属性未发生明显变化, 但分子大小分布中的二聚体的含量可以作为静注人免疫球蛋白 (pH4) 短时间脱离冷链的质量监测指标。

【关键词】 静注人免疫球蛋白 (pH4); 脱离冷链; 纯度; 分子大小分布

【中图分类号】 R392.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 2095-9753 (2021) 01-001-03

Effect of short break from cold chain on the quality of injection of human immunoglobulin (pH4)

ZHAO Xiaojie, DOU Zi, ZHAO Yunfei, SONG Mingxiang, XU Yonghao, ZHANG Jipeng.

Lanzhou Institute of Biological Product Co., Ltd., Lanzhou 730046, China. Corresponding author: ZHANG Jipeng

【Abstract】Objective To compare the key quality indexes of human immunoglobulin (pH4) under the condition of 7 days cold chain separation (2 ~ 8℃), and to find out the quality monitoring items that can be used as the condition of short-term cold chain separation. **Methods** Three batches of randomly sampled human immunoglobulin (pH4) were placed at (25±2)℃, three bottles of each batch was randomly selected every day, and stored in refrigerator at 2 ~ 8℃ for 7 days. After 7 days, the purity, molecular size distribution and anti complement activity of the samples were tested and analyzed statistically. **Results** There was no significant difference in purity, molecular size distribution and anticomplement activity, but the dimer content increased significantly in the process of placement. **Conclusion** The key quality properties of human immunoglobulin (pH4) separated from the cold chain did not change significantly, but the dimer content in the molecular size distribution can be used as the quality monitoring index of human immunoglobulin (pH4) separated from the cold chain in a short time.

【Key words】 Intravenous injection of human immunoglobulin (pH4); separation from cold chain; purity; molecular size distribution

静脉注射用人免疫球蛋白是由健康人血浆, 经低温乙醇蛋白分离法, 并经过病毒去除和灭活制成的免疫球蛋白制剂^[1]。主要用于治疗免疫球蛋白缺乏症、原发性血小板减少性紫癜、川崎病以及其他免疫调节类的疾病。静注人免疫球蛋白 (pH4) 的主要成分为球蛋白 (IgG), 高温及蛋白酶类处理容易引起 IgG 聚合或降解, 产生高分子聚合物和蛋白片段^[2], IgG 高分子聚合物, 特别是具有抗补体活性 (ACA) 的 IgG 聚合物是引起过敏反应的主要原因, 将会产生大量过敏介质和毒素, 从而引起炎症反应。

静注人免疫球蛋白 (pH4) 储运条件为 2-8℃, 但在生产过程的产品转移、外观检查、产品检测和包装阶段存在短暂脱离冷链条件 (2 ~ 8℃) 的情况。纯度、分子大小分布、抗补体活性 (ACA) 属于静注人免疫球蛋白 (pH4) 的关键质量属性, 本研究主要通过对七天脱离冷链条件 (2 ~ 8℃) 下静注人免疫球蛋白 (pH4) 的关键质量属性的考察, 寻找可作为短时间脱离冷链条件时静注人免疫球蛋白 (pH4) 的质量监控项目。

1 材料和方法

1.1 材料

静注人免疫球蛋白 (pH4), 规格: 2.5g/瓶, 批号为 A、B、C, 为兰州兰生血液制品有限公司生产; DYY-III 型稳压稳流电泳仪, 购自北京市六一仪器厂; UMAX Powerlook 2100XL 扫描仪,

购自台湾力光科技; 1260 高效液相色谱仪, 购自 Agilent 公司; UV1800 型紫外分光光度计, 购自岛津公司。

1.2 方法

将三批随机抽样的样品静注人免疫球蛋白 (pH4) 放置在 (25±2)℃ 条件下, 每日随机抽取每批各三瓶样品 (标记为 1、2、3), 保存在 2 ~ 8℃ 冰箱, 共计 7 天, 待 7 天结束后对样品统一进行纯度、分子大小分布、抗补体活性的检测, 并对均值进行统计学分析。

1.2.1 纯度测定方法

按照《中国药典》(2015 年版三部) 通则 0541 第二法的规定进行测定。

1.2.2 分子大小分布测定方法

按照《中国药典》(2015 年版三部) 通则 0512、0514、3122 规定进行测定。

1.2.3 抗补体活性 (ACA) 测定方法

按照《中国药典》(2015 年版三部) 通则 3410 规定进行测定。

1.3 判定标准

纯度应不低于蛋白质总量的 95.0%; IgG 单体与二聚体含量之和应不低于 95.0%; 抗补体活性应不高于 50%。

1.4 统计学方法

采用 SPSS21 软件对数据进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 纯度

3批静注人免疫球蛋白(pH4)样品在 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下放置1天和7天后,纯度检测结果均值差异无统计学意义($P>0.05$),均符合产品《中国药典》(2015年版三部)要求。见表1、图1。

表1: 静注人免疫球蛋白(pH4)纯度检测结果均值(%)

批号	1天	2天	3天	4天	5天	6天	7天
A1	99.2	99.0	99.2	99.2	99.1	99.0	98.8
A2	99.1	99.0	99.1	99.1	99.2	99.1	99.0
A3	99.3	99.1	99.1	99.0	99.1	99.0	98.6
A均值	99.2	99.0	99.1	99.1	99.1	99.0	98.8
B1	99.0	99.2	99.0	99.2	99.2	99.0	99.0
B2	99.1	99.0	98.9	99.2	99.1	98.9	99.1
B3	98.9	99.1	99.1	99.0	99.0	99.1	99.0
B均值	99.0	99.1	99.0	99.1	99.1	99.0	99.0
C1	99.1	99.2	99.2	99.2	99.0	98.9	99.0
C2	99.2	99.0	98.9	99.1	98.9	99.1	99.1
C3	98.9	99.1	99.0	99.0	99.0	99.1	98.9
C均值	99.1	99.1	99.0	99.1	99.0	99.0	99.0

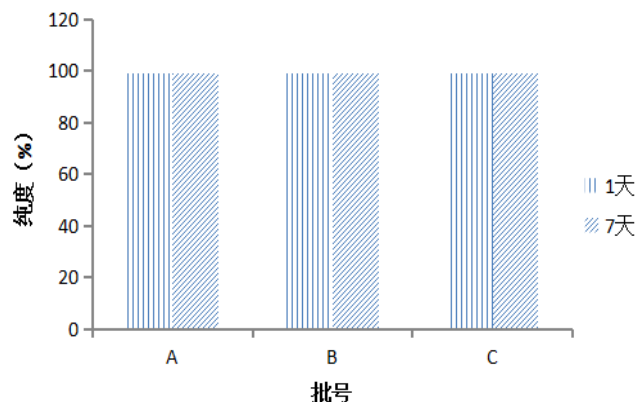


图1 静注人免疫球蛋白(pH4) $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 1天、7天纯度检测结果

2.2 分子大小分布

2.2.1 单体加二聚体含量及裂解体含量检测结果均值如下(表2、图2、图3)。其结果与在 25°C 的放置时间无显著性相关($P>0.05$)。

表2: 静注人免疫球蛋白(pH4)单体加二聚体含量及裂解体含量检测结果均值(%)

批号	单体加二聚体含量(%)		裂解体含量(%)	
	1天	7天	1天	7天
A1	99.1	98.8	0.81	0.94
A2	99.2	99.0	0.52	0.58
A3	99.2	98.8	0.48	0.60
A均值	99.2	98.9	0.60	0.71
B1	99.1	98.9	0.94	1.03
B2	98.7	98.9	0.88	1.11
B3	98.6	97.9	0.88	1.25
B均值	98.8	98.6	0.90	1.13
C1	98.0	98.8	1.41	0.92
C2	99.0	98.6	0.52	0.63
C3	98.9	98.5	0.50	0.67
C均值	98.6	98.6	0.81	0.74

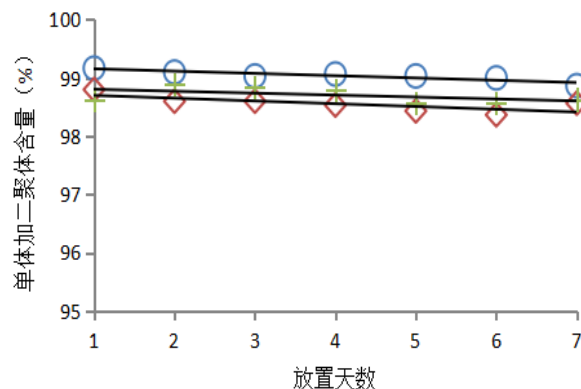


图2 静注人免疫球蛋白(pH4) $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 7天单体加二聚体含量检测结果均值

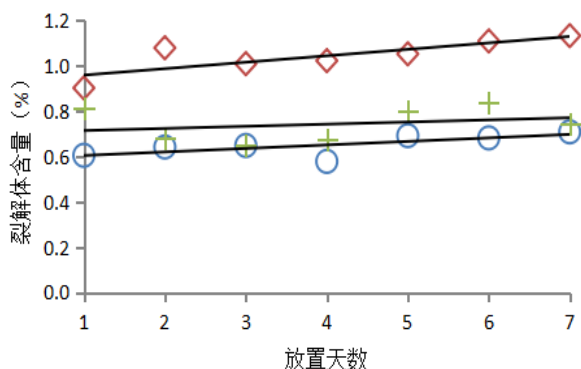


图3 静注人免疫球蛋白(pH4) $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 7天裂解体含量检测结果均值

2.2.2 3批静注人免疫球蛋白(pH4)样品在 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下放置1天和7天后,二聚体与单体含量检测结果均值如下(表3)。可以看出样品在 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下放置7天的过程中,3批样品二聚体含量的上升和单体含量的下降均与在 25°C 的放置时间呈显著性相关($P<0.05$)。检测结果如下(图4、图5、图6)。

表3: 静注人免疫球蛋白(pH4)二聚体含量及单体含量检测结果(%)

批号	二聚体含量(%)		单体含量(%)	
	1天	7天	1天	7天
A1	0	3.54	99.1	95.28
A2	0.68	0.91	98.48	98.12
A3	0.79	1.77	98.39	97.04
A均值	0.49	2.07	98.66	96.81
B1	1.44	3.53	97.62	95.36
B2	2.36	3.68	96.34	94.42
B3	2.51	4.04	96.14	93.85
B均值	2.1	3.75	96.7	94.54
C1	1.9	3.66	96.11	95.19
C2	2.78	3.83	96.24	94.78
C3	3.69	4.31	95.25	94.24
C均值	2.79	3.93	95.87	94.74

2.3 抗补体活性(ACA)含量

3批静注人免疫球蛋白(pH4)样品在 $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 下放置1天和7天后,抗补体活性(ACA)含量均值的变化无统计学意义($P>0.05$),均符合产品《中国药典》(2015年版三部)要求。见表4、图7。

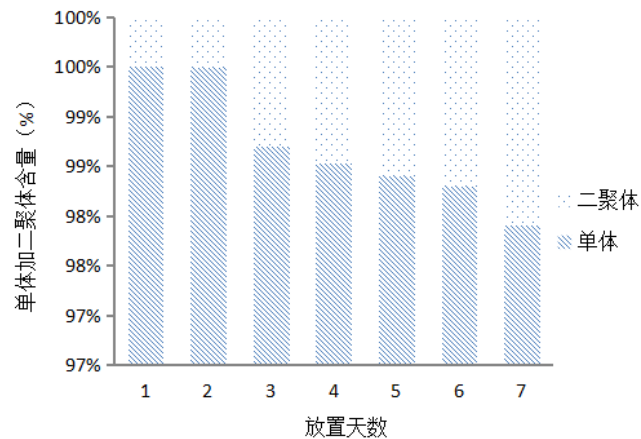


图4 静注人单体加二聚体含量检测结果均值(批号:A)

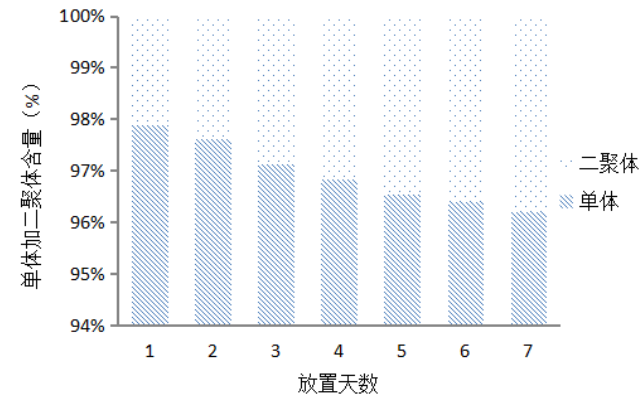


图5 静注人单体加二聚体含量检测结果均值(批号:B)

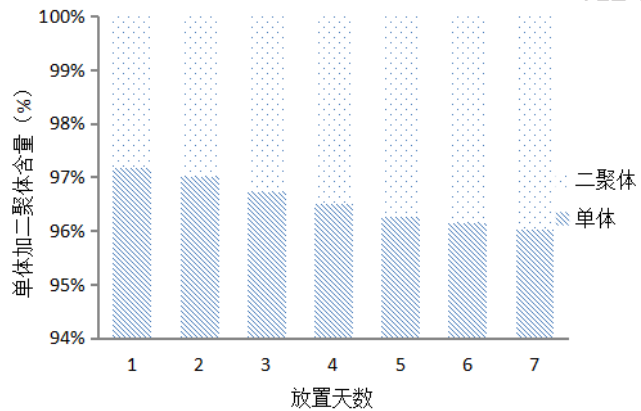


图6 静注人单体加二聚体含量检测结果均值(批号:C)

表 4: 静注人免疫球蛋白(pH4) 抗补体活性(ACA) 检测结果均值

批号	1天	2天	3天	4天	5天	6天	7天
A1	20	18	21	17	19	18	18
A2	20	25	17	19	16	24	20
A3	20	21	16	23	28	15	16
A均值	20	21	18	20	21	19	18
B1	23	21	21	19	20	18	18
B2	18	25	24	27	17	22	23
B3	28	19	16	21	17	27	13
B均值	23	22	20	22	18	22	18
C1	16	17	15	14	15	16	16
C2	15	23	19	13	19	16	19
C3	17	19	19	16	22	21	13
C均值	16	20	18	14	19	18	16

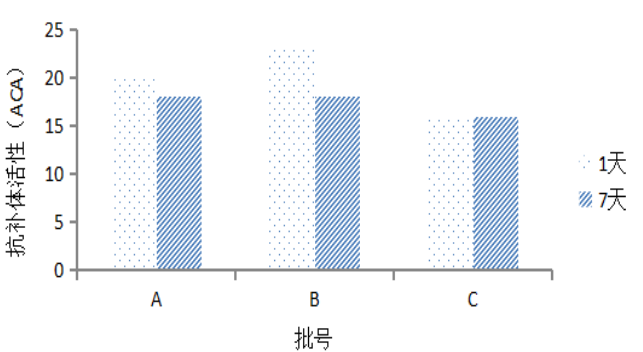


图7 静注人免疫球蛋白(pH4) 25±2℃1天、7天抗补体活性(ACA)含量检测结果

3 讨论

作为静注人免疫球蛋白(pH4)的关键质量指标,在短暂脱离冷链的条件下(25±2℃),纯度、分子大小分布、抗补体活性随脱离冷链时间(7天)的变化无统计学意义(P>0.05),在生产过程中存在的短暂脱离冷链的情况未对现有产品关键质量属性产生影响。但在脱冷链放置过程中,检测数据显示二聚体含量有显著上升趋势,同时,单体含量轻微下降,且二聚体含量的上升和单体含量的下降均与放置时间呈显著性相关(P<0.05)。

温度是影响静注人免疫球蛋白(pH4)生产和储运的关键参数,可能会导致蛋白的聚合和裂解,其过程主要涉及共价键及非共价键^[3]。短时间脱离冷链过程中发生的二聚体含量增加,可能与温度升高诱发蛋白质结构发生变化,造成相邻分子通过氢键、静电力等键能较小的作用力发生聚集反应,使单体聚合为二聚体;而蛋白裂解主要破坏共价键(二硫键)。由于氢键、范德华力、静电作用力等次级键的键能远小于二硫键的键能,所以样品在(25±2)℃下放置7天后,未发现裂解体含量的增加,这可能与蛋白裂解需要破坏二硫键等共价键需要的能量较高有关。

人免疫球蛋白是多条肽链组成的蛋白质,温度对蛋白质的结构及活性有明显的影响^[2],有文献表明由温度影响产生的聚合体会引起动物实验不良反应以及IgG生物学活性的降低^{[4][5]}。从本文分析的数据来看,七天脱离冷链并未对其关键质量属性造成影响。仅在分子大小分布检测中发现二聚体含量有所增加,单体含量有所下降,但并未超出药典的规定范围。通过本文分析,静注人免疫球蛋白(pH4)的相关研究可将二聚体的含量作为关注指标,控制二聚体的含量可防止人免疫球蛋白(IgG)在大于25℃条件下,单体和二聚体聚合成多聚体进而引起严重的不良反应^[6]。

参考文献:

[1] 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, 2015.

[2] 吕绍玉, 石正国, 朱瑞芳. 静注人免疫球蛋白(pH4)质量风险的生产控制山东化工, 2014, 43:190-193)

[3] 谢秀玲, 李欣, 陈红兵. β-乳球蛋白的聚合及特性研究进展. 食品科学, 2015, 36(9):230-234

[4] 任跃明, 程雅琴, 倪道明. 静脉注射人免疫球蛋白的质量控制中国生物制品学杂志, 2005, 18(1):73-75

[5] 侯继峰, 赵卉, 杨鹏云, 等. 储存温度对静注人免疫球蛋白质量影响的研究. 药物分析杂志. 2009, 29(9):1475-1478

[6] 刘敏亮, 甄细娥, 匡青芬, 等. 高浓度静注人免疫球蛋白制品稳定性的研究. 中南药学, 2015, 13(11):1171-117