

储存温度对静注人免疫球蛋白质量影响的研究

侯继锋, 赵卉, 杨鹏云, 郝杰

(中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要 目的: 通过比较不同温度对静注人免疫球蛋白(IgG)质量的影响, 为该类制品的运输和储存温度控制提供科学依据。方法: 设置不同的考核温度, 采用高效液相色谱法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法和该品种药典规定的部分检测项目和方法进行分析。结果: 37℃ 孵放 7 d 或 45℃ 以上温度孵放 1 d 免疫球蛋白将形成聚合体和裂解片断; 高温(60℃ 以上)使免疫球蛋白快速聚合, 形成大量二聚体或高分子聚合物。聚合物形成后使生物学活性及部分理化性质明显降低和改变。结论: 静注人免疫球蛋白应严格执行 4℃ 冷藏保存条件, 运输时间超过 24 h 必须使用冷藏车进行冷链运输。

关键词: 静注人免疫球蛋白; 高效液相色谱法; 聚合物; 生物活性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1475-04

Study of storage temperature influencing on quality of immunoglobulin for human intravenous injection

HOU Ji-feng ZHAO Hui YANG Peng-yun HAO Jie

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract Objective To compare different temperature influencing the quality of IgG for intravenous use, and provide scientific testimony for the temperature control of transportation and storage of the products. **Methods** To determine the quality of the products after incubated in different temperature, using HPLC, SDS-PAGE and some methods required by Chinese Pharmacopoeia. **Results** Products incubated in 37℃ for 7 days or more than 45℃ for 1 day, polymers and fragments will be formed. High temperature (60℃) will make IgG form dimer or macromolecule polymers rapidly. Bioactivity and some physicochemical property will be decreased and altered obviously. **Conclusion** Storage condition for the products should be carried out strictly. Refrigerated van should be used when the transportation duration is more than 24 hours.

Key words human IgG for intravenous use; HPLC; polymers; bioactivity

静注人免疫球蛋白是从正常人血浆经低温乙醇工艺提取的免疫球蛋白。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、川崎病以及其他自身免疫性疾病。静注人免疫球蛋白的主要成分为 γ 球蛋白(IgG), IgG 由 2 条轻链和 2 条重链通过二硫键结合组成。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断。Jane-way 等人^[1]的研究表明, 蛋白片断不会引起严重不良反应。欧洲药典和中国药典等都未直接规定 IgG 片断的含量。但大量的高相对分子质量聚合物会引起严重的不良反应, 甚至死亡。本文通过对静注人免疫球蛋白不同温度存放研究, 考核温度对静注人

免疫球蛋白质量的影响。

1 仪器、试剂、样品

电泳仪为美国 Bio-Rad 公司产品; 高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品。

蛋白高相对分子质量标准(HMW-Markers Pharmacia 产品) $5.3 \times 10^4 \sim 2.12 \times 10^5$; 蛋白低相对分子质量标准(LMW-Markers Pharmacia 产品) $1.4 \times 10^4 \sim 9.4 \times 10^4$ 。

国内某企业生产的 5% 静注人免疫球蛋白, 规格为 1.25 g 每瓶, 批号为 20080511, 国家批签发合格产品, 本研究采用同一批号。

2 样品处理

1号样品 4℃存放样品; 2号样品 37℃解放 1 d 3号样品 37℃解放 7 d 4号样品 45℃解放 1 d 5号样品 60℃水浴 24 h 6号样品 100℃水浴 30 min

3 分析方法及结果

3.1 SDS-PAGE分析 还原电泳分离胶浓度为10%, 非还原电泳分离胶浓度为5%; 上样量均为20 μg, 结果见图1和图2。图1为还原电泳图谱, 样品主要区带为 5×10^4 和 2.5×10^4 , 分别为 IgG 重链和轻链。图2为非还原电泳图谱, 1号、3号、4号样品区带在 $1.1 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^5$ 之间。而5号、6号样品出现高相对分子质量区带, 甚至不能进入分离胶。

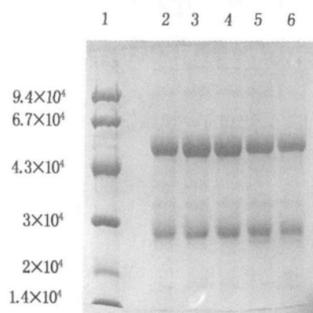


图1 还原 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig 1 Reduced SDS-PAGE

1. 相对分子质量标准(Marker) 2~6. 分别为1号、3号、4号、5号、6号样品 (lane 2,3,4,5, and 6 are sample 1,3,4,5 and 6 respectively)

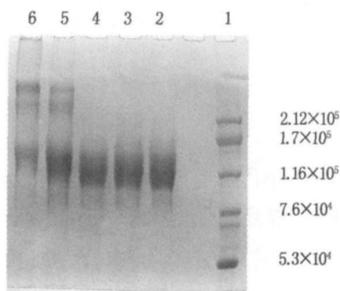


图2 非还原 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig 2 Non-reduced SDS-PAGE

1. 相对分子质量标准(Marker) 2~6. 分别为1号、3号、4号、5号、6号样品 (lane 2,3,4,5, and 6 are sample 1,3,4,5 and 6 respectively)

3.2 HPLC分析

3.2.1 TSK G3000SW 柱 (7.5 mm × 600 mm), Waters 2487紫外检测器, 流动相为 pH 7.0磷酸盐缓冲液 (PBS)加 1% 异丙醇, 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。色谱图见图3。IgG 单体峰保留时间为 23 min, 二聚体为 19 min, 多聚体为 17 min。

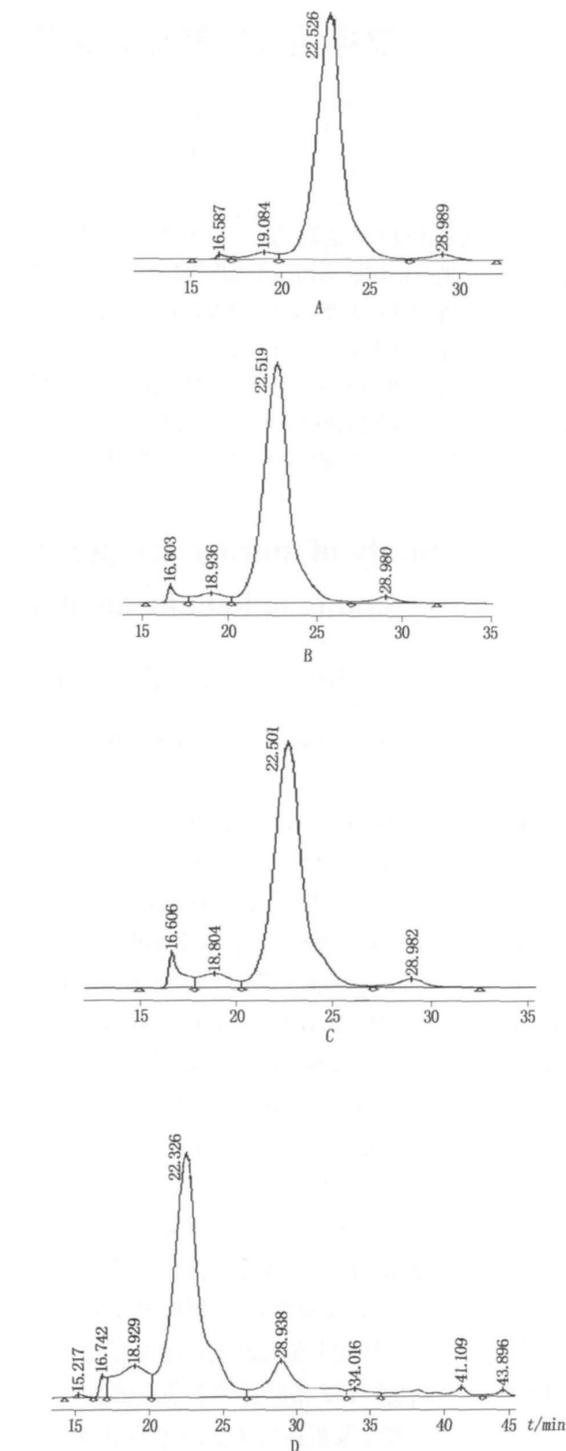


图3 静注人免疫球蛋白高效液相色谱图 (pH 7.0)

Fig 3 HPLC of WIG (pH 7.0)

A. 1号样品 (sample 1) B. 2号样品 (sample 2) C. 3号样品 (sample 3) D. 4号样品 (sample 4)

3.2.2 TSK G3000SW 柱 (7.5 mm × 600 mm), Waters 2487紫外检测器, 流动相为 pH 4.0 PBS加 1% 异丙醇, 流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。色谱图见图4。IgG 单体峰保留时间为 24 min, 二聚体为 20 min, 大分子聚合体为 5 min。

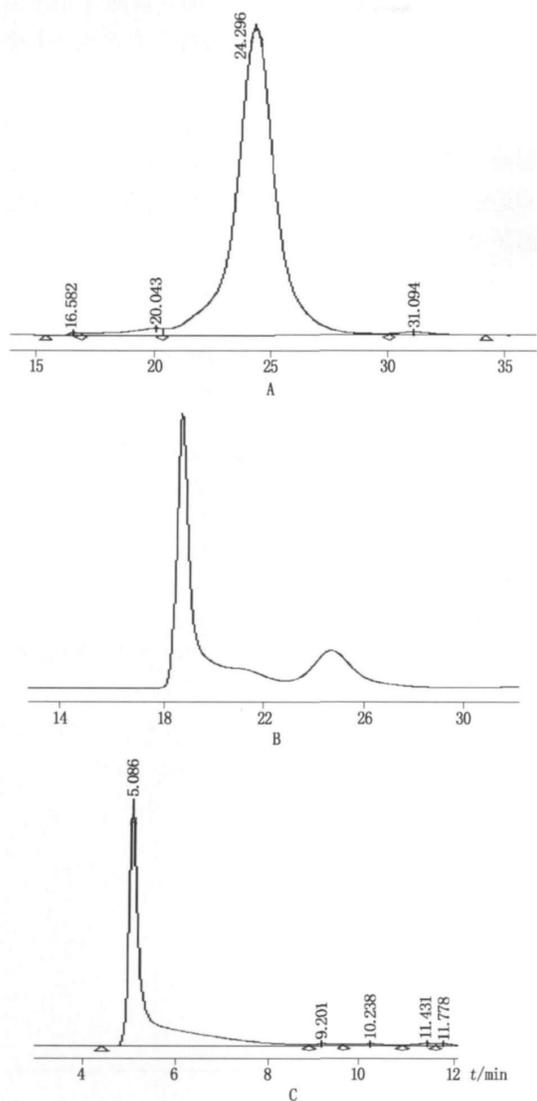


图 4 静注人免疫球蛋白高效液相色谱图 (pH 4.0)

Fig 4 HPLC of IVIG (pH 4.0)

A. 1号样品 (sample 1) B. 5号样品 (sample 5) C. 6号样品 (sample 6)

3.3 pH测定 用生理氯化钠溶液将供试品蛋白含量稀释成 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行测定^[3]。结果见表 1。高温处理后制品的 pH 明显升高。

3.4 激肽释放酶原激活剂 (PKA)测定 按 2005 年版中国药典三部附录 IX F 进行测定^[3]。结果见表 1。

3.5 抗补体活性 (ACA)测定 按 2005 年版中国药典三部附录 IX K 进行测定^[3]。结果见表 1。

3.6 白喉抗体测定 按 2005 年版中国药典三部附录 X O 进行测定^[3]。结果见表 1。高温处理后制品的白喉抗体效价明显降低。

3.7 抗-HBs测定 放免试剂盒购自北京北方生物技术研究所,按说明书操作。结果见表 1。高温处理后制品的抗-HBs效价明显降低。

3.8 小鼠异常毒性试验^[3] 6~8 周龄 BALB/c 小鼠,雌性;每组 3 只,分 6 组;按 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$ 尾静脉注射。结果见表 1。

4 讨论

液体静注人免疫球蛋白在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 的稳定性已通过了所有企业注册验证,通常在 3 年内是稳定的。但当温度升高 ($25 \text{ }^\circ\text{C}$ 或 $35 \text{ }^\circ\text{C}$),随着存放时间的延长,将会产生裂解片段,裂解片段的相对分子质量主要为 1.2×10^4 , 2.6×10^4 , 5.4×10^4 ^[1],这些裂解片段通常不会引起严重副反应。牟蕾^[2] 等人在病毒灭活工艺研究过程中,也对热处理对静注人免疫球蛋白性质的影响做了初步探讨,但其工作主要是对含有大量保护剂的冻干中间品进行研究。本文重点关注温度升高是否会对液体制品的生物学活性和产品质量产生影响。

实验结果表明,当样品在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 解放 7 d 多聚体含量大于 5%; $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 解放 1d,除多聚体含量明显升

表 1 药典三部部分项目测定结果

Tab 1 Testing result of items required by ChP (Vol III)

测定项目 (item)	样品号 (sample No.)					
	1	2	3	4	5	6
pH	4.01	4.02	4.05	4.10	4.38	4.41
PKA /U·mL ⁻¹	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
ACA %	未检出 (non- found)					
白喉抗体 (diphtheria Ab) /HAU·g ⁻¹	15.6	14.8	11.2	8.2	1.6	未检出 (non- found)
抗-HBs (anti-HBs) /U·g ⁻¹	68.4	60.0	62.0	46.2	20.0	未检出 (non- found)
小鼠异常毒性试验 (abnormal toxicity mouse)	健存 (survive)	健存 (survive)	健存 (survive)	健存 (survive)	严重反应 (SAR)	死亡 (death)

高外,产生大量的裂解片段,抗体的生物学活性也受到一定的影响;60℃水浴24h形成大量二聚体和小分子聚合物,生物学活性受到严重影响,小鼠异常毒性试验出现严重不良反应;100℃水浴30min时,形成大量高分子聚合物,生物学活性丧失,小鼠异常毒性试验动物死亡。60℃水浴24h和100℃水浴30min处理后的结果表明生物学活性的降低以及动物出现严重不良反应与多聚体的量直接相关。

经不同温度处理的样品 SDS-PAGE 还原电泳图谱没有明显差异,主要表现为 5×10^4 和 2.5×10^4 2 条区带。非还原电泳显示,60℃水浴24h和100℃水浴30min处理后,样品出现大量聚合物。非还原电泳使用的还原剂巯基乙醇能将聚合物及 IgG 分子的二硫键裂解开,产生免疫球蛋白重链和轻链。

60℃水浴24h和100℃水浴30min处理的样品,在中性条件下出现沉淀,无法进行 HPLC 分析,改用 pH 4 酸性条件检测。IgG 的等电点接近中性,供试品的 pH 为 4.0 聚合物形成后在酸性条件下仍

能依靠负电荷维持稳定,供试品的外观除乳光加深和颜色略为发黄外,并无明显改变。当溶液 pH 接近等电点时,平衡被打破,产生沉淀。

液体静注人免疫球蛋白的质量容易受到温度的影响,从生产到临床使用前应严格按 4℃ 条件储存和运输,运输时间较长应采用冷藏车运输,夏季或高温环境应尽量减少暴露时间。

参考文献

- 1 Dim elRV, terHartHG, Derksen GJ *et al*. Characterization of immunoglobulin G fragments in liquid intravenous immunoglobulin products *Transfusion*, 2005 45(10): 1601
- 2 MU Lei(牟蕾), CHU Yi-bo(初毅波), WANG Yan(王焰), *et al*. Study of influence on property of lyophilized immunoglobulin for intravenous use by heat treatment(热处理对冻干静脉注射用免疫球蛋白性质影响的初探). *West China J Pharm Sci*(华西药理学杂志), 2002 17(5): 345
- 3 ChP(中国药典). 2005. Vol III(三部): 183

(本文于 2009 年 5 月 25 日修改回)

《中国医院药学杂志》2010 年征订启事

《中国医院药学杂志》系中国科协主管、中国药学会主办的综合性医院药学专业性学术核心期刊。本刊为湖北省优秀期刊,2008 年中国科协精品科技期刊,主要面向全国医院药学工作者、医务人员和广大药学工作者,主要介绍国内外医院药学创新性成果、药学先进技术、临床合理用药、中西药制剂、药剂科的科学与管理、药学基础知识及理论等。

本刊为半月刊,大 16 开,每期为 80 页,定价 12.00 元,全年 288 元。每月 15、30 号出版,国内邮发代号 38-50 国外代号: M 65-38。欢迎广大读者订阅。

本刊现已开通网上在线投稿,欢迎广大作者踊跃投稿(网址: <http://www.zgyyx.com>)。编辑部地址:武汉市胜利街 155 号(邮政编码:430014);电话:027-82836596 82809190 传真:027-82836596 E-mail: pharmacy@vip.163.com。