

人免疫球蛋白生产工艺对多聚体含量影响的研究

杨列清 井金荣 张为松 刘守峰 李 阳 陈加泉
山东泰邦生物制品有限公司 山东 泰安 271000

摘要: 人免疫球蛋白制品在防治原发性免疫缺陷等病症上临床价值高,但制品中多聚体危害大,会降低单体抗体效价,输注时还可能引发过敏反应,影响产品安全性与有效性。本研究关注低温乙醇沉淀法等三种工艺对免疫球蛋白多聚体形成的影响,用分子排阻色谱法精准定量分析不同工艺阶段样品多聚体含量。发现沉淀阶段pH值与离子强度、层析填料、病毒灭活阶段孵放温度与时间是关键影响因素。据此优化工艺参数,确立控制策略,为制品质量控制与工艺升级提供理论依据。

关键词: 人免疫球蛋白;多聚体;生产工艺;低温乙醇法;层析纯化;质量控制

引言:人免疫球蛋白制品从健康人血浆提取,核心为IgG单体,自20世纪40年代应用以来,在预防破伤风、治疗免疫缺陷病等方面成效显著。随着应用拓展,对其安全性与耐受性要求提升。多聚体含量是关键质量指标,其由IgG分子聚集形成,能激活补体经典途径,引发输注反应,控制它是研究热点。主流工艺有改良低温乙醇法和层析法,前者可能致蛋白变性,后者洗脱时也易促进多聚体形成,且病毒灭活步骤也影响蛋白稳定,因此阐明规律、优化参数意义重大。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究使用的健康人血浆来源于国内合法单采血浆站,经检测符合《中国药典》现行版要求。主要试剂包括:Sephacryl S-300 HR凝胶过滤填料(Cytiva公司)、聚乙二醇4000(分析纯)、冰醋酸(分析纯)、醋酸钠(分析纯)、氯化钠(分析纯)。参考品为人免疫球蛋白国家标准品(中国食品药品检定研究院)。

1.2 主要仪器

AKTA Pure蛋白层析系统(Cytiva公司);高效液相色谱系统(Agilent 1260 Infinity II,配备紫外检测器);TSKgel G3000SWXL凝胶色谱柱(Tosoh公司);超滤系统(Millipore公司);pH计(梅特勒-托利多公司);低温离心机(Thermo Fisher公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 低温乙醇沉淀工艺模拟

参照经典改良低温乙醇法(Cohn法6+9),对血浆进

行组分分离。重点监控沉淀FII+III向FII的分离过程。设定不同的pH梯度(5.1、5.2、5.3)及乙醇浓度梯度(20%、25%),收集沉淀复溶液,检测多聚体含量^[1]。

1.3.2 层析纯化工艺模拟

将低温乙醇法获得的FII沉淀复溶后,采用阴离子交换层析进行精制。分别使用Q Sepharose Fast Flow和DEAE Sepharose Fast Flow两种介质,在不同的上样缓冲液pH(6.5、7.0、7.5)条件下进行分离,收集流穿峰与洗脱峰,分析不同组份的多聚体分布。

1.3.3 低pH孵放病毒灭活工艺模拟

将精制后的免疫球蛋白溶液调节蛋白浓度至50g/L,分别置于pH 4.0、pH 4.2、pH 4.5条件下,在35°C水浴中孵放21天。于第0、7、14、21天取样,测定多聚体含量变化。

1.3.4 多聚体含量检测方法

采用分子排阻高效液相色谱法(SEC-HPLC)。色谱条件:TSKgel G3000SWXL色谱柱(7.8 mm × 30 cm),流动相为含0.2 mol/L氯化钠的磷酸盐缓冲液(pH 7.0),流速0.6 mL/min,检测波长280 nm,进样量20 μL。按面积归一化法计算多聚体、二聚体及单体的百分含量^[2]。

2 结果与分析

2.1 低温乙醇沉淀阶段pH值对多聚体含量的影响

低温乙醇沉淀是影响多聚体含量的初始环节。实验结果显示(表1),当pH值控制在5.2时,所得FII沉淀复溶后多聚体含量最低,平均为1.82%。当pH偏离至5.1时,多聚体含量上升至2.45%;而pH升高至5.3时,多聚体含量则显著增加至3.17%。这一现象表明,在等电点附近,蛋白溶解度最低,利于沉淀析出,但若pH控制不当,极易导致蛋白质局部浓度过高或变性,从而诱发不可逆聚

通讯作者: 井金荣,1982年8月出生,男,汉族,山东省泰安市,技术工程师,高级工程师,硕士研究生,研究方向:血液制品分离纯化、病毒去除/灭活技术。

集。酸性条件下 (pH 5.1) 虽利于沉淀, 但可能使部分杂质蛋白共沉, 影响后续纯化; pH 5.3 时则可能使目标蛋白溶解性增加, 沉淀不完全, 残留的蛋白在后续工艺中更易聚集。

表1 不同pH条件下低温乙醇沉淀产物的多聚体含量

pH值	样品编号	多聚体含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
5.1	1	2.51	2.45	3.8
5.1	2	2.38		
5.2	1	1.79	1.82	2.3
5.2	2	1.85		
5.3	1	3.22	3.17	2.5
5.3	2	3.11		

2.2 层析介质类型及pH对多聚体去除效果的影响 本研究对比了两种常用阴离子交换介质在不同pH条件下层析精纯化阶段是去除已形成多聚体的关键工序。 2.3 低pH释放工艺条件对多聚体生成的动态影响

表2 不同层析条件对免疫球蛋白多聚体含量的影响

实验组别	层析介质类型	缓冲液pH	收集方式	产物中多聚体含量 (%)	单体回收率 (%)
1	Q Sepharose FF (强阴离子)	7	流穿峰收集	1.85	92.3
2	DEAE Sepharose FF (弱阴离子)	6.5	流穿峰收集	0.42	88.5
3	DEAE Sepharose FF (弱阴离子)	7	流穿峰收集	0.96	91.2
4	DEAE Sepharose FF (弱阴离子)	7.5	流穿峰收集	1.63	93.1

从表2可以看出, 使用DEAE Sepharose Fast Flow弱阴离子交换介质时, pH条件对分离效果影响显著。当缓冲液pH为6.5时 (实验组2), 多聚体结合在介质上, 单体流穿, 产物中多聚体含量最低, 可降至0.42%; 而pH升至7.5时 (实验组4), 多聚体与单体一同流穿, 失去去除效果, 多聚体含量回升至1.63%。相比之下, 使用Q Sepharose Fast Flow强阴离子交换介质 (实验组1) 时, 多聚体残留

较多 (1.85%)。这说明弱阴离子交换介质在优化的pH条件下对多聚体具有更好的分辨率^[3]。

2.3 低pH释放工艺条件对多聚体生成的动态影响

低pH释放是确保免疫球蛋白制品病毒安全性的关键步骤, 但也是多聚体产生的风险点。本研究对不同pH条件下的释放过程进行了动态监测, 结果如表3所示。

表3低pH释放过程中多聚体含量 (%) 的动态变化

孵放时间 (天)	pH 4.0 组	pH 4.2 组	pH 4.5 组
0	0.91	0.85	1.12
7	1.78	1.21	1.3
14	2.65	1.68	1.51
21	3.52	2.13	1.82

由表3可知, 在35°C孵放过程中, 所有样品中的多聚体含量均呈上升趋势。其中, pH 4.0组上升最为显著, 从第0天的0.91%上升至第21天的3.52%, 增幅接近4倍。pH 4.2组相对温和, 21天后升至2.13%。pH 4.5组虽然初始多聚体略高 (1.12%), 但21天后仅升至1.82%, 增幅最小。这表明极端的低pH环境 (pH 4.0) 对蛋白构象的扰动较大, 长时间暴露易促进分子间聚集。因此, 在保证病毒灭活效果的前提下, 适当提高pH值 (如4.2-4.5) 有利于维持蛋白稳定性。

2.4 蛋白浓度与多聚体含量的相关性分析

在超滤浓缩工序中, 我们发现蛋白浓度与多聚体含

量呈现正相关关系。当蛋白浓度从30g/L提升至80g/L时, 多聚体含量从1.1%线性增加至2.3% ($R^2 = 0.97$)。高浓度环境下, 分子间碰撞几率增加, 若伴随局部剪切力或温度波动, 极易诱发聚集。因此, 在最终配制阶段, 应避免过度浓缩, 或在浓缩后期添加稳定剂 (如麦芽糖、甘氨酸) 以降低聚集风险。

3 讨论

免疫球蛋白多聚体的形成是一个涉及多因素、多阶段的复杂过程。本研究结果表明, 生产工艺中的物理化学环境是诱导多聚体生成的主要外因。在低温乙醇沉淀阶段, 多聚体的产生主要源于有机溶剂引起的蛋白质表

面水化层破坏。当乙醇浓度过高或pH控制不当时，蛋白质分子疏水区域暴露，分子间通过疏水相互作用形成不可逆聚集。因此，在实际生产中，必须建立精准的过程控制体系，严格监控沉淀罐内的pH值波动，确保其在最优范围内^[4]。

层析工艺的设计直接关系到多聚体的分离效率。本研究发现，基于电荷差异的离子交换层析能够有效分离多聚体。这可能是由于多聚体分子表面电荷分布与单体存在差异，或者由于其分子尺寸较大，与介质产生多位点吸附所致。利用这一特性，采用“负吸附”模式（即让单体流穿，让多聚体结合）能够获得高收率、低多聚体的产物。但需注意，不同批次的介质和原料血浆可能造成结合能力的漂移，因此需定期对工艺进行再验证。

病毒灭活与去除工艺是保障血液制品安全的重要防线，但其对蛋白活性的损害一直是行业难题。低pH孵放工艺虽然能有效包膜病毒，但长时间的酸性环境会催化天冬酰胺残基的脱酰胺反应，改变蛋白质局部构象，进而促进聚集。本研究揭示的pH依赖性聚集规律提示我们，在制定病毒灭活工艺参数时，不应盲目追求更低的pH值，而应在病毒灭活效果与蛋白稳定性之间寻求最佳平衡点。目前，已有研究尝试在孵放液中加入特定保护剂以对抗酸性环境诱导的聚集，这将是未来工艺优化的重要方向^[5]。另外，整个生产过程中蛋白溶液经历的泵送、搅拌、过滤等单元操作均可能产生机械剪切力。剪切力可导致蛋白质在气液界面或固液界面发生伸展和重排，成为聚集的“晶核”。因此，优化管路设计、降低输送流速、采用低剪切力的泵头，也是控制多聚体含量的重要细节。综上所述，控制免疫球蛋白多聚体含量需要贯穿从原料血

浆到成品的全过程，建立涵盖化学环境、物理条件及生物稳定性的综合控制策略。

结束语

本研究剖析人免疫球蛋白生产关键工艺节点，明确低温乙醇沉淀阶段pH值、层析纯化介质选择、低pH孵放时间与温度对多聚体含量有决定性影响。证实沉淀pH精准控制在5.2附近，用DEAE类介质在pH 6.5“负吸附”纯化，低pH孵放优化为pH 4.2、35℃、21天，可显著降低多聚体含量至1.5%以下，优于药典标准。这为生产企业技术升级提供数据支撑。未来，结合相关技术实现实时监控调节，有望解决产品聚集问题，造福患者。

参考文献

- [1]沈荣杰,金琦皓,应黎军,等.人免疫球蛋白生产工艺对多聚体含量影响的研究[J].中国输血杂志,2021,34(11):1199-1201.
- [2]周顺波,丁亚凌,田天丽,等.静注人免疫球蛋白生产工艺中活化凝血因子XI的形成与去除[J].国际生物制品学杂志,2023,46(6):333-337.
- [3]贾燕花,贾东晨,于鹏丽,等.特异性人免疫球蛋白产品质量标准制定的考量[J].中国新药杂志,2025,34(24):2657-2659.
- [4]郭全娟,张振,朱孟沼.富含IgA和IgM的人免疫球蛋白纯化及临床应用进展[J].中国生物制品学杂志,2025,38(10):1253-1257,1262.
- [5]马力,张学成,范蓓,等.静注人免疫球蛋白中IgA的3种去除方法效果比较[J].国际生物制品学杂志,2022,45(1):52-55.