

安全监测

酶联免疫吸附法测定高浓度静注人免疫球蛋白中
人凝血因子XII与前激肽释放酶的残留量*余雨蓉¹, 刘勇², 杨龙¹, 唐良玉¹, 肖春桥¹, 李丹¹, 菅长永^{1**}

(1. 贵州泰邦生物制品有限公司, 贵阳 550025; 2. 贵阳康养职业大学, 贵阳 550081)

摘要 目的: 建立酶联免疫吸附(ELISA)方法分别检测高浓度静注人免疫球蛋白制品(10%IVIG)中人凝血因子XII(factor XII, F XII)和前激肽释放酶(prekallikrein, PK)的残留量,并对该方法进行验证。**方法:** F XII、PK特异性抗体预包被在微孔板上并封闭。10%IVIG中的F XII、PK分别与预包被抗体结合反应,经洗涤,分别加入F XII、PK特异性生物素化检测抗体与结合抗体反应,经第2次洗涤后,分别加入辣根过氧化物酶-链霉亲和素-过氧化物酶反应,再加入显色剂反应后,添加终止液终止反应,置于酶标仪450 nm波长处测定吸收度。参照2020年版《中华人民共和国药典》验证检测方法,并采用经验证的方法对10%IVIG工艺中间品、成品中F XII、PK残留量进行测定。**结果:** 验证结果如下:稀释线性显示F XII检测方法存在基质效应,PK检测方法存在钩状效应,可分别通过稀释5~20倍、80~120倍解决;加标实验测定结果的平均回收率分别为110.3%、99.1%,RSD分别为3.6%、2.7%,该方法准确度良好;重复性测定结果的RSD分别为8.3%、7.7%;中间精密度实验的RSD分别为7.0%、9.2%;方法精密度良好;定量限精密度验证符合要求,定量限分别为1.0、1.25 ng·mL⁻¹;该方法在线性范围内线性关系良好($r=0.9999$)。耐用性验证了孵育时间、试剂盒开启有效期以及不同批号试剂盒,结果显示方法的耐用性良好。应用该方法检测10%IVIG中F XII、PK残留量均维持较低水平,说明辛酸沉淀结合2步阴离子层析工艺能够较好地去除10%IVIG中的F XII、PK。**结论:** 建立的方法适用性良好,能够满足实验室对10%IVIG静注人免疫球蛋白中F XII、PK残留量的测定。**关键词:** 高浓度静注人免疫球蛋白;人凝血因子XII;前激肽释放酶;酶联免疫吸附法;基质效应;钩状效应

中国分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)03-0514-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0235

Determination of residual human factor XII and prekallikrein in high
concentration human immunoglobulin for intravenous injection by
enzyme-linked immunosorbent assay*YU Yu-rong¹, LIU Yong², YANG Long¹, TANG Liang-yu¹, XIAO Chun-qiao¹,
LI Dan¹, JIAN Chang-yong^{1**}

(1. Guizhou Taibang Biological Products Co. Ltd., Guiyang 550025, China; 2. Guiyang Healthcare Vocational University, Guiyang 550081, China)

Abstract Objective: To establish, validate and apply an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

* 贵州省科技计划项目(黔科合成果[2024]一般148);贵州省工业和信息化发展专项科技创新项目(KJ202143)

** 通信作者 Tel:(0851)83605097; E-mail: jianchangyong@chinabiologic.com

第一作者 Tel:(0851)83652601; E-mail:yuyurong@chinabiologic.com

method for determination of residual human factor XII (F XII) and prekallikrein (PK) in high concentration human intravenous immunoglobulin (10%IVIG). **Methods:** Microplates were pre-coated with specific antibodies for F XII and PK, respectively, and then blocked. The F XII and PK in 10%IVIG were allowed to bind with the pre-coated antibodies on the plates. After appropriate washing steps, biotinylated detection antibodies specific for F XII and PK were added. Following a second washing, HRP/Streptavidin-Peroxidase conjugates were added and unbound conjugates were washed away with another washing step. After the addition of a chromogenic substrate and a stop solution, the absorbance was measured at 450 nm using a microplate reader. The detection method was validated according to the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia. Then the validated method was used to determine the residual levels of F XII and PK in process intermediates and final products 10%IVIG. **Results:** The dilution linearity results showed a matrix effect and a hook effect in F XII and PK detection methods, respectively, which could be solved by diluting 5–20 times and 80–120 times, respectively. The average recoveries in the spiked experiments were 110.3% and 99.1% for F XII and PK respectively, with RSD of 3.6% and 2.7%. indicating good accuracy of the method. The RSDs of the repeatability validation were 8.3%、7.7% for both methods, and the RSD of intermediate precision validation were 7.0% and 9.2% for F XII and PK, respectively, indicating good precision of the two methods. The limits of quantitation of the two methods were $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. Both methods exhibited good linearity ($r = 0.9999$). The robustness validation, which included incubation time, the effective period of the opened reagent kit, and different batches of reagent kits, showed good robustness of the method. The residues of high concentration human immunoglobulin F XII and PK maintained at low levels by using the method, indicating that octanoic acid precipitation combined with two-step anionic exchange chromatography process could effectively remove F XII and PK in 10%IVIG. **Conclusion:** The detection method shows good applicability and can be used for the determination of F XII and PK residues in 10%IVIG.

Keywords: high concentration human immunoglobulin for intravenous injection; human factor XII; prekallikrein; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); matrix effect; hook effect

静注人免疫球蛋白 (human immunoglobulin for intravenous injection, IVIG) 是以 1 000 名以上供血浆者的血浆为原料,经融浆、分离纯化,并经灭活等工艺制成,主要成分为 IgG^[1-2]。临床上,IVIG 用于与抗体产生缺陷相关的原发和继发免疫缺陷患者的免疫替代疗法,还可作为自身免疫性疾病、全身炎症性疾病和神经免疫学疾病的免疫调节治疗^[3-6],在临床上的安全性和耐受性得到了验证,但也存在一些不良反应报道,严重不良反应有过敏性休克、心律失常、血栓等^[7]。在 IVIG 制品中,凝血因子尤其是活化人凝血因子 XI (activation of factor XI, F XI a) 浓度过高会引起血栓栓塞事件,严重时可导致死亡^[8-10]。2010 年,美国 Octapharma 公司的 Octagam 产品。产品由于与血栓栓塞症的突然增加有关,被暂时退出市场,欧洲药品管理局调查结果显示,在最终产品中存在的与工艺相关的杂质 F XI a 是引起血栓栓塞的主要原因,另 1 种酶——激肽释放酶被认为起次要作

用^[11]。EP 规定,IVIG 生产工艺需包含去除血栓形成剂(凝血因子及其酶原)且不引起酶原激活的步骤,或提交证据表明产品不会诱导酶原激活^[12]。2022 年 5 月,国家药品监督管理局发布的《特异性人免疫球蛋白药学研究与评价技术指导原则》指出,质量研究和控制部分鼓励对凝血激活物水平进行检测并建立标准。因此,IVIG 制造商需对其生产工艺去除凝血激活物的能力进行监测。

本文关注到内源性凝血途径,首先激活人凝血因子 XII (factor XII, F XII),其与带负电荷的表面接触会引起酶原的构象变化,从而产生少量的活化人凝血因子 XII (activation of factor XII, F XII a)。接触激活 F XII a 激活前激肽释放酶 (prekallikrein, PK) 为激肽释放酶原 (prekallikrein activator, PKa),PKa 会反馈激活 F XII 为 F XII a,形成 F XII 激活的反馈调节环。这个调节环通过 F XII a 介导 F XI 激活为 F XI a, F XI a 促进钙离子依赖性因子 IX (factor IX, F IX) 的激活,从而启动内在凝血

途径。在血浆激肽释放酶-激肽系统中,PK在血浆中与高分子量激肽酶原(high-molecular-weight kininogen, HK)以非共价键结合,F XII a 促进PK裂解HK释放炎症介质缓激肽(inflammatory mediator bradykinin, BK),通过与特定细胞受体的相互作用促进炎症、血管扩张和血管通透性。研究表明,F XII、PK或HK缺陷小鼠具有抗血栓表型,不会大量出血^[13-15]。由于F XII、PK为内源性凝血途径上游的凝血激活物,IVIG生产商应关注工艺过程对二者的去除能力,为临床不良反应监测与分析提供参考。

综上,为更好地监控10%IVIG生产工艺去除凝血激活物F XII、PK的能力,并防范制品致血栓的风险,本文建立了酶联免疫吸附法(ELISA法)检测10%IVIG中F XII、PK残留量,并参照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)四部通则9012、通则9101^[16],对方法的稀释线性、准确度、专属性、重复性、中间精密密度、定量限、线性范围、耐用性进行验证。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Multiskan GO 全波长酶标仪(赛默飞公司);VM-500-1P 微孔板振荡器(群安实验仪器有限公司);XSR603S 电子天平($d=1\text{ mg}$, Mettler Toledo 公司)。

1.2 样品

10%IVIG 工艺中间品、成品[规格: $5\text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$ (10%, 50 mL)],由贵州泰邦生物制品有限公司提供。

1.3 试剂

试剂盒:人凝血因子XII ELISA 试剂盒[F XII 标准品 $1\ 000\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、96 孔抗体包被微孔滴定板、抗人凝血因子XII一抗、浓缩辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(HRP)、3,3',5,5'-四甲基对二氨基联苯(TMB)显色底物、浓缩清洗液],Innovations Research 公司。人前激肽释放酶 ELISA 试剂盒[PK 标准品 $80\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、96 孔抗体包被的微孔滴定板、浓缩稀释液 N、生物素化人前激肽释放酶检测抗体、链霉亲和素-过氧化物酶共轭物(SP 共轭物)、TMB 显色底物、浓缩洗涤缓冲液、终止液],Abcam 公司。

其他试剂:氯化钠(重庆川东化工集团有限公司,规格为 $500\text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$);三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)(阿拉丁公司,规格为 $100\text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$);无蛋白牛血清白蛋白[生工生物工程(上海)股份有限公司,规格为 $50\text{ g}\cdot\text{瓶}^{-1}$];盐酸(重庆川东化工集团有限公司,规格为 $500\text{ mL}\cdot\text{瓶}^{-1}$)。

2 方法与结果

2.1 酶联免疫吸附法测定 F XII

配制 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris, $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, pH 7.4 的 TBS 缓冲液,称取无蛋白牛血清白蛋白 3 g,溶于 100 mL TBS 缓冲液作为样品稀释液。将 F XII ELISA 试剂盒中的 F XII 标准品按线性浓度(100.0、50.0、25.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)稀释,待测样品稀释至线性范围内。测定步骤:取 100 μL 标准品/待测样品,室温振荡孵育 30 min;300 μL 清洗缓冲液洗板 3 次,加入 100 μL 抗人 F XII 一抗,室温振荡孵育 30 min;300 μL 清洗缓冲液洗板 3 次,加入 100 μL 2 000 倍稀释后 HRP,室温振荡孵育 30 min;300 μL 清洗缓冲液洗板 3 次,加入 100 μL TMB 显色底物,室温振荡孵育 10 min;加 50 μL 终止液,混匀,酶标仪 450 nm 测定吸收度。

2.2 酶联免疫吸附法测定 PK

取人前激肽释放酶 ELISA 试剂盒中的浓缩稀释剂 N 进行 10 倍稀释,配制成样品稀释液。将人前激肽释放酶 ELISA 试剂盒中的 PK 标准品按线性浓度(80.0、40.0、20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)稀释,待测样品稀释至线性范围内。测定步骤:取 50 μL 标准品/待测样品,混匀,室温孵育 2 h;200 μL 清洗缓冲液洗板 5 次,加入 50 μL 50 倍稀释后的生物素化人 PK 检测抗体,混匀,室温孵育 1 h;200 μL 清洗缓冲液洗板 5 次,加入 50 μL 100 倍稀释后的 SP 共轭物,混匀,室温孵育 30 min;200 μL 清洗缓冲液洗板 5 次,加 50 μL TMB 显色底物,混匀,室温孵育 20 min;加 50 μL 终止液,混匀,酶标仪 450 nm 测定吸收度。

2.3 数据处理

2.3.1 标准曲线 将各浓度梯度标准品 A_{450} 值与相应浓度一起输入 ELISA Calc 分析软件中(版本号:02)进行 Logistic 曲线拟合(四参数),得到标准曲线(线性相关系数 $r \geq 0.99$)。

2.3.2 样品结果计算 将样品 A_{450} 值代入标准曲线,计算即得稀释后样品 F XII、PK 含量,再乘以稀释倍数,即得待测样中 F XII、PK 残留量。参照 2020 年版《中国药典》四部通则 9101 分析方法验证指导原则,确定测定结果的回收率限度和精密密度可接受范围。采用 Office 2016 版 Excel 软件完成结果统计。

2.4 方法学验证与结果分析

2.4.1 稀释线性 考察用样品稀释液将待测样品浓度稀释至定量范围后,方法能否准确测定,同时考察

方法是否存在基质效应或钩状效应。用样品稀释液将 10%IVIG 稀释制备 6 种不同浓度的供试品溶液, 每个浓度平行测定 6 次, RSD 应 $\leq 15\%$ 。

F XII 检测方法稀释线性验证结果见表 1, 不同稀释倍数 F XII 残留量 6 次平行测定结果的 RSD 在

2.3%~10%, 符合判定标准。当稀释倍数为 1 时, F XII 检测结果不准确, 说明使用该方法检测 10%IVIG 中 F XII 残留量时存在基质效应, 基质成分会影响抗体活性, 从而影响检测结果的准确度, 可通过合适稀释度 (5~20 倍) 消除基质效应对检测结果的影响。

表 1 F XII 检测方法稀释线性验证结果

Tab. 1 Dilution linear validation results of F XII detection method

稀释倍数 (dilution multiple)	F XII 残留量检测结果 (F XII residue test result) / (ng · mL ⁻¹)						平均值 (average)	RSD /%
	1	2	3	4	5	6		
1	15.0	14.5	14.6	14.7	14.0	14.8	14.6	2.3
2	70.6	63.5	69.9	65.0	71.9	83.8	70.8	10
5	86.9	86.6	81.8	83.2	81.9	84.8	84.2	3.9
10	75.2	71.7	75.9	71.9	76.1	83.5	75.7	5.7
20	94.1	91.5	89.1	93.2	96.1	95.6	93.3	2.8
40	115.7	94.4	108.0	114.6	106.1	108.3	108.3	7.1

PK 检测方法稀释线性结果见表 2, 不同稀释倍数 PK 残留量 6 次平行测定结果的 RSD 在 3.9%~11%, 符合判定标准。如图 1 所示, 使用该方法检测不同浓度梯度的 10%IVIG 中的 PK 残留量, 当稀释倍数大于

120 倍, 抗原 - 抗体反应不等价存在钩状效应, 导致检测结果偏低, 当稀释为 80~120 倍, 检测结果处于高峰区, 此范围内抗原 - 抗体结合达到平衡点, 可有效避免钩状效应, 从而确保检测结果的准确性。

表 2 PK 检测方法稀释线性验证结果

Tab. 2 Dilution linear validation results of PK detection method

稀释倍数 (dilution multiple)	PK 残留量检测结果 (PK residue test result) / (ng · mL ⁻¹)						平均值 (average)	RSD /%
	1	2	3	4	5	6		
40	707.6	658.2	649.9	636.8	639.6	650.9	657.2	3.9
80	624.7	675.1	683.4	670.1	679.7	718.0	675.2	4.4
100	704.1	679.5	682.4	709.6	734.7	650.8	693.5	4.2
120	650.2	643.3	703.4	647.8	647.8	688.0	663.4	3.9
160	535.1	468.7	547.1	440.5	478.7	473.7	490.6	8.4
200	347.6	432.2	457.9	389.0	361.3	411.3	399.9	11

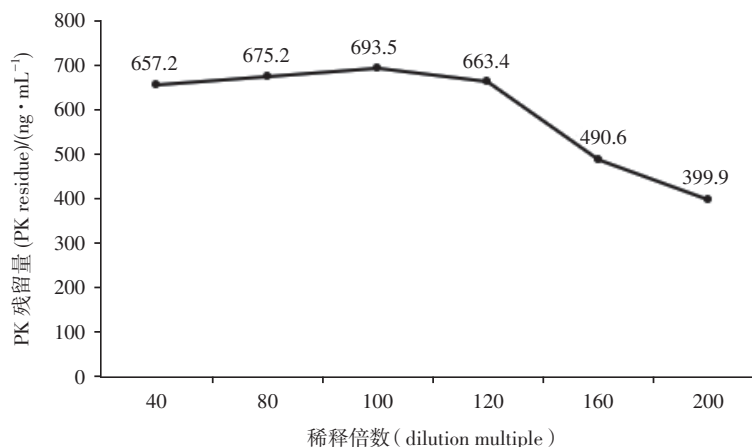


图 1 不同稀释倍数 PK 残留量检测结果变化趋势

Fig. 1 The trend of changes in detection results of PK residues at different dilution multiples

2.4.2 回收率 确定在 10%IVIG 成品各成分存在的条件下,该方法能准确地测定 F XII、PK 残留量,测定结果的回收率应在 70.0%~125.0%, RSD 应 \leq 15%。

取 10%IVIG 成品,根据稀释线性测定的 F XII 残留量,配制 F XII 标准品加入量为其 F XII 残留量 100% 的加标供试品 6 份,将 10%IVIG 样品和加标供试品按方法测定 F XII 含量,计算加标回收率以及 RSD。10%IVIG 成品中 F XII 残留量测定结果为 $72.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6 份加标供试品 F XII 添加回收率在 98.5%~118.7%, RSD 为 3.6%,符合判定标准, F XII 检测方法准确度良好。

取 10%IVIG 成品,将其用稀释液稀释至线性范围内作为供试品溶液,同时用稀释后的 10%IVIG 配制 PK 标准品加入量为其稀释后 PK 含量 100% 的加标供试品 6 份,按本法测定 PK 含量,计算加标回收率以及 RSD。用稀释 40 倍的 10%IVIG 配制 PK 标准品添加质量浓度为 $17.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的加标供试品 6 份,10%IVIG 成品稀释 40 倍 PK 含量测定结果为 $18.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 6 份加标供试品 PK 添加回收率在 91.4%~108.6%, RSD 为 2.7%,符合判定标准, PK 检测方法准确度良好。

2.4.3 重复性 取 1 批 10%IVIG 成品,用样品稀释液稀释成品至 3 种不同浓度、每种浓度制备 3 个平行作为供试品溶液,按 F XII、PK 检测方法分别测定其中的 F XII、PK 残留量,测定结果的 RSD 应 \leq 15%。

F XII、PK 检测方法,重复性试验结果的相对标准偏差用 RSD_1 表示;不同实验人员开展重复性试验结果的相对标准偏差用 RSD_2 表示;2 次重复性试验结果核算的相对标准偏差用 RSD 表示,该 $\text{RSD} \leq 15\%$ 则表明该方法的中间精密度符合要求。分别为 8.3%、7.7%,符合接受标准, F XII、PK 检测方法重复性良好。

2.4.4 中间精密度 由不同实验人员在不同时间进行重复性试验,测定结果的 RSD_2 应 \leq 15%;结合重复性测定结果计算 RSD 应 \leq 15%。F XII、PK 检测方法中间精密度,测定结果的 RSD_2 分别为 5.8%、5.6%,结合该检测方法重复性测定结果计算 RSD 分别为 7.0%、9.2%,符合接受标准, F XII、PK 检测方法中间精密度均良好。

2.4.5 定量限 2020 年版《中国药典》四部通则 9101 分析方法验证指导原则中定量限系指试样中被测物能被定量测定的最低量,参照直观法用已知浓度的被测物,考察方法能定量测定 F XII、PK 最低浓度作为定量限,并对其准确度、精密度进行验证,回收率在 70.0%~125.0%, RSD 应 \leq 15%。

结果如表 3 所示, F XII 检测方法的定量限为 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, PK 检测方法的定量限为 $1.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。对 F XII、PK 检测方法的定量限准确度和精密度进行验证,回收率分别在 98.3%~119.6%、80.4%~120.8%, RSD 分别为 5.2%、12%,符合接受标准。

表 3 F XII、PK 检测方法定量限验证结果

Tab. 3 Limit of quantification verification results of F XII、PK detection methods

检测方法 (detection method)	实验项目 (experimental project)	标准品浓度 (standard concentration)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	标准品测定平均值 (average value of standard determination)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)($n=6$)	回收率 (recovery)/ %($n=6$)	$\text{RSD}_1/\%$ ($n=6$)	回收率 平均值 (average recovery)/ %($n=12$)	$\text{RSD}_2/\%$ ($n=12$)
F XII	重复性(repeatability)	1.00	1.13	105.7~119.6	4.9	110.9	5.2
	中间精密度(intermediate precision)		1.09	98.3~113.7	5.0		
PK	重复性(repeatability)	1.25	1.38	96.8~120.8	8.8	101.7	12
	中间精密度(intermediate precision)		1.16	80.4~99.0	7.9		

2.4.6 线性与范围 用样品稀释液将复溶后的 F XII 标准品溶液稀释成质量浓度为 100.0、50.0、25.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准品溶液,作标准曲线。结果如图 2 所示, F XII 标准品质量浓度在 0~100.0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

范围内,与吸收度呈线性关系,回归方程为 $Y = (5.6269 - 0.03037) / [1 + (X/56.91634)^{-1.12901}] + 0.03037$ $r = 0.9999$ 符合接受标准($r \geq 0.99$)。

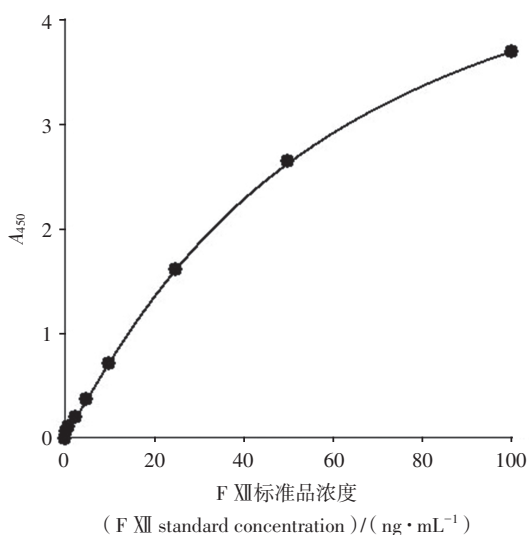


图2 F XII标准曲线

Fig. 2 Four-parameter fitting curve of F XII standard

用样品稀释液将复溶后的PK标准品溶液稀释成质量浓度为80.0、40.0、20.0、10.0、5.0、2.5、1.25、0 ng · mL⁻¹的系列标准品溶液,作标准曲线。PK标准品质量浓度在0~80.0 ng · mL⁻¹范围内,与吸收度呈线性关系,结果如图3所示,回归方程为 $Y = (3.30035 - 0.01066) / [1 + (X/32.90362)^{-1.42921}] + 0.01066$ $r = 0.9999$

符合接受标准 ($r \geq 0.99$)。

2.4.7 耐用性 考察不同的孵育时间对检测结果的影响,结果见表4、5。该检测方法下,3组不同孵育时间检测结果的RSD分别为6.3%、8.3%,精密度符合要求,说明F XII、PK检测方法孵育时间分别控制在28~32 min、规定时间 ± 5 min内对检测结果无显著影响。

考察试剂盒开启效期验证:分别开启F XII ELISA试剂盒、人前激肽释放酶ELISA试剂盒,对10%IVIG

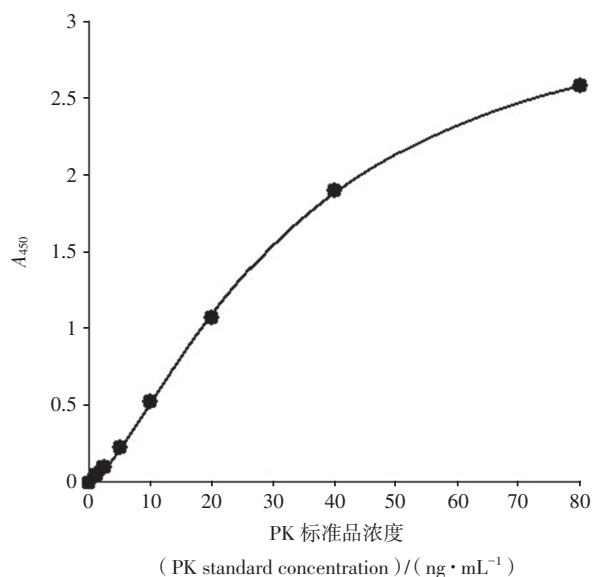


图3 PK标准曲线

Fig. 3 Four-parameter fitting curve of PK standard

成品中F XII、PK残留量进行检测后,将剩余试剂按相应要求保存15、30 d后对同1批次10%IVIG成品中F XII、PK残留量进行检测。结果见表4、5。该试剂盒分别开启15、30 d前后检测结果的RSD分别为4.0%、9.3%,精密度符合要求,说明人凝血因子XII ELISA试剂盒、人前激肽释放酶ELISA试剂盒开启后相关试剂按要求分别保存15、30 d检测10%IVIG中F XII、PK残留量无显著影响。

考察不同批号试剂盒检测结果差异,结果见表4、5,不同批号人凝血因子XII ELISA试剂盒F XII检测结果的RSD为5.3%,人前激肽释放酶ELISA试剂盒PK检测结果的RSD为9.7%,精密度符合要求,说明不同批号试剂盒分别检测10%IVIG中F XII、PK残留量无显著性差异。

表4 F XII检测方法耐用性验证结果

Tab. 4 Robustness validation results of F XII detection method

验证项目 (validation items)	F XII残留量检测平均值 (average F XII residue test value)/(ng · mL ⁻¹)	RSD ₁ /% (n=3)	RSD ₂ /% (n=9)
孵育时间 (incubation time)/min			
28	88.0	1.9	6.3
30	82.7	1.2	
32	95.4	1.4	
开启效期 (open-use period)			
第0天(day 0)	91.6	4.8	4.0
第15天(day 15)	87.6	1.5	
批号 (different lot)			
批号1(lot 1)	82.7	1.4	5.3
批号2(lot 2)	88.8	5.5	

表 5 PK 检测方法耐用性验证结果

Tab. 5 Robustness validation results of PK detection method

验证项目 (validation items)		PK 残留量检测平均值 (average PK residue test value)/(ng · mL ⁻¹)	RSD ₁ /% (n=3)	RSD ₂ /% (n=9)
孵育时间 (incubation time)	规定时间 -5 min (5 min less than the set time)	736.0	2.0	8.3
	规定时间 (set time)	669.6	12.4	
	规定时间 +5 min (5 min longer than the set time)	748.0	5.4	
开启效期 (open-use period)	第 0 天 (day 0)	669.6	12.4	9.3
	第 30 天 (day 30)	740.4	0.81	
不同批号 (different lot)	批号 1 (lot 1)	669.6	12.4	9.7
	批号 2 (lot 2)	726.9	6.1	

2.5 应用

采用经验证的酶联免疫吸附法检测 10%IVIG 制备工艺中间品、成品中 F XII、PK 残留量。结果见表 6。组分 I + II + III 溶解液中 F XII、PK 含量均能检出,经辛酸反应后单步去除率分别为 44.3%、86.1%;经第 1 步超滤后, F XII、PK 含量分别减少约 99.8%、98.1%。第 1 步超滤后将料液等倍稀释

F XII、PK 含量相应降低;经 2 步阴离子层析后 F XII 含量降低约 23.6%, PK 含量降低约 43.7%。层析结束后, F XII、PK 含量随料液超滤浓缩而增加,但均维持较低水平,到成品阶段, F XII、PK 残留量总体去除率达 96% 以上。综上, 10%IVIG 制备工艺过程能有效去除 F XII、PK 残留量,降低了产品致血栓的风险。

表 6 10%IVIG 生产工艺过程中间品 F XII、PK 含量 / 残留量检测结果

Tab. 6 Detection results of F XII and PK residual levels in intermediate products during the production process of 10%IVIG

工艺步骤 (process steps)	F XII 含量 / 残留量 (F XII content)		PK 含量 / 残留量 (PK content)	
	测定值 (measured)/(ng · mL ⁻¹)	去除率 (removal rate)/%	测定值 (measured)/(ng · mL ⁻¹)	去除率 (removal rate)/%
	组分 I + II + III 溶解液 (component I + II + III dissolution solution)	6 834.9	/	25 177.1
辛酸沉淀后 (caprylic acid precipitates)	3 810.8	44.3	3 496.4	86.1
第 1 步超滤后 (after step 1 ultrafiltration)	31.6	99.8	263.8	98.1
第 1 步层析前 (before step 1 chromatography)	12.7	/	129.6	/
第 1 步层析后 (after step 1 chromatography)	11.4	/	66.6	/
第 2 步层析前 (before step 2 chromatography)	9.3	/	68.1	/
第 2 步层析后 (after step 2 chromatography)	9.7	23.6	73.0	43.7
第 2 步超滤后 (after step 2 ultrafiltration)	31.5	/	183.0	/
成品 (final product)	114.5	98.3	814.3	96.8

3 讨论

本文建立的 ELISA 法用以检测 10%IVIG 中 F XII、PK 残留量,并进行了方法的线性、准确度、重复性、中间精密度的定量限、线性与范围、耐用性验证,结果显示该检测方法灵敏度高,准确度、精密度的良好。

应用该方法对 10%IVIG 工艺过程中间品中的 F XII、PK 含量进行检测,结果显示辛酸反应、第 1 次超滤后 F XII、PK 含量显著降低,说明辛酸反应能够沉淀大部分杂蛋白并结合超滤工艺将其去除,2 步阴离子交换层析后 F XII、PK 含量均有降低,说明阴

离子交换层析能够去除 F XII、PK,与文献 [17-19] 报道的辛酸沉淀结合阴离子交换层析可有效去除血浆来源的杂质和促凝剂的结论一致。正常人血浆中的 F XII 平均含量约为 30 μg · mL⁻¹[20], PK 平均含量约为 50 μg · mL⁻¹[14], 检测公司生产的多批次成品中 F XII 残留量约为 0.06~0.15 μg · mL⁻¹, PK 含量约为 0.6~0.9 ng · mL⁻¹,均远低于正常人血浆中含量。同时本公司对 10%IVIG 多批次成品以及长期稳定性考察产品中激肽释放酶原激活剂 (PKA) 进行检测,结果均未检出,远低于 2020 年版《中国药典》(三部)[21] 静注人

免疫球蛋白(pH 4)PKA 应 $\leq 35 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的规定,说明本公司辛酸反应结合 2 步阴离子层析工艺能够很好地去掉 F XII、PK、PKA。结合本品已完成的 III 期临床安全性和有效性研究结果,未出现血栓栓塞不良事件,说明本品可能引起血栓栓塞事件的潜在风险很小。

综上,本文验证了 ELISA 法测定 10%IVIG 中 F XII、PK 残留量,该方法简便快捷,准确度高,精密度好,利用该方法检测工艺过程中间品中 F XII、PK 含量,结果准确可靠,能够满足实验室对 10%IVIG 中 F XII、PK 残留量测定的要求。

参考文献

- [1] HONG J, BANG SM, MUN YC, *et al.* Efficacy and safety of a new 10% intravenous immunoglobulin product in patients with primary immune thrombocytopenia (ITP) [J]. *J Korean Med Sci*, 2018, 33 (19): e142
- [2] 曹璟, 吴鹏, 王斌, 等. 静注人免疫球蛋白 (pH 4) 工艺优化后产品的稳定性 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 (11): 1319
CAO J, WU P, WANG B, *et al.* Stability of human immunoglobulin (pH 4) for intravenous injection after process optimization [J]. *Chin J Biol*, 2023, 36 (11): 1319
- [3] LOZANO-BLASCO J, MARTÍN-MATEOS MA, ALSINA L, *et al.* A 10% liquid immunoglobulin preparation for intravenous use (Privigen®) in paediatric patients with primary immunodeficiencies and hypersensitivity to IVIG [J]. *Allergol Immunopath*, 2014, 42 (2): 136
- [4] WASHBURN N, MECCARIELLO R, HU S, *et al.* High-resolution physicochemical characterization of different intravenous immunoglobulin products [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (7): e0181251
- [5] LIU XL, TREISTER R, LANG M, *et al.* IVIG for apparently autoimmune small-fiber polyneuropathy: first analysis of efficacy and safety [J]. *Ther Adv Neurol Disord*, 2018, 11: 1
- [6] AGGARWAL R, CHARLES-SCHOEMAN C, SCHESSL J, *et al.* Prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled phase III study evaluating efficacy and safety of octagam 10% in patients with dermatomyositis (“ProDERM Study”) [J]. *Medicine*, 2021, 100 (1): e23677
- [7] GUO Y, TIAN X, WANG X, *et al.* Adverse effects of immunoglobulin therapy [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1299
- [8] GERMISHUIZEN WA, GYURE DC, STUBBINGS D, *et al.* Quantifying the thrombogenic potential of human plasma-derived immunoglobulin products [J]. *Biologicals*, 2014, 42 (5): 260
- [9] MA LI, SUN PAN, LIN FZ, *et al.* *In vitro* evaluation of residual procoagulants in human intravenous immunoglobulins from 11 Chinese blood fractionation companies [J]. *Thromb Res*, 2013, 132 (3): 381
- [10] WILMOT HV, GRAY E. Enabling accurate measurement of activated factor XI (FXIa) in therapeutic immunoglobulin products [J]. *Vox Sang*, 2021, 116 (6): 656
- [11] European Medicines Agency. Questions and Answers on the Recommendation to Lift the Suspension of Octagam (Human Normal Immunoglobulin 5% and 10%) [EB/OL]. [2024-04-08] https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/questions-and-answers-recommendation-lift-suspension-octagam-human-normal-immunoglobulin-5-and-10_en.pdf Art 31 Q-and-A
- [12] EP 8.0 [S]. 2012: 2423
- [13] RENNÉ T, SCHMAIER AH, NICKEL KF, *et al.* *In vivo* roles of factor XII [J]. *Blood*, 2012, 120 (22): 4296
- [14] BJÖRKQVIST J, JÄMSÄ A, RENNÉ T, *et al.* Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 110 (9): 399
- [15] 李慧慧, 徐鹏飞, 张杰, 等. 血浆前激肽释放酶在血管疾病中的研究进展 [J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2021, 21 (3): 4028
LI HH, XU PF, ZHANG J, *et al.* Research advances on the plasma kallikrein in vascular disease [J]. *Mol Cardiol China*, 2021, 21 (3): 4028
- [16] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 480
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 480
- [17] 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 [J]. *Vox Sang*, 2006, 90 (2): 97
- [18] PARK DH, KANG GB, KANG DE, *et al.* A new manufacturing process to remove thrombogenic factors (II, VII, IX, X, and XI) from intravenous immunoglobulin gamma preparations [J]. *Biologicals*, 2017, 45: 1
- [19] KOMENDA M, STADLER D, MALINAS T, *et al.* Assessment of the ability of the Privigen® purification process to deplete thrombogenic factor XIa from plasma [J]. *Vox Sang*, 2014, 107 (1): 26
- [20] BACH J, ENDLER G, WINKELMANN BR, *et al.* Coagulation factor XII (FXII) activity, activated FXII, distribution of F XII C46T gene polymorphism and coronary risk [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, 6 (2): 291
- [21] 中华人民共和国药典 2020 年版. 三部 [S]. 2020: 270
ChP 2020. Vol III [S]. 2020: 270

(本文于 2024 年 4 月 19 日收到)