

阴离子交换层析结合低温乙醇法制备静脉注射人免疫球蛋白 及关键质量分析

周雁翔,朱晨,王上,詹骞,刘俊,彭焱,龚钦,纪德铭,邱璟,王霖慧,郭佳茹,胡勇,李策生
(国药集团武汉血液制品有限公司,武汉 430207)

[摘要] **目的:**层析结合低温乙醇法制备静脉注射人免疫球蛋白(IVIG),检测制备过程中杂质去除效果及层析对制品质量的影响。**方法:**本实验系用健康人血浆,采用低温乙醇蛋白分离法分离纯化得到的组分II(以下简称FII)沉淀作为原料,经过一步阴离子交换层析制备IVIG(pH 4),检测IVIG制品分子量大小分布、免疫球蛋白(Ig)A含量、IgG含量及IgG亚型分布、蛋白质二级结构,采用孔径为20 nm的纳滤膜过滤,对比分析低温乙醇蛋白分离法及联合阴离子交换纯化工艺制备的IVIG(pH4)制品的IgA,IgM去除效果及纳米膜的通量。**结果:**FII沉淀经5倍注射用水溶解,搅拌2 h后的IgG溶出率较高,阴离子交换层析结合低温乙醇法制备的IVIG(pH 4)制品中IgA含量控制在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内,提高了纳米膜(20 nm)病毒灭活的通量,与市售产品IgG亚型分布、二级结构一致,分子大小分布符合《中华人民共和国药典》规定。**结论:**阴离子交换层析可以降低产品中IgA,IgM等杂质的残留量,提高了纳米膜(20 nm)的通透性,且对IVIG制品关键质量无显著影响。

[关键词] 免疫球蛋白A;静脉注射人免疫球蛋白;阴离子交换层析;分子量大小分布

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)19-1987-06

Preparation and quality analysis of intravenous human immunoglobulin by chromatography combined with low-temperature ethanol

ZHOU Yan-xiang, ZHU Chen, WANG Shang, ZHAN Qian, LIU Jun, PENG Yan, GONG Qin, JI De-ming,
QIU Jing, WANG Lin-hui, GUO Jia-ru, HU Yong, LI Ce-sheng
(Sinopharm Wuhan Plasma-derived Biotherapies Co., Ltd., Wuhan 430207, China)

[Abstract] **Objective:** The study aims to prepare human immunoglobulin by chromatography combined with low-temperature ethanol, detect the effect of impurities removal in the preparation process and the effect of chromatography on product quality. **Methods:** Human immunoglobulin (pH 4) was prepared by one-step anion-exchange chromatography from FII precipitated from healthy human plasma. It was further separated and purified by low-temperature ethanol-protein separation. The distribution of molecular size, IgA content, IgG content and IgG subclasses distribution, protein secondary structure of IgG were determined and analyzed. The effect of IgA and IgM removal of intravenous human immunoglobulin (pH 4) prepared by low-temperature ethanol protein separation and anion exchange purification was compared. **Results:** The precipitation of component II was dissolved by 5-fold volume of water for injection, and the dissolution rate of IgG was higher after stirring for 2 h. The content of IgA in intravenous human immunoglobulin (pH 4) prepared by anion exchange chromatography combined with low-temperature ethanol was controlled below $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, consistent with the distribution of molecular size and IgG

[作者简介] 周雁翔,女,副研究员,主要从事血液制品研发。E-mail:1403119938@qq.com。

[通讯作者] 胡勇,男,副研究员,主要从事血液制品研发。E-mail:huyong1@sinopharm.com。李策生,男,研究员,主要从事血液制品研发制造。E-mail:licesheng@sinopharm.com。

isoforms of commercial products. The virus inactivation flux of nanofilms (20 nm) was increased. **Conclusion:** Anion exchange chromatography can reduce the residual amount of IgA, IgM and other impurities in IVIG products, improve the permeability of nano-film (20 nm), and has no significant effect on the key quality of IVIG products.

[Key words] immunoglobulin A; intravenous human immunoglobulin; anion exchange chromatography; distribution of molecular size

静脉注射人免疫球蛋白(IVIG)用于治疗原发性和继发性抗体缺陷症以及自身免疫性疾病^[1-3],对细菌感染、病毒感染、血液系统疾病、川崎病等疾病的疗效明显^[3]。IVIG 制品主要成分为免疫球蛋白(Ig)G,IgG 亚类含量与正常人血清 IgG 亚类分布相近^[4],IgG 亚类包括 IgG1,IgG2,IgG3 和 IgG4。目前国内血液制品企业的 IVIG 制备工艺以低温乙醇蛋白分离法为主,国外逐渐实现了将低温乙醇蛋白分离法与柱层析工艺相结合的制备工艺,层析纯化工艺在 IVIG 生产中的应用,提高了制品纯度^[5]。

本文旨在通过离子交换层析降低杂质的含量,尤其是 IgA,IgM 等大分子的残留量,提高 IVIG 的质量指标,增加纳米(20 nm)过滤的通量,保证制品病毒灭活的安全性。

材料与方法

1 材料与仪器

1.1 样品 血浆组分 II(以下简称 FII)沉淀由国药集团武汉血液制品有限公司提供。

1.2 主要试剂及仪器 层析凝胶介质(纳微公司,批号:UniGel-80DEAE);散射比浊(nephelometry)检测试剂及仪器均购自 SIEMENS 公司;IgA 酶联免疫检测试剂盒(Zepto metrix Corporation,批号:326011);SpectraMax190 型多功能酶标仪(Molecular Devices 公司);UV2550 型紫外分光光度计(岛津公司);TSKgel G3000SW 型色谱柱(60 cm × 7.5 mm,10 μm,Agilent 公司)。

2 方法

本文中 FII 沉淀是由武汉血液制品有限公司生产科室提供。低温乙醇法是以新鲜血浆经过冷沉淀分离、低温乙醇分离法分离出 FII 沉淀,本文以 FII 沉淀为原料经过溶解过滤、调节进行离子交换层析收集富含 IgG 的样品,收集的样品经过超滤浓缩、配制、低 pH 孵放、纳滤制备得到 IVIG 制品(见图 1)。通过不同的层析条件对 IVIG 制品的影响及 IgA 的去除率进行研究,并初步探讨阴离子交换层析处理样品后纳米膜(20 nm)过滤的可行性。

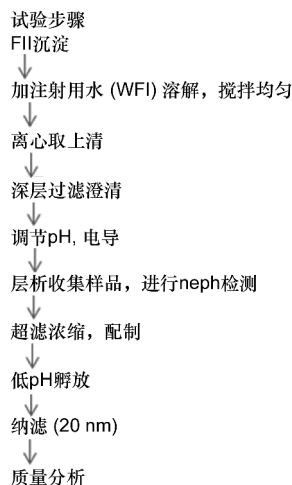


图 1 纯化研究流程图

2.1 样品纯化 以低温乙醇法制备的 FII 沉淀为原料,经过阴离子交换层析、超滤浓缩、配制、低 pH 孵放制备得到本实验样品。通过摸索样品的溶解方式、上样 pH、上样电导确定阴离子交换层析的纯化条件。FII 沉淀用注射用水(WFI)溶解,分别采用 3,4,5,6 倍的 WFI 溶解,搅拌 1,2 h,分析不同溶解条件下 IgG 的溶出率,溶解后的样品分别调节 pH 在 4~5,5~6,6~7 之间,电导分别在 $>5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 和 $1 \sim 5 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 范围内。检测纯化制备得到的制品目标蛋白的回收率(IgG 步骤回收率 = 层析后收集的样品中 IgG 蛋白含量/上样样品中 IgG 蛋白含量。层析步骤 IgG 步骤回收率 $>97\%$ 作为内控指标)、IgA 去除率、制品的分子大小分布、制品的二级结构。

2.2 纳米(20 nm)过滤测试 层析后制备的样品进行纳米(20 nm)过滤,测试纳滤后样品的通量,计算 4 h 内单位面积纳米膜过滤总量($\text{L} \cdot \text{M}^{-1}$)。

3 检测项目及测定方法

3.1 免疫比浊法 散射比浊法进行了 IgG 检测方法学验证,检测误差在 $(\pm 20)\%$ 。过程样品控制采用散射比浊法进行测定,散射比浊法检测 IgG,IgA,IgM 及 IgG 亚类等含量已广泛应用于人血浆蛋白质含量检测^[6]。

3.2 ELISA 法 成品 IgA 含量采用 ELISA 法,ELISA

法是《中华人民共和国药典》三部通则 3428 通用方法^[4]。

3.3 双缩脲法^[4]测定 原液及半成品蛋白含量采用双缩脲方法进行检测。

3.4 分子大小分布 采用分子排阻高效液相色谱法进行测定。色谱柱型号为 TSKgel G3000SW, 色谱柱粒径为 10 μm , 具体操作过程和结果按照《中华人民共和国药典》三部通则 3122 进行^[4]。

3.5 二级结构分析 圆二色谱分析 IgG 的二级结构, 并与低温乙醇法蛋白分离工艺制备的 IgG 进行图像内容检索技术 (QBIC) 一致性分析。其中参比品 (reference) 是本公司血液制剂室生产的样品, 20220800116-s, 20220800130-s, 20220800131-s 均为本实验室制备的样品。用 QBIC 软件对样品和参比品 (reference) 进行一致性分析。

结 果

1 层析条件优化及关键指标评价杂质去除效果

1.1 FII 沉淀溶解方式 表 1 是不同溶解倍数搅

拌不同时间溶出的 IgG 量。结果显示 5 倍注射用水 (WFI) 溶解搅拌 2 h 溶出的 IgG 量较高。

表 1 FII 沉淀溶解方式

| 样品 编号 | FII 溶解 方式 | 搅拌时间 /h | IgG 溶出 /mg·g ⁻¹ FII | IgA 溶出 /mg·g ⁻¹ FII |
|----------|--------------|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| SF1 | 5X WFI | 2 | 215.73 | 2.68 |
| SF2 | 4X WFI | 2 | 196.5 | 2.62 |
| SF3 | 3X WFI | 1 | 179.3 | 2.2 |
| SF4 | 5X WFI | 1 | 84.56 | 1.12 |
| SF5 | 6X WFI | 1 | 170.44 | 1.12 |

1.2 上样电导及保留时间的测试 FII 沉淀经过溶解后调节 pH 在 5 ~ 7 之间, 上样于阴离子交换层析。结果显示上样电导 > 5 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时上样载量低于 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 调整样品电导在 1 ~ 5 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 范围内, 提高了样品的上样载量, 同时增加了 IgG 的步骤回收率, 见表 2。

表 2 上样电导及保留时间的测试

| 原料批号 | 上样电导/ $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ | 保留时间/min | 上样载量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | IgG 回收率/% | IgA 含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|------|--------------------------------------|----------|------------------------------------|-----------|--------------------------------------|
| Sy1 | > 5 | 10 | 0.53 | 90.16 | 0.001 48 |
| Sy3 | 1 ~ 5 | 10 | 10 | 99 | 0.001 02 |

1.3 上样 pH 测试

不同的 pH 上样于离子交换层析柱, 见表 3, 结果表明上样样品的 pH 对 IgG 的回收率没有影响。

表 3 上样样品 pH 对 IgG 回收率的影响

| 样品编号 | 上样 pH | 上样载量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | IgG 步骤回收率/% |
|------|-------|------------------------------------|-------------|
| Sp1 | 4 ~ 5 | 10 ~ 30 | 106.02 |
| Sp2 | 5 ~ 6 | 10 ~ 30 | 99.76 |
| Sp3 | 6 ~ 7 | 10 ~ 30 | 104.87 |

1.4 上样载量的测试 样品经过处理后澄清过滤, 调节样品的电导不高于 5 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, 上样于阴离子交换树脂, 保留时间为 10 min, 在上样过程中收集流穿液即时样, 每隔 10 min 收集 1 个样品, 采用免疫比浊法进行 IgA 蛋白含量检测, 如果 IgA 含量在检测下限, 继续上样, 如果 IgA 含量高于检测下限, 停止上样, 并洗脱吸附在层析柱上的 IgA 进行蛋白含量分析。分析不同上样载量条件下收集的样品中 IgG, IgA 的回收率, 见表 4。结果显示, 在上样载量

为 10 ~ 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, IgG 步骤回收率 > 99%, 在载量 < 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 > 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, IgG 步骤回收率均 < 97%, 因此初步得出结论, 样品上样于阴离子交换树脂载量为 10 ~ 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表 4 上样载量对 IgG 回收率的影响

| 原料批号 | 上样载量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | IgG 回收率/% | IgA 含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|------|------------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| Sy1 | 0.53 | 90.16 | 0.001 48 |
| Sy2 | 6.93 | 96.44 | 0.192 |
| Sy3 | 10 | 99 | 0.001 02 |
| Sy4 | 12.8 | 99.76 | < 0.000 285 |
| Sy5 | 13.3 | 106.02 | < 0.285 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Sy6 | 14.5 | 99.24 | < 0.285 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Sy7 | 24.5 | 100.91 | < 0.285 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |
| Sy8 | 26.3 | 99.73 | 0.005 46 |
| Sy9 | 30.2 | 90.16 | < 0.285 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ |

1.5 超滤浓缩后制品的 IgA, IgM 含量 按照阴离子交换优化后的条件, FII 沉淀经过溶解经阴离子交换层析后进行超滤浓缩, 重复 3 次收集的样品分别

为 S1, S2, S3, 并用免疫比浊法检测 IgG, IgA, IgM 的含量, 结果显示加一步阴离子交换层析后可以将 IgA 的含量降至 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内, IgM 含量在检测下限, 见表 5。

表 5 IgA, IgM 含量检测

| 批号 | IgG/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | IgA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | IgM/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|----|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| S1 | 56.3 | 0.031 | <0.000 157 |
| S2 | 62.9 | 0.029 | <0.000 157 |
| S3 | 55.8 | 0.033 | <0.000 157 |

2 探讨纳米膜(20 nm)过滤

目前国内 IgG 纳米膜多数采用的是 50 nm 过滤, IgG 多聚体及 IgA/IgM 大分子蛋白的含量均会影响膜包的通量。比较加层析前后样品纳米过滤的通量, 见表 6。

表 6 纳米膜(20 nm)过滤通量测试

| 样品编号 | IgG/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | 通量/ $\text{L}\cdot\text{M}^{-1}$ | 备注 |
|------|-----------------------------------|----------------------------------|------|
| Sn1 | 52.3 | 9.2 | 未加层析 |
| Sn2 | 55.5 | 20.4 | 层析处理 |

表 7 IgG 亚类及 IgA, IgM 含量检测

| 批号 | 含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (%) | | | | | |
|---------|--------------------------------------|-------------|------------|------------|------------|----------|
| | IgG1 | IgG2 | IgG3 | IgG4 | IgA | IgM |
| SA | 36.7(60.61) | 20.6(34.02) | 1.72(2.84) | 1.53(2.53) | <0.000 285 | 0.006 65 |
| 市售 IVIG | 39.2(65.92) | 17.5(29.43) | 1.45(2.44) | 1.32(2.22) | >0.2 | 0.030 4 |

5 杂质分析

免疫比浊法检测成品中蛋白含量, 与市售 IgG 进行比较。结果显示阴离子交换结合低温乙醇法制

结果显示经过层析处理后 IgG 20 nm 过滤通量相比乙醇工艺制备的 IgG 20 nm 通量明显提高。

3 二级结构检测

圆二色谱在远紫外区的扫描图谱反应的是蛋白质肽键的排布信息, 计算所得的是蛋白质二级结构比例, 即螺旋(helix)、折叠(antiparallel + parallel)、转角(beta-turn)和不规则卷曲的比例。通过圆二色谱详细比对, 经过阴离子交换层析后的样品和市售人免疫球蛋白(pH 4)蛋白质二级结构图谱高度拟合, 表明阴离子交换层析制备对 IgG 的二级结构无明显影响, 结果一致。经 QBIC 软件计算分析, 供试品与参比品在远紫外区的拟合值为 0.999 58, 0.999 83, 0.999 59。

4 成品质量比对

阴离子交换层析对 IgG 亚类分布的影响对经过阴离子交换层析后收集的 IgG 成品 IgG 亚类进行了分析, 并检测 IgA, IgM 的含量, 通过比较, 阴离子交换结合低温乙醇法收集的样品与已上市 IgG 产品的亚类分布高度类似, 并且大大降低了 IgA 和 IgM 的含量, 其中 IgA 和 IgM 采用 ELISA 方法检测, 见表 7。

备的 IVIG 制品中白蛋白、IgA、转铁蛋白、IgM 的含量明显低于低温乙醇法制备的 IVIG 制品的含量, 见表 8。

表 8 免疫比浊法检测

| 批号 | 含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | | | |
|---------|----------------------------------|---------------|------------|-----------|------------------------|-----------------------|-------------|
| | 免疫球蛋白 A (IgA) | 免疫球蛋白 M (IgM) | 转铁蛋白 (TRF) | 白蛋白 (ALB) | α 1-抗胰蛋白酶 (AAT) | α 2 巨球蛋白 (A2M) | 结合珠蛋白 (HPT) |
| SA1 | 0.031 | <0.000 157 | 0.005 8 | 0.032 5 | <0.045 6 | 0.003 37 | <0.076 9 |
| SA3 | 0.029 3 | <0.000 157 | 0.005 1 | 0.031 6 | <0.045 6 | 0.002 86 | <0.076 9 |
| SA4 | 0.033 | <0.000 157 | 0.005 8 | 0.032 2 | <0.045 6 | 0.002 79 | <0.076 9 |
| 市售 IVIG | >0.2 | 0.001 65 | 0.033 5 | 0.404 | <0.046 6 | <0.002 34 | <0.076 9 |

| 批号 | 含量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | | | | | | |
|---------|----------------------------------|------------|-------------|---------------|---------------|--------------|-------------------|
| | α 1-酸性糖蛋白 (AAG) | 铜蓝蛋白 (CER) | 纤维蛋白原 (FIB) | 凝血酶 III (AT3) | 纤维蛋白溶酶原 (PLS) | 纤维连接蛋白 (FNC) | C1 酯酶抑制剂 (C1-INH) |
| SA1 | <0.049 3 | <0.024 4 | <0.141 | <0.030 8 | <0.0121 | <0.021 6 | <0.024 3 |
| SA3 | <0.049 3 | <0.024 4 | <0.141 | <0.030 8 | <0.012 1 | <0.024 3 | <0.024 3 |
| SA4 | <0.049 3 | <0.024 4 | <0.141 | <0.030 8 | <0.012 1 | <0.024 3 | <0.024 3 |
| 市售 IVIG | <0.049 3 | <0.022 6 | <0.133 | 0.030 8 | <0.011 5 | <0.019 8 | <0.03 |

6 分子大小分布

分子大小分布结果显示 IVIG 制品单加双为

99.84%,符合《中华人民共和国药典》2020年版规定^[4] IVIG 单加双含量 $\geq 95\%$,见图2和表9。

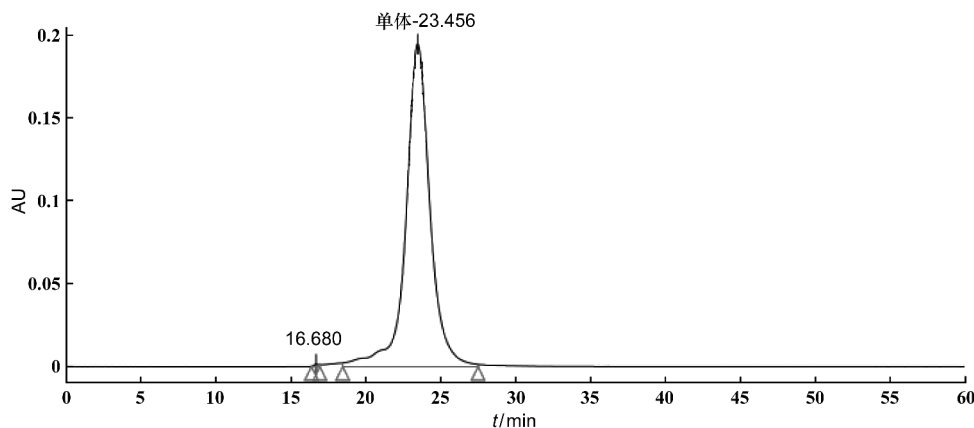


图2 分子大小分布色谱图

表9 峰结果

| 名称 | 保留时间 /min | 峰面积 /mV·s ⁻¹ | % 面积 | 分离度 | 对称 因子 |
|-----|--------------|----------------------------|-------|-------|----------|
| 其他峰 | 16.68 | 35 681 | 0.16 | — | 0.884 |
| 单体 | 23.456 | 21 882 569 | 99.84 | 4.438 | 1.06 |

讨 论

国内有厂家开展了低温乙醇蛋白分离法联合阴离子交换纯化工艺制备 IVIG 制品中 IgA 含量低于 $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,而低温乙醇蛋白分离法制备制品中 IgA 平均含量达到 $481 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[5]。

IgA 类分子等电点位于 4.7~6.4 之间,峰值为 5.6^[7-8],利用离子交换的原理可以有效去除 IgA,同时也降低了 IgM 的含量。IVIG 制品应尽可能不含 IgA 成分,当选择性(先天性)IgA 缺乏症患者输注了含有 IgA 的人免疫球蛋白制品后,体内会产生抗-IgA 抗体,当再次输注 IgA 含量过高的人免疫球蛋白后,可能导致严重的过敏反应,甚至危及生命。该缺陷的发现率平均约为 1/700。欧洲药典已规定 IgG 制品必须标明 IgA 含量^[9],故缺乏 IgA 的患者应选择 IgA 含量少的 IgG。目前我国由于 IgA 缺乏的患者较少,各企业内部自己规定了限值,且《中华人民共和国药典》2020年版已经收载 IgA 检查项^[8]。国外厂家的静丙中 IgA 残留量基本控制在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内^[10],其中 Grifols 公司可以将 IgA 残留量控制在 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内,CSL 公司将 IgA 残

留量控制在 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内。国内厂家采用了层析工艺可以将 IgA 残留量控制在 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内,没有层析工艺的企业 IgA 残留量 $> 300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本文中 IgA 含量检测表明离子交换层析结合低温乙醇工艺可以有效降低制品中 IgA 的残留量,可以将 IVIG 制品中的 IgA 含量控制在 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以内,提高了 IVIG 制品对 IgA 缺乏患者的安全性。

电导会影响蛋白的稳定性^[11],影响离子交换层析的吸附能力,本实验结果表明,当样品的电导值 $< 5 \text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 时,阴离子树脂可以有效地吸附 IgA,而且不影响 IgG 的蛋白回收率。

IVIG 中 IgG1 和 IgG2 这 2 种亚型的总量约占总蛋白量的 90%^[12],这 2 种亚型的 CH2 区最不稳定,容易发生 β 折叠^[13-14]。本文中用免疫比浊法检测 IgG 亚类的含量,并与市售产品进行对比,结果显示阴离子交换层析结合低温乙醇法制备的 IgG 亚类比例与市售 IgG 相当。我们还分析了制品 IgG 的二级结构,拟合图显示我们的制品与市售 IgG 结构一致。

纳米膜过滤作为去除非脂包膜病毒的有效方法已被广泛应用于血液制品中。纳米膜过滤与常规过滤不同,膜的平均孔径为纳米级别,是一种物理去除病毒的方法^[15],不会引起蛋白结构改变。目前国内 IVIG 纳米膜多数采用的是 50 nm 过滤,采用孔径为 20 nm 的纳滤膜过滤是血液制品的发展趋势^[16],IgG 多聚体及 IgA, IgM 大分子蛋白的含量均会影响膜包的通量。目前国外大多企业制备 IgG 已开始使用 20 nm 孔径进行纳米过滤,生产工艺为全层析或层

析结合低温乙醇法,国内也陆续在开展此方面的研究。本文中加了层析步骤后,大大降低了IgA的含量,提高了纳滤膜的通量,我们将开展放大实验验证此结论。

[参 考 文 献]

- [1] ABRAHAMIAN F, AGRAWAL S, GUPTA S. Immunological and clinical profile of adult patients with selective immunoglobulin subclass deficiency: response to intravenous immunoglobulin therapy[J]. *Clin Exp Immunol*, 2010, 159(3): 344-350.
- [2] OLINDER-NIELSEN AM, GRANERT C, FORSBERG P, et al. Immunoglobulin prophylaxis in 350 adults with IgG subclass deficiency and recurrent respiratory tract infections: a long-term follow-up[J]. *Scand J Infect Dis*, 2007, 39(1): 44-50.
- [3] ORANGE JS, HOSSNY EM, WEILER CR, et al. Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, 117(4 Suppl): S525-S553.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020年版. 三部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [5] 张学成, 马小伟, 安文琪, 等. 阴离子交换层析处理对静注人免疫球蛋白(pH 4)制品的影响[J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32(9): 1036-1042.
- [6] SITCHARUNSI R, ANANWORANICH J, VILAIYUK S, et al. Nephelometry determined serum immunoglobulin isotypes in healthy Thai children aged 2-15 years[J]. *Microbiol Immunol*, 2012, 56(2): 117-122.
- [7] HARADA T, HOBBY P, COURTEAU M, et al. Charge distribution of plasma IgA in IgA nephropathy[J]. *Clin Exp Immunol*, 1989, 77(2): 211-214.
- [8] JIN Y, LUO GA, OKA T, et al. Estimation of isoelectric points of human plasma proteins employing capillary isoelectric focusing and peptide isoelectric point markers[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(19): 3385-3391.
- [9] Council of European. European Pharmacopeia 7.0: Human normal immunoglobulin for intravenous administration[S]. 2008.
- [10] Octapharma. Summary of product characteristics, human normal immunoglobulin for intravenous administration, OCTAGAM 5%[S]. 2009.
- [11] GALEOTTI C, KAVERI SV, BAYRY J. IVIG-mediated effector functions in autoimmune and inflammatory diseases[J]. *Int Immunol*, 2017, 29(11): 491-498.
- [12] 鲁涛, 牟蕾, 刘波, 等. 新型静注人免疫球蛋白的制备及鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28(12): 1282-1284, 1293.
- [13] GARBER E, DEMAREST SJ. A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355(3): 751-757.
- [14] BOLLI R, WOODTLI K, BÄRTSCHI M, et al. L-Proline reduces IgG dimer content and enhances the stability of intravenous immunoglobulin (IVIG) solutions[J]. *Biologicals*, 2010, 38(1): 150-157.
- [15] 岳广智, 杨立宏, 徐宏山, 等. 应用纳米膜(DV20nm)过滤法去除人免疫球蛋白中指示病毒PPV的效果验证[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 2085-2088.
- [16] 卢杨利, 容新宗, 王焰, 等. 静注人免疫球蛋白新生产工艺病毒灭活/去除效果的验证及评估[J]. 中国生物制品学杂志, 2017, 30(12): 1331-1334, 1339.

编辑: 毕晓帆/接受日期: 2022-11-02