静注人免疫球蛋白中抗补体活性物质基础的探索性研究

柯兵兵[1]，程梦兰[1]，王媛媛[1]，倪　叩[1]，王　月[2*]

（1. 湖北省药品监督检验研究院，湖北省药品质量检测与控制工程技术研究中心，国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室，湖北武汉 430075；2. 国药集团武汉生物制药有限公司，湖北武汉 430207）

摘要：采用凝胶过滤色谱法分离多聚体、二聚体、单体成分，建立了 C1q 酶联免疫吸附试验（ELISA）法，并进行专属性、精密度及敏感性等方法学验证，测定和比较了不同批次产品中的抗补体活性物质。结果显示，当酶标板 C1q 包被浓度为 2 μg/mL、二抗稀释倍数为 3 万倍时，供试品在 1 ～ 50 000 μg/mL 时呈典型的 S 型结合曲线，线性区间为 10 ～ 400 μg/mL。该方法的专属性、敏感性良好，精密度试验 RSD（n=6）为 6.7%。多聚体与补体分子 C1q 的结合显著高于二聚体和多聚体。多聚体是本品抑制补体活性的物质基础，可采用 C1q ELISA 法直接比较不同产品中的抗补体活性物质高低。

关键词：静注人免疫球蛋白；多聚体；补体分子 C1q；抗补体活性；酶联免疫吸附试验

中图分类号：R927；R979.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)11-1550-06

引用：柯兵兵，程梦兰，王媛媛，等．静注人免疫球蛋白中抗补体活性物质基础的探索性研究［J］．中国医药工业杂志，2024, 55(11): 1550-1555．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.012

Exploratory Study on Anticomplementary Substances in Human Immunoglobulin for Intravenous Injection

KE Bingbing[1], CHENG Menglan[1], WANG Yuanyuan[1], NI Kou[1], WANG Yue[2*]

(*1. NMPA Key Lab. of Quality Control of Blood Products, Hubei Engineering Research Center for Drug Quality Control, Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075; 2. Sinopharm Wuhan Biopharmaceuticals Co., Ltd., Wuhan 430207*)

ABSTRACT: Polymers, dimers and monomers were separated by gel filtration chromatography, and the C1q enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was established. The specificity, precision and sensitivity of the method were verified, and the substance of anticomplementary activity in different batches of products were determined and compared. The results showed that when the coating concentration of C1q on the ELISA plate was 2 μg/mL and the dilution ratio of the secondary antibody was 30 000, the test sample exhibited a typical S-shaped binding curve in the concentration range of 1 – 50 000 μg/mL, with a linear interval of 10 – 400 μg/mL. The specificity and sensitivity of the method were good, with a precision test RSD (n=6) of 6.7% . The binding between the polymer and the complement molecule C1q was significantly higher than that of the dimer and polymer. Polymers were the substance for inhibiting complement activity in this product, and the C1q ELISA method could be used to directly compare the substance levels of anticomplementary activity in different products.

Key Words: human immunoglobulin for intravenous injection; polymers; complement molecule C1q; anticomplementary activity; enzyme-linked immunosorbent assay

静注人免疫球蛋白是一种具有多种生物学功能的血液制品，因应用广泛而备受临床重视[1—3]。抗补体活性是静注人免疫球蛋白的一项关键安全性指标，是质量控制中的重要关注点；它是指制剂中存

收稿日期：2024-04-05

基金项目：湖北省科技厅自然科学基金科研课题（2022CFB521）

作者简介：柯兵兵（1988—），男，硕士，从事血液制品质量控制研究。

通信作者：王　月（1984—），女，博士，医学生物高级工程师，从事血液制品质量控制研究。

E-mail：cmu89kwy@163.com

在的某种物质能与补体非特异性结合，进而干扰补体系统正常发挥功能。关于制剂中哪些理化参数或蛋白成分与抗补体活性相关，目前尚无定论[4—6]。

在前期研究中，本课题组发现静注人免疫球蛋白在体外并不能激活补体系统，相反，还存在一定程度抑制，提示存在抗补体活性[7]。制剂中的IgG多聚体是一种由多个IgG分子聚集而成的蛋白聚合物，具有多个Fc端补体结合位点，理论上能通过补体经典途径与补体分子C1q结合，进而干扰补体系统功能[8—12]。

本研究旨在探讨静注人免疫球蛋白产品中的多聚体是否通过结合补体系统经典激活途径的关键分子C1q，占据补体系统正常激活所需的活性位点，进而发挥抗补体活性；并进一步采用C1q进行ELISA法以比较不同企业产品中抗补体活性物质水平的高低，以期为本品的安全性控制研究提供参考。

1 仪器与试药

XP205型电子天平（瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司）；Xmark型多通道酶标仪（美国BioRad公司）；e2695型高效液相色谱仪（美国Waters公司）。

静注人免疫球蛋白（企业A、B、C、D、E；规格均为5%，批号如表1所示）；多聚体含量升高的静注人免疫球蛋白（置45 ℃恒温水浴中加热不同时间）；人血白蛋白（企业E，规格20%，批号202205028）；抗人T细胞猪免疫球蛋白（武汉中生毓晋生物医药有限责任公司，规格5%，批号202104001）；补体分子C1q（批号SLCM2704）、抗人IgG酶标二抗（批号0000181901）均购于美国Sigma公司；牛血清白蛋白[bovine serum albumin(BSA)，北京元亨圣马生物技术研究所，批号200108]；磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、氯化钠、碳酸钠、碳酸氢钠及异丙醇、Tween-20均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液（pH 9.6）：精密称取碳酸钠1.59 g、碳酸氢钠2.93 g，加蒸馏水适量使溶解，并定容至1 000 mL，即得。

磷酸盐吐温缓冲液[phosphate buffered saline with Tween-20(PBST)，pH 7.4]：精密称取磷酸二氢钾0.2 g、磷酸氢二钠2.9 g、氯化钠8 g、氯化钾0.2 g，加蒸馏水适量使溶解，并定容至1 000 mL，加Tween-20 0.5 mL即得。

封闭液（含5% BSA的PBST）：精密称取BSA 5 g，用PBST溶液100 mL使溶解，即得。

供试品稀释液（含1% BSA的PBST）：精密称取BSA 1 g，用PBST溶液100 mL使溶解，即得。

2.2 多聚体含量的测定

依据ChP 2020年版四部通则3122进行测定，用流动相将供试品稀释至质量浓度为12 mg/mL的溶液，进样量为20 μL，流动相为含1%异丙醇的pH 7.0、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液，取5家企业的静注人免疫球蛋白产品，记录色谱图，计算多聚体的峰面积百分比。结果如表1所示，企业A和企业C产品中的多聚体含量较低，而企业D产品中的多聚体含量最高，多聚体含量平均值排序为企业D> 企业B> 企业E> 企业A> 企业C。

表1 各企业样品的多聚体含量测定结果

Tab.1 Results of Polymer Content of Samples from Various Enterprises

生产企业	批号	多聚体含量/%	含量平均值/%
A	20230101	0.11	0.103
	20230307	0.14	
	20230308	0.11	
	20230409	0.05	
B	202302005	0.92	0.977
	202303010	1.08	
	202304011	0.93	
C	20230527	0.02	0.017
	20230738	0.01	
	20230739	0.02	
D	20230102V	1.08	1.207
	20230103V	1.21	
	20230104V	1.33	
E	202304008	0.71	0.828
	202304009	0.86	
	202304010	1.16	
	202305011	0.76	
	202305012	0.98	

2.3 蛋白组分分离及蛋白含量测定

取静注人免疫球蛋白样品，照“**2.2**”项下方法测定，分别收集多聚体峰、二聚体峰及单体峰，重

复 20 次。合并上述所有色谱峰蛋白成分，并用超滤管浓缩，备用。依据 ChP 2020 四部通则 0731 第二法测定上述样品中蛋白组分的浓度。

2.4 C1q-ELISA 试验

用碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液（pH 9.6）将补体分子 C1q 稀释成终质量浓度为 2 μg/mL 的溶液，每孔 100 μL 包被酶标板，4 ℃包被过夜。弃去包被液，用 PBST 洗涤 5 次，每孔加入封闭液 200 μL，4 ℃封闭 2 h。弃去封闭液，用 PBST 洗涤 5 次，每孔加入供试品溶液（用供试品稀释液将样品稀释至质量浓度为 50 μg/mL）100 μL，室温下孵育 1 h。弃去供试品溶液，用 PBST 洗涤 5 次，每孔加入照 1 ∶ 30 000 体积比稀释的抗人 IgG 酶标二抗溶液 100 μL，于 37 ℃孵育 1 h。弃去二抗溶液，用 PBST 洗涤 5 次，每孔依次分别加入显色剂 A 及显色剂 B 各 50 μL，于 37 ℃孵育 10 min，每孔加入终止液（2 mol/L 硫酸）50 μL，于 450 nm/630 nm 波长处测定吸光度。

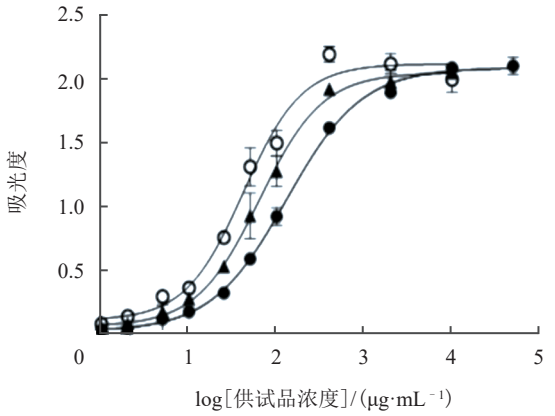
2.5 方法学验证

2.5.1 包被浓度及供试品溶液质量浓度的选择

用碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液（pH 9.6）将补体分子 C1q 稀释成终质量浓度为 10、5、2 μg/mL，以每孔 100 μL 包被酶标板，按“**2.4**”项下方法测定，结果显示，供试品质量浓度在 1 ～ 50 000 μg/mL 时，供试品的结合曲线呈典型的 S 型剂量 - 反应曲线。其中，供试品质量浓度在 10 ～ 400 μg/mL 时，剂量 - 反应曲线呈线性，吸光度随供试品质量浓度的变化最为明显（结果如图 1 所示）。当酶标板中 C1q 包被浓度不断增加时，剂量 - 反应曲线逐渐变陡，线性浓度区间收窄，故最终选用 C1q 包被浓度为 2 μg/mL、供试品浓度为 50 μg/mL 的体系进行试验。

2.5.2 二抗浓度的选择

用碳酸钠 - 碳酸氢钠缓冲液（pH 9.6）将补体分子 C1q 稀释成终质量浓度为 2 μg/mL，每孔 100 μL 包被酶标板，并用供试品稀释液将酶标二抗稀释 2 万、3 万、5 万和 10 万倍，照“**2.4**”项下方法测定。结果如图 2 所示，当二抗稀释倍数超过 5 万倍时，吸光度值随供试品浓度的变化较为平缓，且相比于二抗稀释倍数为 2 万和 3 万倍时，最大吸光度值不断减小，说明二抗浓度浓度超过 5 万倍时，试验体系的敏感性降低；另外，二抗稀释倍数在 2 万和 3 万倍时，剂量反应曲线无明显变化，因此最终选择二抗稀释倍数为 3 万倍进行试验。

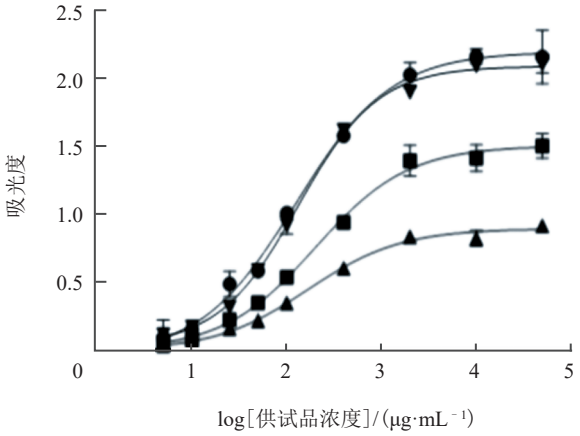


●—2 μg/mL；▲—5 μg/mL；○—10 μg/mL。

注：C1q 包被浓度为 5、10 μg/mL 时，供试品浓度为 50 000 /(μg·mL⁻¹) 时，存在钩状效应，数值舍去。

图 1　不同 C1q 包被浓度下供试品的吸光度曲线（*n*=3）

Fig.1　Absorbance Curves of the Test Samples under Different C1q Coating Concentrations (*n*=3)



●—2 万倍；▼—3 万倍；■—5 万倍；▲—10 万倍。

图 2　不同二抗稀释倍数下供试品吸光度曲线（*n*=3）

Fig.2　Absorbance Curves of Test Samples under Different Dilution Ratios of Secondary Antibody (*n*=3)

2.5.3 专属性及精密度考察

取人血白蛋白样品（用供试品稀释液稀释至质量浓度为 50 μg/mL），抗人 T 细胞猪免疫球蛋白（用

供试品稀释液稀释至质量浓度为 50 μg/mL）以及供试品稀释液（阴性对照组），以每孔 100 μL 包被酶标板，按“**2.4**”项下方法进行试验。结果显示，人血白蛋白及抗人 T 细胞猪免疫球蛋白的吸光度值与阴性对照无显著性差异，说明上述样品不能非特异性地结合酶标板中的 C1q。

取质量浓度为 50 μg/mL 的供试品溶液，按“**2.4**”项下方法进行试验，平行 6 孔，结果显示，吸光度 RSD（n=6）为 6.7%，说明酶标板孔间精密度良好。

2.5.4 与 C1q 结合的蛋白成分确认

根据蛋白浓度测定结果，用供试品稀释液将多聚体峰、二聚体峰及单体峰蛋白成分稀释至相同质量浓度（40 μg/mL），以每孔 100 μL 加至酶标板中，按“**2.4**”项下方法进行试验。结果显示，多聚体蛋白成分的吸光度值最高，平均值为 1.125；二聚体蛋白成分的吸光度平均值为 0.288，单体蛋白成分的吸光度平均值为 0.138（结果如图 3 所示）。多聚体蛋白成分的吸光度值显著高于二聚体和单体蛋白成分（P<0.001），说明与 C1q 结合的蛋白成分主要是多聚体。

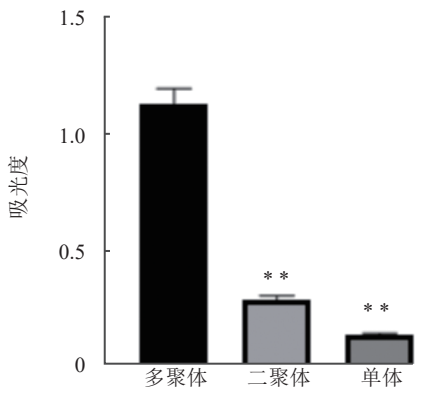
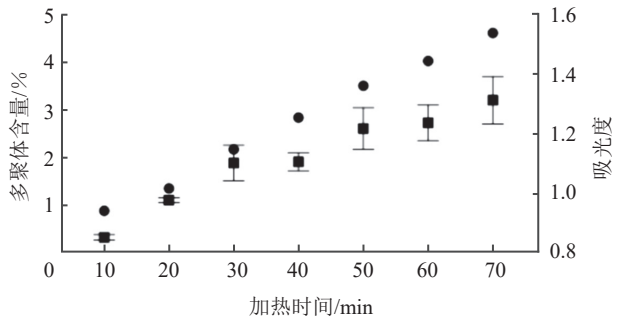


图 3 多聚体、二聚体及单体的吸光度值比较（n=3；与多聚体相比，** 表示 P<0.001）

Fig.3 Comparison of Absorbance Values of Polymers, Dimers and Monomers (n=3; Compared with Polymers, ** Represents P<0.001)

2.5.5 敏感性试验

为进一步确定多聚体含量增加是否会导致吸光度值出现相应升高，进而确认多聚体所造成的影响，考察试验体系的敏感性，将静注人免疫球蛋白于 45 ℃加热 60 min，每隔 10 min 取样，按“**2.2**”和“**2.4**”项下方法进行试验，分别测定各加热时间点样品中的多聚体含量，并记录酶标板上的吸光度值。结果（图 4）显示，随着加热时间的延长，多聚体含量逐渐增加（由 0.87% 增至 4.61%），吸光度值也出现相应升高（由 0.850 增至 1.311），说明试验体系对多聚体含量敏感，可用于比较不同样品中抗补体活性物质水平的高低。



●—多聚体含量；■—吸光度值。

图 4 不同加热时间样品中多聚体含量与吸光度的变化趋势

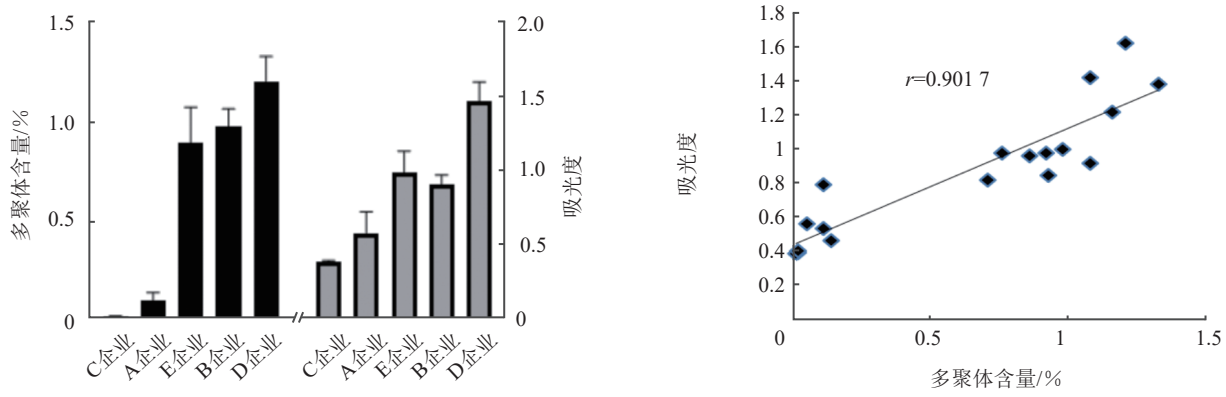
Fig.4 Trends of Polymer Content and Absorbance Value of the Samples Heated for Different Time

2.6 不同企业样品的比较

采用“**2.2**”和“**2.4**”项下方法进行试验，分别测定各企业不同批次样品中的多聚体含量并记录酶标板的吸光度值。结果（图 5）显示，多聚体含量与吸光度值存在良好的相关性（相关系数为 0.901 7）。多聚体含量较高的企业，在酶标板上的吸光度值较高，反之亦然。企业 C 的多聚体含量最低，提示产品中含有的能与补体分子 C1q 结合的物质较少；企业 D 的多聚体含量最高，提示产品中含有的能与补体分子 C1q 结合的物质较多。通过 C1q-ELISA 试验可直观地比较不同企业产品之间的抗补体活性物质的含量差异。

3 讨论

抗补体活性是静注人免疫球蛋白一项重要的安全性指标，是质量控制中的关键参数。目前 ChP



A—不同企业产品之间的比较（■—多聚体含量；▨—吸光度值）；B—多聚体含量与吸光度的相关性分析。

图 5　不同企业产品的多聚体含量与 ELISA 吸光度之间的关联性

Fig.5　Correlation between Polymer Contents of Products from Different Enterprises and Their Absorbance Values in ELISA Tests

2020 四部通则 3410 收载了抗补体活性的测定方法，即采用绵羊红细胞溶血变化来测定样品的抗补体活性。由于方法操作步骤烦琐、耗时较长，且不同批次的豚鼠血清、溶血素等试剂以及不同人员对方法的测定结果有较大影响，因此难以客观比较不同产品的抗补体活性大小。本研究通过测定产品中的多聚体、二聚体及单体含量，并分析产品中上述 3 种成分与补体分子 C1q 结合吸光度的相关性，发现二聚体和单体含量与吸光度呈负相关（相关系数分别为 －0.221 5、－0.763 8），证实多聚体是结合补体分子 C1q 的物质，该研究结果也证明 ChP 2020 中质量标准检查项目的重要性，即需控制产品中多聚体的含量。C1q-ELISA 法可直观比较不同批次样品中抗补体活性物质的含量高低，具有简便、快捷等优点，还可用于横向比较不同企业间这一质量属性的差异。

一直以来，关于静注人免疫球蛋白中抗补体活性的物质基础尚无明确的定论，对抗补体活性的定义尚存争议，且推测多聚体是造成类过敏反应的重要原因[13—15]。本课题组研究结果显示，静注人免疫球蛋白产品中 IgG 多聚体具有结合补体的活性，占据了补体系统正常激活所需的结合位点，但不能激活补体系统[7]，从而间接发挥了补体抑制作用。抗补体试验结果显示，供试品处理组的吸光度值低于补体对照组，说明供试品处理组的红细胞溶血较少，补体被抑制，进一步证实了本研究结果。由于在体外，本品可对补体系统发挥抑制作用，故不能引发补体激活而产生具有过敏效应的毒素分子“C3a、C5a”，因此本品的类过敏反应发生可能存在其他诱发机制。

值得一提的是，在分类验证多聚体、二聚体、单体与补体分子 C1q 的结合情况时，发现二聚体与单体在酶标板中也有一定的吸光度，这是由于 IgG 多聚体、二聚体及单体在一定条件下会相互转化。分离、收集蛋白成分的过程涉及合并、浓缩等步骤，二聚体和单体蛋白会发生一定程度的聚集，导致二聚体和单体蛋白成分中存在一定比例的多聚体。另外，由于补体分子是一类不耐热的蛋白分子，为最大限度保持补体分子的活性，在前期方法建立的过程中，酶标板封闭在 4 ℃的条件下进行，样品孵育在室温条件下进行，后续步骤在 37 ℃的条件下进行。

本研究初步建立了 C1q-ELISA 法以比较不同企业产品之间抗补体活性物质的含量高低，但尚未将多聚体含量与抗补体活性 CH_{50} 相关联，因此需要进一步深入研究，将其应用于本品的质量控制检测中。

参考文献：

[1]　MORALES R V, JUAREZ V H, ROSETTI S M, *et al*. Efficacy of intravenous immunoglobulin in autoimmune neurological

diseases. Literature systematic review and meta-analysis [J]. *Autoimmun Rev*, 2022, **21**(3): 103019.

[2] ŞORODOC V, CONSTANTIN M, ASAFTTEI A, *et al*. The use of intravenous immunoglobulin in the treatment of Hashimoto's encephalopathy: case based review [J]. Front Neurol, 2023, **14**: 1243787.

[3] 朱丽媛, 叶生亮, 马 莉, 等. 静注人免疫球蛋白在其适应证及超适应证中应用的研究进展 [J]. 中国生物制品学杂志, 2022, **35**(10): 1249-1256.

[4] 崔素梅, 郝清华, 高红琴. 绵羊红细胞及补体活性对静注人免疫球蛋白 (pH 4) 抗补体活性测定的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2013, **44**(3): 195-199.

[5] 王宗刚, 卢元志, 张慧兰. 静注人免疫球蛋白抗补体活性测定影响因素的探讨 [J]. 中国医药生物技术, 2010, **5**(3): 224-225.

[6] DALAKAS M C, LATOV N, KUITWAARD K. Intravenous immunoglobulin in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP): mechanisms of action and clinical and genetic considerations [J]. *Expert Rev Neurother*, 2022, **22**(11): 953-962.

[7] 柯兵兵, 王德蓉, 李世兴, 等. 静注人免疫球蛋白 (pH 4) 对人补体系统的体外影响 [J]. 药学研究, 2024, **43**(1): 40-43.

[8] GOLDBERG B S, ACKERMAN M E. Antibody-mediated complement activation in pathology and protection [J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, **98**(4): 305-317.

[9] BEURSKENS F J, VAN SCHAARENBURG R A, TROUW L A. C1q, antibodies and anti-C1q autoantibodies [J]. *Mol Immunol*, 2015, **68**(1): 6-13.

[10] SO E C, ZHOU H, GREENWELL A, *et al*. Complement component C1q is an immunological rheostat that regulates Fc: FcR interactions [J]. *Immunogenetics*, 2023, **75**(4): 369-383.

[11] ZHANG X, OWENS J, OLSEN H S, *et al*. A recombinant human IgG1 Fc multimer designed to mimic the active fraction of IVIG in autoimmunity [J]. *JCI Insight*, 2019, **4**(2): e121905.

[12] DAMELANG T, DE TAEYE S W, RENTENAAR R, *et al*. The influence of human IgG subclass and allotype on complement activation [J]. *J Immunol*, 2023, **211**(11): 1725-1735.

[13] KUSTIAWAN I, DERKSEN N, GUHR T, *et al*. Dimeric IgG complexes from IVIg are incapable of inducing *in vitro* neutrophil degranulation or complement activation [J]. *PLoS One*, 2018, **13**(4): e0195729.

[14] BUCHACHER A, SCHLUGA P, MULLNER J, *et al*. Anticomplementary activity of IVIG concentrates-important assay parameters and impact of IgG polymers [J]. *Vox Sang*, 2010, **98**: e209-e218.

[15] RAMASAMY I, TRAN E, FARRUGIA A. Measurement of anticomplementary activity in therapeutic intravenous immunoglobulin preparations [J]. *Biologicals*, 1997, **25**(1): 87-92.