

· 技术方法 ·

不同纳米过滤系统过滤静注人免疫球蛋白的效果评价

马力, 李冠军, 张学成, 范蓓, 马小伟, 王志刚
华兰生物工程股份有限公司研发中心, 河南 新乡 453003

摘要: 目的 评价不同纳米过滤系统对静注人免疫球蛋白(Intravenous human immunoglobulin, IVIG)的过滤效果, 以筛选最佳纳米过滤系统。方法 采用不同纳米过滤器进行 IVIG 过滤, 确定最佳纳米过滤器; 选用不同预过滤器和优选的纳米过滤器组合, 进行 IVIG 过滤, 确定最佳纳米过滤系统。结果 切向流(错流)纳米过滤器过滤效果优于死端(直流)纳米过滤器, 纳米过滤器 C 为最佳纳米过滤器; 深层过滤预过滤器的过滤效果优于绝对过滤预过滤器, 预过滤器 Y1 串联纳米过滤器 C 为最佳纳米过滤系统。结论 通过不同纳米过滤系统对 IVIG 过滤效果的评价, 筛选出了最佳纳米过滤系统。

关键词: 静注人免疫球蛋白; 预过滤; 纳米膜过滤

中图分类号: R392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2023)01-0081-04

Effect evaluation of various nanofiltration systems for filtering intravenous human immunoglobulin

MA Li, LI Guan-jun, ZHANG Xue-cheng, FAN Bei, MA Xiao-wei, WANG Zhi-gang

Research and Development Center, Hualan Biological Engineering Inc.,

Xinxiang 453003, Henan Province, China

Corresponding author: FAN Bei, E-mail: lgj3392@hualan.com

Abstract: Objective To evaluate the filtration effects of various nanofiltration systems on intravenous human immunoglobulin (IVIG) in order to screen the optimal nanofiltration system. **Methods** Various nanofilters were used for IVIG filtration to determine the best one and then various prefilters were selected to combine with the optimal nanofilter for IVIG filtration to determine the optimal nanofiltration system. **Results** The tangential flow (cross flow) nanofilter showed better filtering effect than dead end (direct current) nanofilter, and nanofilter C was the best one. The effect of deep filtration prefilter was better than that of absolute filtration prefilter, and prefilter Y1 in series with nanofilter C was the optimal nanofiltration system. **Conclusion** The optimal nanofiltration system was determined through the effect evaluation of various nanofiltration systems filtering for IVIG.

Keywords: Intravenous human immunoglobulin (IVIG); Prefiltration; Nanofiltration

血液制品是以健康人混合血浆为原料, 经不同的分离纯化工艺制备的生物制品。血液制品的生物安全一直是监管部门、生产企业和社会关注的重点。静注人免疫球蛋白(intravenous human immunoglobulin, IVIG)作为血液制品的主要成员, 在临床应用广泛。

目前, IVIG 采用的病毒灭活 / 去除方法通常有低 pH 孵放灭活、巴氏灭活、辛酸灭活、S / D 灭活和

纳米除病毒过滤等方法^[1-5]。不同的病毒灭活 / 去除方法其作用原理不同, 低 pH 孵放依靠 pH 值、温度以及孵放时间可有效实现对脂包膜病毒灭活; 巴氏灭活需加入大量的蛋白保护剂在高温条件下实现对脂包膜病毒的灭活, 高温条件灭活病毒的同时不可避免地对蛋白造成破坏, 使蛋白变性; 辛酸灭活和 S / D 灭活通过加入灭活剂破坏病毒脂包膜实现病毒灭活, 灭活剂的加入会造成最终产品的灭活剂残留; 纳米除病毒过滤依据过滤孔径实现病毒的截留, 可有效去除脂包膜和非脂包病毒, 且易于保持蛋白

基金项目: 国家科技重大专项(2012ZX09201301)。

通信作者: 范蓓, E-mail: lgj3392@hualan.com

质的天然活性。纳米除病毒过滤作为一种新型的病毒去除方法已广泛应用于血液制品行业^[6-9]。

纳米除病毒过滤器的材质主要有聚醚砜、再生纤维素和聚偏氟乙烯。纳米除病毒过滤方式分为切向流过滤和死端过滤两种方式。过滤器材质、过滤方式以及预过滤系统均会影响蛋白过滤效果^[10-11]。本研究旨在探讨不同预过滤器及其纳米过滤器组成的纳米过滤系统对 IVIG 过滤效果的影响,以筛选最佳纳米过滤系统。

1 材料与方法

1.1 IVIG 为本公司采用层析工艺制备。

1.2 主要仪器 纳米过滤器 A 和预过滤器 Y1 购自德国默克密理博公司;纳米过滤器 B 和 C 购自日本旭化成株式会社;纳米过滤器 D、E 和预过滤器 Y2、Y3、Y4 购自德国赛多利斯公司;预过滤器 Y5 购自美国 3M 公司。

1.3 纳米过滤器的筛选 取 IVIG 原液,分别采用不同的纳米过滤器(工作方式见表 1),按照相应的产品说明书过滤压力进行除病毒过滤,记录过滤时间和过滤体积,并按下式计算衰减速率和过滤蛋白量,以过滤速度衰减至 10% 为过滤终点,筛选最佳纳米过滤器。

$$\text{衰减速率}(\%) = \frac{\text{相邻时间点过滤速度}}{\text{过滤初始速度}};$$

$$\text{过滤蛋白量}(\text{kg}/\text{m}^2) = \text{过滤体积} \times \text{蛋白质浓度}$$

表 1 不同纳米过滤器工作方式

Tab. 1 Working modes of various nanofilters

纳米过滤器	工作压力(MPa)	过滤机制
A	0.22	死端过滤
B	0.1	切向流过滤
C	0.3	切向流过滤
D	0.2	死端过滤
E	0.2	切向流过滤

1.4 预过滤器的筛选 取 IVIG 原液,选择 1.3 项筛选的纳米过滤器,分别采用不同预过滤器(工作方式见表 2)串联纳米过滤器,按照相应说明书进行除病毒过滤,记录过滤时间和过滤体积,并计算衰减速率和过滤蛋白量,筛选最佳纳米过滤组合系统。

1.5 结果分析 分别以过滤蛋白量和过滤衰减速率为纵坐标,过滤时间为横坐标绘制趋势图,评价纳米过滤效果。试验均进行 3 次,结果采用 3 次数据平均值。

表 2 不同预过滤器的工作方式

Tab. 2 Working modes of various prefilters

预过滤器	滤材孔径(μm)	过滤机制
Y1	0.1	电荷吸附 + 深层过滤
Y2	0.1	电荷吸附 + 深层过滤
Y3	0.1	电荷吸附 + 绝对过滤
Y4	0.1	绝对过滤
Y5	0.1	电荷吸附 + 深层过滤

2 结果

2.1 纳米过滤器的筛选 不同纳米过滤器过滤效果差异明显。过滤蛋白量:纳米过滤器 C > E > A > D > B,见图 1;过滤衰减速率:C < E < B < D < A,见图 2。纳米过滤器 A 和 D 单位时间内过滤通量相对于其他过滤器较高,但过滤衰减速率也最快;纳米过滤器 C、B 和 E 过滤衰减速率优于其他过滤器,且纳米过滤器 C 过滤蛋白量最高。表明切向流过滤模式的过滤衰减速率均优于死端过滤模式;纳米过滤器 B 由于过滤压力低于其他纳米过滤器,其过滤蛋白量较低。依据不同纳米过滤器过滤特点和成本,选择 C 为最佳纳米过滤器。

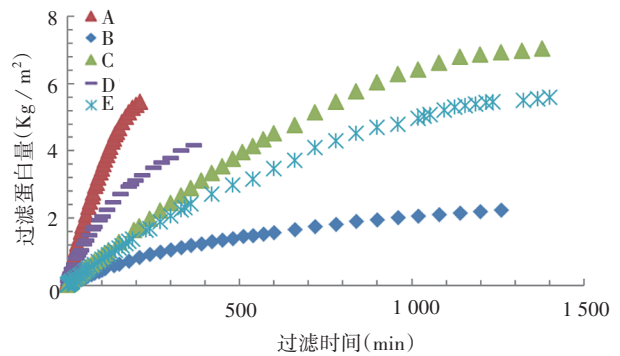


图 1 不同纳米过滤器的过滤蛋白量

Fig. 1 Filtered protein load of various nanofilters

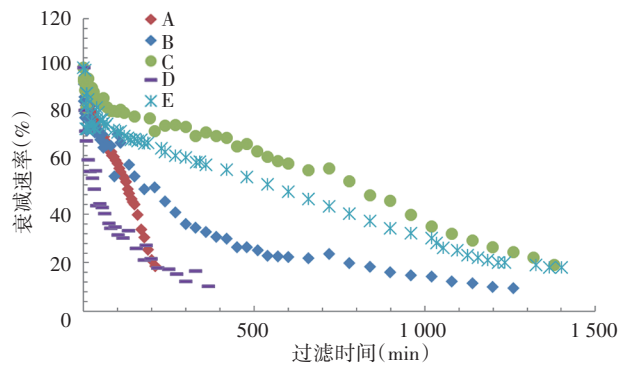


图 2 不同纳米过滤器的衰减速率

Fig. 2 Attenuation rate of various nanofilters

2.2 预过滤器的筛选 过滤蛋白量:预过滤器 Y1 > Y5 > Y2 > Y3 > Y4, 见图 3; 过滤衰减速率:预过滤器 Y1 < Y5 < Y2 < Y3 < Y4, 见图 4。表明采用不同预过滤器后,对纳米过滤蛋白量均有不同程度的提高,过滤衰减速率均有不同程度的降低。深层过滤预过滤器的过滤载量和过滤衰减速率优于绝对过滤预过滤器。依据不同预过滤器的过滤特点和成本,选择预过滤器 Y1 为最佳预过滤器。预过滤器 Y1 串联纳米过滤器 C 为最佳纳米过滤系统。

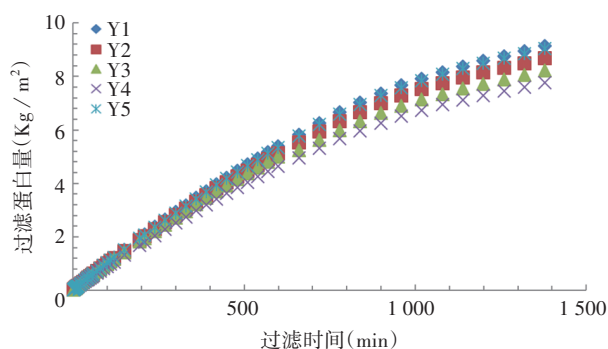


图 3 不同预过滤器的过滤蛋白量

Fig. 3 Filtered protein load of various prefilters

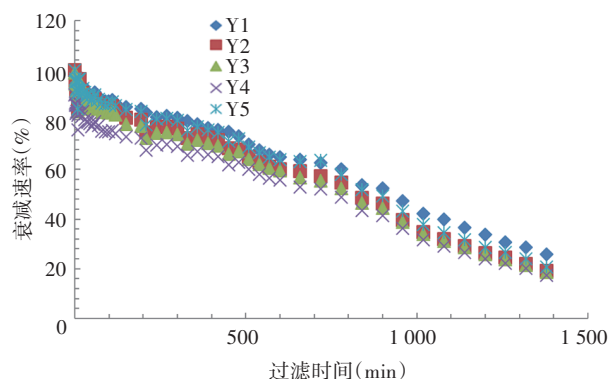


图 4 不同预过滤器的衰减速率

Fig. 4 Attenuation rate of various prefilters

3 讨论

纳米膜除病毒过滤已广泛应用于血液制品中。不同的纳米过滤器因其过滤器材质、过滤方式不同,过滤效果有所差异。本研究中切向流过滤方式的过滤衰减速率优于死端过滤方式,但死端过滤方式的过滤初始通量优于切向流过滤。这与纳米过滤器结构特点相关,纳米过滤器 A、D,其过滤孔径采用的是喇叭口设计(即过滤孔径由大至小),可有效提高过滤初始通量。切向流纳米过滤器 B、C、E 采用的中空纤维管壁开口设计,过滤孔径相对均一,因此其过滤初始通量相对较低,但过滤衰减相对较慢。

采用不同的预过滤器过滤后,对后续纳米过滤均产生了正影响。但不同预过滤器因过滤器材质、过滤方式不同,对纳米过滤效果的影响程度有所差异。本研究中深层过滤过滤器对纳米过滤效果提高均优于绝对过滤过滤器。预过滤器 Y1、Y2 和 Y5 具备电荷吸附和深层过滤两种机制,电荷吸附可能会对过滤料液进一步纯化,提高过滤效果;预过滤器 Y3 为具备电荷吸附的绝对过滤,电荷吸附可能会对过滤料液进一步纯化,因此过滤效果优于预过滤器 Y4。

不同纳米过滤器的材质不同,其亲水性和疏水性有差异。不同料液其目标蛋白、缓冲液、稳定剂差异可能会对不同纳米过滤器表现出不同的相容性,进而影响过滤效果^[12]。不同材质纳米过滤膜的最适 pH 有一定差异性,有文献表明,不同 pH 值可能会对纳米过滤的物理结构产生一定影响^[13]。不同纳米过滤膜对料液最适蛋白质含量适用性不同,如纳米过滤器 A 依据厂家指导意见过滤蛋白浓度以不高于 15 mg/mL 为宜。不同的纳米过滤器适宜的蛋白质含量应依据试验而定。为了保证蛋白稳定性和活性,通常需加入相应的稳定剂,不同的稳定剂作用机理不同,也可能影响纳米过滤效果。有文献表明,料液中稳定剂会使病毒聚集,减缓过滤衰减速率,提高过滤效果^[14]。

不同纳米过滤器因其材质、制备工艺和市场因素差异,其成本有所差异。对于生产企业而言,生产成本控制也是考虑的重要因素。因此需结合不同纳米过滤系统的过滤效率、产品特点和生产成本控制选择最佳的纳米过滤系统。如纳米过滤器 A 的过滤衰减速率快,但单位时间过滤通量大,较适合如单抗类蛋白稳定性较差,不易长时间过滤的产品;纳米过滤器 C 单位时间过滤通量较低,但过滤衰减速率较慢,较适于如血液制品等蛋白稳定性好的产品。

综上所述,本研究探讨了不同预过滤器及不同纳米过滤膜组成的纳米过滤系统的过滤效果,为不同蛋白制剂选用纳米过滤系统提供了理论支持。

参考文献

- [1] BETSCHELS D, WARRINGTON R J, SCHELLENBERG R. Clinical experience with Octagam® 10%, a solvent detergent virus inactivated intravenous immunoglobulin: a Canadian retrospective review of utilization [J]. Allergy Asthma & Clin Immunol Official J Canadian Society Allergy & Clin Immunol, 2016, 12 (1): 32.
- [2] ZHANG B X, ZHANG J T, LIU Y F, et al. Validation of virus

- removal / inactivation by nanofilm filtration and low pH incubation in human immunoglobulin for intravenous injection [J]. Int J Biologicals, 2021, 44 (1): 4. (in Chinese)
- 张宝献, 张剑涛, 刘亚芳, 等. 纳米膜过滤和低 pH 孵放法去除 / 灭活静注人免疫球蛋白中病毒效果的验证 [J]. 国际生物制品学杂志, 2021, 44 (1): 4.
- [3] MA S, PANG G L, SHAO Y J, *et al.* Validation and implementation of Planova BioEX virus filters in the manufacture of a new liquid intravenous immunoglobulin in China [J]. Biologicals J Int Association Biological Standardization, 2018, 52: 37-43.
- [4] GOUSSEN C, SIMONEAU S, BÉREND S, *et al.* Biological safety of a highly purified 10% liquid intravenous immunoglobulin preparation from human plasma [J]. Biodrugs, 2017, 31 (3): 251-261.
- [5] PENG Y, LI T J, ZHOU H Y, *et al.* Influence of different kinds of pre-filtration membranes on filtering efficacy of human immunoglobulin by nano film (DV20 nm) [J]. Chin J Biologicals, 2019, 32 (12): 1418-1420, 1424. (in Chinese)
- 彭焱, 李陶敬, 邹浩勇, 等. 不同种类预过滤膜对纳米膜 (DV20 nm) 过滤人免疫球蛋白效果的影响 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32 (12): 1418-1420, 1424.
- [6] LACASSE D, LUTE S, FIADREIRO M, *et al.* Mechanistic failure mode investigation and resolution of parvovirus retentive filters [J]. Biotechnol Prog, 2016, 32 (4): 959-970.
- [7] STRAUSS D, GOLDSTEIN J, TOMOKO H H, *et al.* Characterizing the impact of pressure on virus filtration processes and establishing design spaces to ensure effective parvovirus removal [J]. Biotechnol Progress, 2017, 33 (5): 1294-1302.
- [8] WIESER A, BERTING A, MEDEK C, *et al.* Virus filtration and flow variation: an approach to evaluate any potential impact on virus retention [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2016, 70 (4): 325-331.
- [9] LU Y L, RONG X Z, WANG Y, *et al.* Validation and evaluation of virus inactivation / removal effect of the new production process of Intravenous injection of human immunoglobulin [J]. Chin J Biologicals, 2017, 30 (12): 1331-1334, 1339. (in Chinese)
- 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.
- [10] HUANG J, WANG B, LU K L, *et al.* The effect of nanofiltration efficiency and quality by prefiltration system on intravenous injection of human immunoglobulin [J]. Biotech World, 2016 (2): 13-14. (in Chinese)
- 黄捷, 王炳, 卢奎林, 等. 预过滤系统对静注人免疫球蛋白纳米过滤的效率和影响 [J]. 生物技术世界, 2016 (2): 13-14.
- [11] LI G J, ZHANG J T, LIU Y F, *et al.* Establishment of intravenous injection of human immunoglobulin nanofiltration process model [J]. Int J Biologicals, 2016, 42 (1): 20-23. (in Chinese)
- 李冠军, 张剑涛, 刘亚芳, 等. 静注人免疫球蛋白纳米过滤工艺模型的建立 [J]. 国际生物制品学杂志, 2016, 42 (1): 20-23.
- [12] LI S Y. The explore of virus filtering optimized [J]. Process, 2020 (10): 57-59. (in Chinese)
- 李世燕. 除病毒过滤可优化点探讨 [J]. 流程工业, 2020 (10): 57-59.
- [13] LI B, YANG H H, WANG F S. Optimize the nanofiltration capacity of human immunoglobulin [J]. Chin J Blood Transfus, 2013, 26 (7): 638-639. (in Chinese)
- 李斌, 杨虎虎, 王凤山. 优化静注人免疫球蛋白纳滤载量 [J]. 中国输血杂志, 2013, 26 (7): 638-639.
- [14] YOKOYAMA T, MURAI K, MUROZUKA T, *et al.* Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration [J]. Vox Sang, 2004, 86 (4): 225-229.
- 收稿日期: 2022-03-02 编辑: 何巍
-
- (上接第 80 页)
- [21] LUO Q P, WANG H L, ZHANG R R, *et al.* Preparation and analysis immune effect of inactivated vaccine from *Pasteurella avians* by iron limited culture [J]. Chin Poultry, 2016, 38 (21): 51-53. (in Chinese)
- 罗青平, 王红琳, 张蓉蓉, 等. 限铁培养禽巴氏杆菌制备灭活疫苗及其免疫效果分析 [J]. 中国家禽, 2016, 38 (21): 51-53.
- [22] YANG P K, ZHANG Z X, SHEN H D, *et al.* Isolation and identification, drug sensitivity test and inactivated vaccine development of *Escherichia coli* from Shitou Geese [J]. Hubei Agricultural Sci, 2015, 54 (11): 2679-2682. (in Chinese)
- 杨培奎, 张振霞, 沈浩铨, 等. 狮头鹅大肠杆菌分离鉴定、药敏试验及灭活疫苗的制备 [J]. 湖北农业科学, 2015, 54 (11): 2679-2682.
- [23] GONG H, CHEN L L, LAI Y T, *et al.* Study on the injection and immersion immunity of marine fish vibrio harveyi and vibrio alginolyticus inactivated vaccine for *Epinephelus obliquus* and *Pomfret* [J]. Guangdong Feed, 2020, 29 (4): 26-30. (in Chinese)
- 巩华, 陈丽玲, 赖迎迢, 等. 海水鱼哈维氏弧菌、溶藻弧菌病二联灭活疫苗对斜带石斑鱼和卵形鲳鲹的注射、浸泡免疫研究 [J]. 广东饲料, 2020, 29 (4): 26-30.
- [24] SUN C W, LI J, LAI Y T, *et al.* Optimization of production procedure for inactivated turbot *Vibrio anguillarum* vaccine [J]. Chin J Biologicals, 2019, 32 (3): 328-332. (in Chinese)
- 孙承文, 李杰, 赖迎迢, 等. 大菱鲆弧菌灭活疫苗生产工艺条件的优化 [J]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32 (3): 328-332.
- [25] LIU M Z, YU Q, XIAO H H, *et al.* Development and characterization of *Aeromonas Hydrophila* inactivated vaccine for *Ictalurus punctatus* in Guangxi [J]. J Guangxi Academy Sci, 2019, 35 (3): 239-245. (in Chinese)
- 刘明珠, 余庆, 肖贺贺, 等. 广西斑点叉尾鮰源嗜水气单胞菌灭活疫苗的制备 [J]. 广西科学院学报, 2019, 35 (3): 239-245.
- 收稿日期: 2022-01-14 编辑: 李靓