

流动成像法表征生物制药中的不溶性亚可见颗粒

由于生物制药主要针对病原体，具有副作用小和效果明显的优势，但另一方面，与小分子药物相比，生物制药抗应力能力较低，易于团聚。有报道指出，如果生物制药因应力而形成团聚，则生物药的药效可能会减弱或丧失，还可能出现严重的副作用，包括由免疫反应而引起休克。

对于蛋白质制剂（生物制药的一种类型）的聚集特性，美国药典（USP）和日本药典（JP）规定用光阻（LO）法对 10 μm 及以上的不溶性亚可见颗粒进行评价。对于微米级的不溶性亚可见颗粒，近年来报道了通过流动成像（FI）法进行评估的实例报道(1),(2)。与光阻法相比，流动成像（FI）法对于高度透明的颗粒具有更高的灵敏度，并且能够对图像中的颗粒进行分类。

基于流动成像法的岛津 iSpect™ DIA-10 动态颗粒图像分析系统（图 1），可用于采集液体样品中颗粒的图像，并分析粒径分布、浓度和粒形。由于样品量小（测量最小体积为 50 μL，死体积为 50 μL 或更小），且光学系统的成像区域狭窄，可最大限度地减少颗粒被漏检（成像效率：90% 或更高），因此特别适用于生物制药中不溶性亚可见颗粒的表征。本文介绍了一个使用 iSpect DIA-10 表征蛋白质溶液中聚集体大小和浓度的实例。

H. Maeda



图 1 iSpect™ DIA-10 动态颗粒图像分析系统

样品和方法

样品采用冻干人免疫球蛋白。通过将样品粉末溶解在 pH 为 5.0 的柠檬酸 - 磷酸缓冲液中，使其浓度为 1 mg/mL，并通过 100 nm 注射式过滤器将样品过滤，配制成样品溶液。为了诱导蛋白聚集体形成，将样品溶液分为两部分。一部分用 80 °C 的加热模块加热 3 分钟（热应力样品），另一部分用 PEEK（聚醚醚酮）树脂制作的搅拌板搅拌 10 分钟（搅拌应力样品）。

使用下表的测量条件对按上述方法制备的两种蛋白聚集体样品（热应力、搅拌应力样品）进行测量。

表 1 测定条件

| | |
|-----|--------------|
| 帧速率 | : 8 帧 / 秒 |
| 效率 | : 97% |
| 样品量 | : 50 μL |
| 阈值 | : 220 |
| 流速 | : 0.1 mL/min |

测量结果

图 2 为粒径分布和散布图，图 3 为典型颗粒图像。表 2 和图 4 为观测到的颗粒数和数量浓度的测量结果。

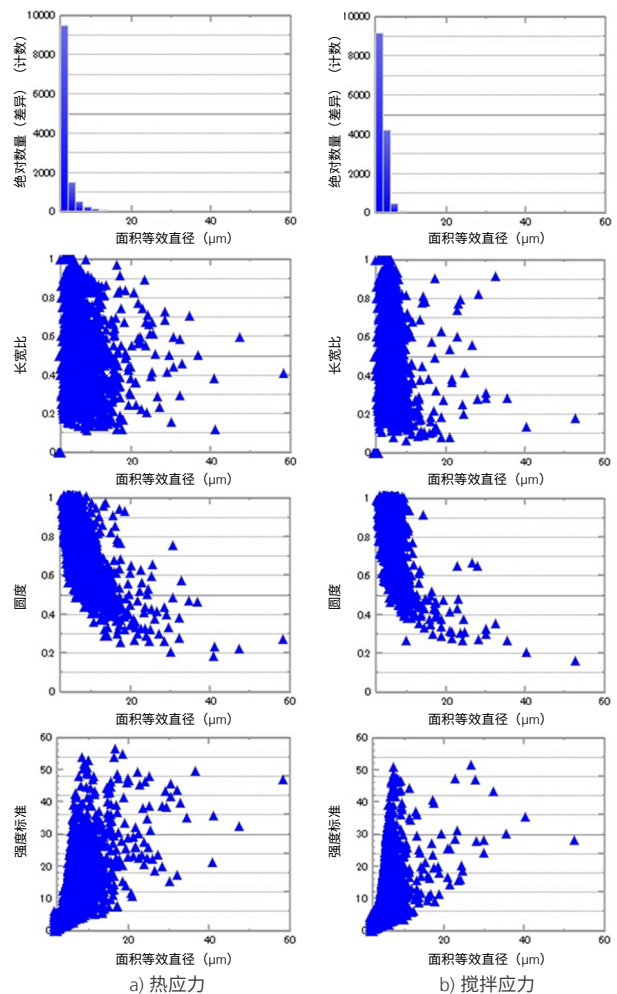
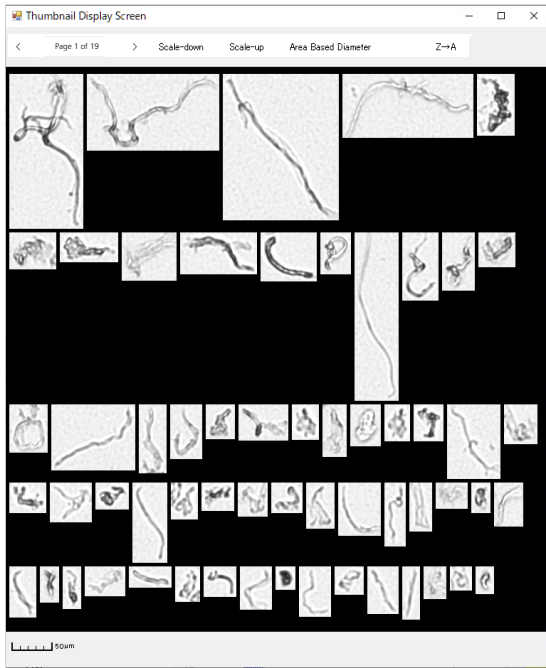
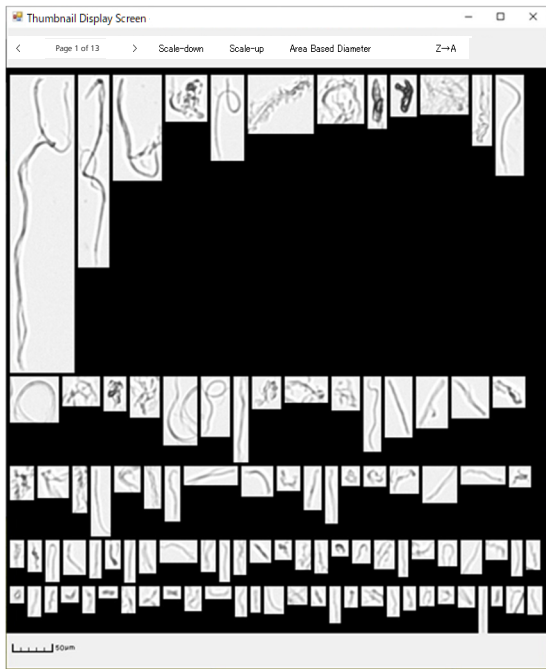


图 2 粒径分布和散布图



a) 热应力



b) 搅拌应力

图3 典型颗粒图像

参考文献

- (1) Susumu Uchiyama, "对生物制药中聚集体进行适当的生物物理表征" *Yakugaku Zasshi* (日本药学会杂志), 138, 1503-1507 (2018)
- (2) Kiyoshi M 等人, "流动成像法和光阻法分析亚可见颗粒的合作研究: 日本生物制药协会的体验", *药学会杂志*, 108, 832-841 (2019)

iSpect 是岛津制作所在日本和 / 或其他国家的商标。

表 2 观测到的颗粒数和数量浓度

| | 热应力 | 搅拌应力 |
|-----------------|--------|--------|
| 观测到的颗粒数 (颗粒数) | | |
| (总计) | 32246 | 18813 |
| (按大小) | | |
| <2 µm | 29210 | 4966 |
| 2 µm - 10 µm | 11797 | 14057 |
| 10 µm - 25 µm | 298 | 78 |
| ≥ 52 µm | 22 | 9 |
| 颗粒浓度 (计数/mL) *1 | | |
| (总计) | 668102 | 389784 |
| (按大小) | | |
| <2 µm | 417051 | 96737 |
| 2 µm - 10 µm | 244421 | 291246 |
| 10 µm - 25 µm | 6174 | 1616 |
| ≥ 25 µm | 465 | 168 |

*1 颗粒浓度根据观测到的颗粒数、观测到的区域体积和记录的帧数计算。

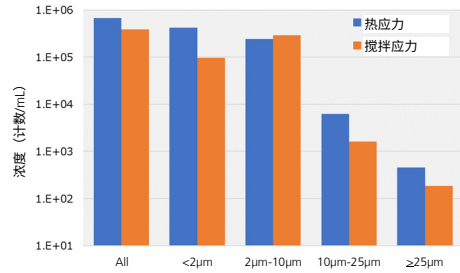


图4 按粒径分类的数量浓度

从粒径分布、散布图和颗粒浓度可以看出，当施加不同应力条件时，即使具有相同的蛋白浓度，微米级聚集体的数量和形状参数也会有所不同。此外，在颗粒图像中观测到线状和块状颗粒。

尽管使用 iSpect DIA-10 很难对小于 5 µm 的颗粒进行形状分析，因为一个像素为 0.8625 µm，并且很难用溶剂获得足够的对比度，但是还可以进行检测。作为对照，图 5 显示了 2 µm 聚苯乙烯乳胶颗粒的测量结果。

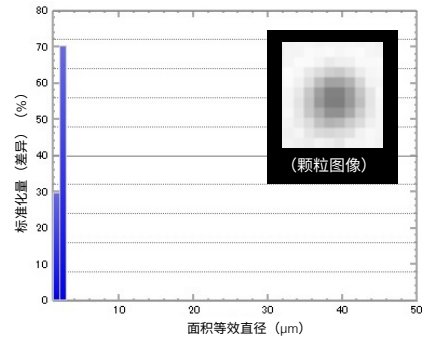


图5 聚苯乙烯乳胶颗粒 (2µm) 的测量结果

总结

如上所述，通过使用 iSpect DIA-10 测量在不同应力条件下制备的蛋白溶液，获得了微米级不溶性亚可见颗粒的颗粒图像，并按尺寸表征了颗粒浓度。iSpect DIA-10 甚至能够以高成像效率测量痕量样品，因此可用于表征生物制药中的不溶性亚可见颗粒。

岛津应用云



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020 年 4 月