

对不同颗粒尺寸采用不同的测量方法

作者: **Stephen Ball**, 马尔文仪器产品营销经理

本文中, 马尔文仪器产品营销经理 **Stephen Ball** 向您介绍生物制药中蛋白质团聚物的一些测量技术。

随着生物分子在许多制药公司药物开发途径中所占据的比例越来越大, 人们越来越关心相关开发、生产与监管方面难题的解决。由于药物的潜在免疫原性是生产商和监管者都十分关心的要素, 因此如何定义生物药品的纯度与效力要比那些小分子药物复杂得多。这反过来突显了业界对高质量分析工具的迫切需要——希望它们能有助于全面表征出生物药物颗粒和团聚物, 同时对药物内在颗粒与污染物的理化特性表征也越来越重视。

测量的用处何在?

药物分子从发现走向早期配方是十分关键的一个步骤。分子的理化特性是药物配方与给药的决定因素; 药物分子的理化特性确定得越早, 就能获得越大的经济效益——无论是为了确定上述步骤成功的可能性, 还是尽早避免可能的失败。就这一点而言, 比较理想的是能够在非常少量的样品上进行一系列非破坏性试验, 并且把更多的精力放在改善可能用到的测试过程中。

从药物分子理化特性表征到药物开发过程直至最终的成品测试, 发现和检测蛋白质团聚物, 是药物开发最重要的步骤, 因为理解药物分子这方面的行为对于药物产品的配制、稳定性和安全性来说都是至关重要的。蛋白质结构是通过范德华力、氢键、二硫键和疏水作用的结合来保持的, 环境条件的改变可能会影响其中的一些或者全部相互作用力——其结果可能会引发团聚物非正常的折叠或者对于溶解性造成负面影响。在此过程中, 蛋白质的活性常常会消失, 也有可能很多团聚物会发展出免疫原性, 从而对最终治疗药物产品的有效性和安全性造成显著影响。

当前的监管预期是, 对团聚物和大小范围在“0.2- 2”微米级别¹的不溶性微粒进行表征。大小超过几微米的团聚物可以用视觉方法来进行表征。小于这个尺寸的, 可以采用动态光散射(DLS)法和体积排除色谱(SEC)法等成熟的分析技术对蛋白质凝聚物进行表征。图1列出了上述方法所采用的技术和测量范围。共振质量测量法(RMM)是最新发展的技术现在也被用来检测和统计50 nm到5µm这一至关重要尺寸范围内的不溶性微粒, 并对它们的浮力质量、净质量和粒径大小进行可靠的测量。共振质量测量法为不溶性微粒和亚微米级凝聚物提供了测量窗口。

动态光散射法的使用

动态光散射法测量迅速, 属于非侵入性的测量方式, 特别适合在药物试剂开发的早期阶段筛选蛋白质。

该技术测量了布朗运动下的蛋白质所产生的散射光强度波动，并将结果转化为尺寸与尺寸分布数据。这种技术最大的优点之一是能够在最早的阶段对蛋白质团聚物进行检测，从而确定生成或者阻止蛋白质形成团聚物的条件。

蛋白质分析过程应该选择理想的动态光散射 (DLS) 技术。当溶液中蛋白质尺寸与散射光波长相比非常小时，散射光的强度不再取决于角度，也就是说从任何角度进行测量都会得出相同的结果。然而随着蛋白质尺寸增大并超过 $\approx \lambda/10$ 时，向前的散射光强度开始增加，此时，从合适的角度对数据进行收集就变得十分重要。例如，采用配有背向散射检测技术的仪器，通过测量前后两个方向 (见下列数据) 的散射光强可以对蛋白质团聚过程进行有效的监控。

应用体积排除色谱法

体积排除色谱法 (SEC)，顾名思义，是利用分子在流体力学尺寸上的差异分离溶解的高分子。通常在生物科学实验室会采用这种方法来表征纯化和重组的蛋白质。当使用 SEC 作为分析工具时，其得到的信息量和有效性取决于和色谱连接的检测技术。

单检测 SEC 采用紫外 (UV) 检测仪来检测浓度，依然是测试所有蛋白质团聚物的传统手段，但是功能更为强大的多检测系统在这个应用领域越来越受到人们的青睐，因为它们可以提供互补的信息和对检测结果综合解释。例如，结合了示差折光检测器 (RI)、紫外检测器、光散射检测器和粘度检测器的系统可以对蛋白质样品进行全面表征，提供分子量数据以及详细的结构变化和特征，同时避免了色谱柱校准的需要。

图3显示了 GPC /SEC 色谱仪对牛血清蛋白样本的检测，上面显示了由 RI 和光散射检测器组成的系统所获得的响应。红色为 RI 信号，在大约 25 毫升时反应比较明显，根据相应光散射强度数据 (绿色) 计算得到的分子量，可以确定是单体。较早出现的两个流出峰，根据分子量可以确定为二聚体和三聚体。最早出现的峰值处所对应的大量光散射信号表明，这些是团聚物。如果仅仅依靠单个 RI/UV 检测器系统是对所有组成进行准确的定性定量的检测是不可能完成的。

引入共振质量法测量

作为分析家族中相对较新的一员，共振质量检测方法 (RMM) 检测并统计样本中不溶性微粒与亚微米级微粒的数量，同时测量其粒度尺寸和质量分布。由于 RMM 是一种计数技术，上述质量分布数据是在数字基础上产生，因此赋予该技术对稀疏颗粒群很好的敏感性。

在共振质量检测仪的核心部位，有一个微机电系统 (MEMS) 传感器，传感器内含有微米级流通道的共振悬臂。当粒径范围为 50 nm - 5 μ m 的单个颗粒流过通道时，悬臂的谐振频率会发生与颗粒浮力质量相对应的变化，由此可以从检测到的频率变化中推断出颗粒的干燥质量和粒径。

与此同时，MEMS 传感器还能提供关于样本浓度、粘度、密度和体积等信息，并能够检测和分辨相对于溶剂的正负浮力的颗粒。基于浮力正负的区分能力非常有用，比如他可以同时区分检测被硅油液滴污染的样品中的硅油成分和蛋白质成分 (见图4)。这是一个在药物开发后期和生产中经常会碰到的问题，因为在上述场合中硅油是药物输送的注射器经常遇到的一种污染物。

共振质量检测法的另一个优点是，那就是它架起了可见光法和溶液法 (如体积排除色谱法，较难测出蛋白质团聚成团) 之间的桥梁。监管机构十分希望能对蛋白质的团聚物加以可靠的量化和全面的认识，为

了满足上述的分析需求，共振质谱法技术应运而生，它可以贯穿质量控制的整个过程，甚至在有常见污染物的情况下也能满足分析需求。

展望未来

生物分子固有的复杂性和可变性对快速发展的生物制药行业提出了诸多新挑战。利用现有技术对成品中的蛋白质颗粒或团聚物进行检测固然十分重要，但业界越来越需要各种有助于了解促进上述相互作用的理化机制、并对稳定配方的开发起到支撑作用的测量技术。分析解决方案提供商必须跟上这样的变化步伐，凭借侧重于测量全新而又不断出现的“品质属性”的仪器产品的快速开发，对行业需求作出预见和响应。

参考资料

¹ 演讲稿：Susan Kirshner，FDA 生物技术办公室。下载地址：

http://www.aaps.org/uploadedFiles/Content/Sections_and_Groups/Focus_Groups/Protein_Aggregation_and_Biological_Consequences/PABCFG_Kirshner2012.pdf

结语

位于美国宾夕法尼亚州的马尔文仪器最近推出了一项全球生物科学发展项目。这是一个资源充足并且专注于高端技术合作开发的项目，与许多生物制药公司和该领域内声名卓著的学术领导人合作。下面的方框里包含了项目的更多细节，如需进一步了解敬请与我们接洽。

马尔文仪器的生物科学开发项目

马尔文仪器公司推出的“全球生物科学发展项目”充分认识到生物制药领域正在以前所未有的速度向前发展，以及这种趋势给分析仪器公司带来的重任，即：迅速提供强大的解决方案，应对快速发展的分析和监管方面的挑战。该项目制胜的关键在于结成具有充分信心、开放的高端技术开发合作方式，打造出确保专注于明确分析需求的灵活技术和产品开发流程。

虽然生物科学发展项目是马尔文组织不可分割的一部分，但它的运作基地位于华盛顿特区附近，由马尔文仪器首席技术官 **E. Neil Lewis** 博士领导。他将带领一个既独立于马尔文各核心团队，但又与其联系紧密的专职科学家和工程师开发团队。团队的工作将专注于生物制药领域的需求，尤其是与试剂和产品开发相关的生物化学和生物物理的表征需求。

这个敏捷而又资源充足的专门项目将带动生物制药企业、技术创新机构和领先学术机构之间的密切合作。通过建立这样的互利关系，马尔文将随时了解新兴的行业需求并迅速作出响应，而生物制药行业则可以及早接触到它迫切需要的前沿技术发展并助其成型。

图表

图 1: 业界需要一系列分析技术，确保对蛋白质凝聚物所有可能的粒径范围进行准确测量

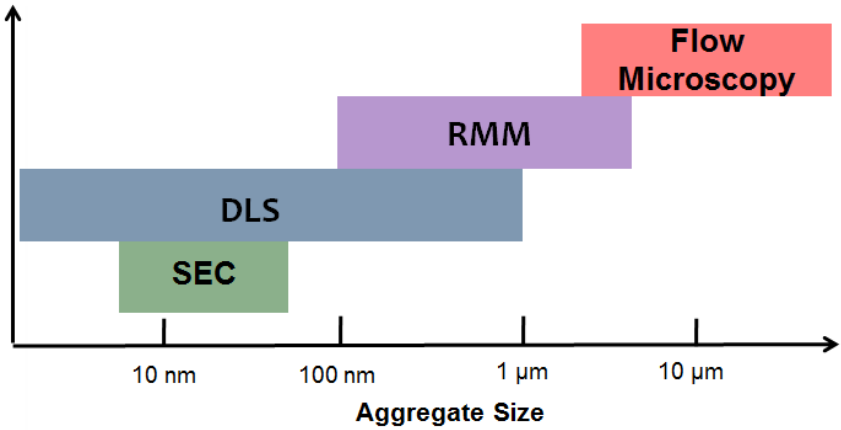


图 2: 对后方 (173 度) 和前方 (12.8 度) 的光散射强度同时进行测量，确保整个凝聚过程中的粒径得到准确的测量。

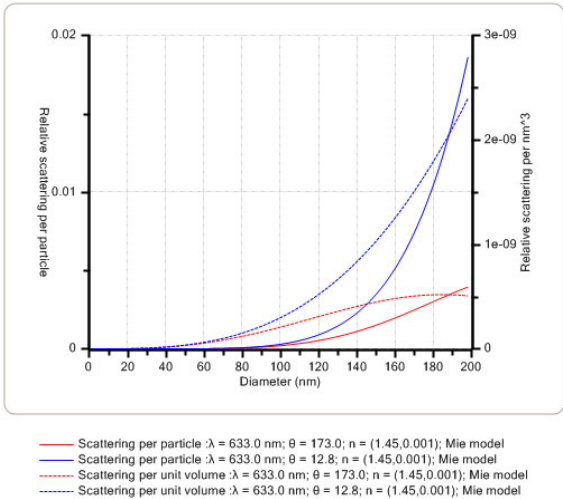


图 3: 采用由 RI 和光散射检测仪组成的 GPC/SEC 系统对牛血清蛋白进行测量。

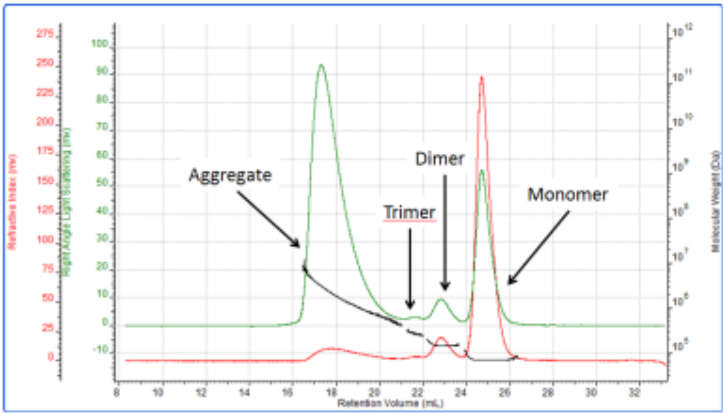


图 4: 共振质谱法(阿基米德, 马尔文仪器)对单个蛋白样品进行了正浮力硅油液滴和负浮力蛋白质凝聚颗粒两种尺寸分布进行测量。

