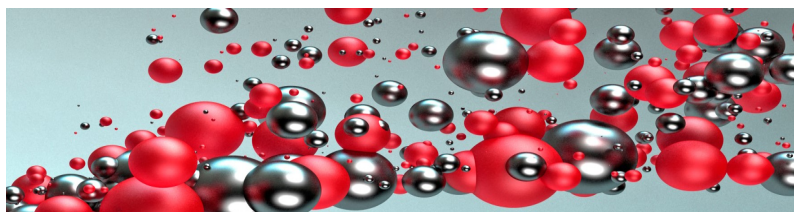


Alp-AN-708

蛋白质团聚

Date: 2021.08



摘要: 以蛋白质溶液为基础的治疗中, 团聚可能产生有害的免疫原性。对于较大尺寸的聚集体可以进行测量, 但在0.15到2微米范围内的较小聚集体很难量化。动态光散射 (DLS) 技术可以证明聚集体的存在, 但不能提供关于聚集体绝对浓度的任何信息。单颗粒光学传感技术 (SPOS) 现在可以测量聚集蛋白的大小和浓度, 并成为这一应用的首选技术。

介绍

生物治疗药物容易诱导抗药物抗体 (ADA) 的产生。有证据表明, 蛋白质聚集体和颗粒具有增强免疫原性的能力, 从而引发对蛋白质单体形式的免疫反应。

生物治疗蛋白的制造商通常通过一系列步骤来制备用于注射的药物, 如:

1. 蛋白质合成与纯化
2. 在运输过程中用于稳定的冻干
3. 注射前再造

虽然冻干的好处是它可以稳定蛋白质的运输, 但目前还不清楚冻干蛋白在重组后是否会回到单体状态。如果由于这一过程而导致少量的蛋白质聚集, 就有可能在患者的治疗过程中产生免疫反应。

开发一种简单的方法来测量聚集程度, 使数据在重组后以大小与浓度的直方图显示, 将有助于在处方过程中筛选这些药物。这种分析可以确保重组过程在没有大量聚集的情况下释放单体。

粒子计数技术

有一些技术能够测量颗粒大小和浓度的大小范围的兴趣, 以量化蛋白质聚集。光阻法在许多药学工作者所熟悉的方法, 因为它是用于USP<788>颗粒物注射剂和USP<729>测试, 以测量脂类乳剂的尾部。但是经典的光阻传感器通常具有更低的粒径限制, 接近1 μ m, 而且对于许多蛋白质聚集样品, 浓度限制太低。

新的PSS AccuSizer FX-Nano系统(如下图所示)被设计用于更小的颗粒尺寸和更高的浓度。这是通过使用两个传感器实现的: FX-Nano传感器可测量0.15-0.6 μ m和LE400传感器测量0.5-40 μ m。新型FX-Nano传感器使用聚焦光束来减少检测的总体积, 从而增加了传感器的浓度限制。该传感器与SIS进样器耦合, 修改后允许样品体积低至250 μ m。这种结构的结膜通过USP<787>治疗性蛋白注射中亚可见颗粒物质的所有要求。



聚合蛋白的大小和计数使用两个传感器, 以覆盖0.15-40 μ m的动态范围。当LE传感器单独使用时, 可以从0.5-400 μ m, 这使得这个体系非常灵活。

Particle Sizing Systems

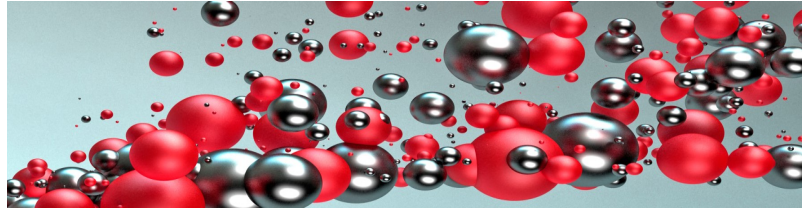
Building solutions one particle at a time.



Alp-AN-708

蛋白质团聚

Date: 2021.08



数据1: IgG过滤前后

在PBS中制备免疫球蛋白G (IgG), 150kda, 1%。
样品未经稀释使用AccuSizer FX- nano与FX和LE传感器和SIS进样器。结果如图1所示。总计#粒子计数= 109, 343, 浓度= 9.7×10 粒子/毫升。

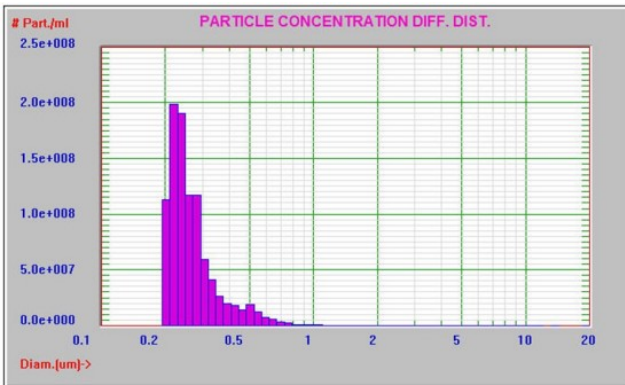


图1: 未过滤的IgG

样品还在Particle Sizing Systems Nicomp 380 动态光散射 (DLS) 系统上进行了分析, 如图2所示, 以评估单体的大小, 并大致了解聚合蛋白的大小。峰1 (天然蛋白): 14.6nm (99.6%总质量)。# 2 (聚合达到顶峰尾): 395nm (总质量0.4%)。这是在200-500纳米和更大的聚集体的尾部。

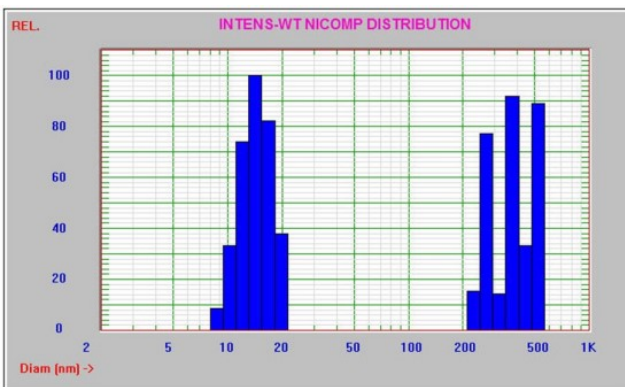


图2: 未过滤的IgG的DLS Nicomp 360数据

然后蛋白样品通过0.2μm过滤器, 在Accuizer FX -Nano系统上再次分析, 过滤前后对比结果如图3所示。PBS的结果也显示为黑色。

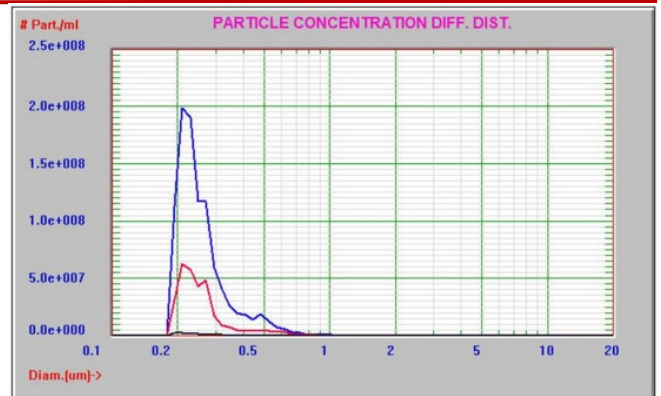


图3: 过滤前(蓝色)和过滤后(红色)

数据2: 培育前后的IgG

用样品制备方法研究培育对IgG蛋白样品的影响。图4显示了IgG样品在37°C培育前、培育1小时和6小时后的粒径分布。样品单独使用Accuizer FX系统测量。将聚合蛋白定义为 $>0.7 \mu\text{m}$, 其浓度分别为9.77、7.75、5.08 x 10⁵颗/毫升。显然, 这种聚集程度随着热培养的增加而减少, 表明溶解改善。图5中展开了聚合的尾部以获得更多细节。

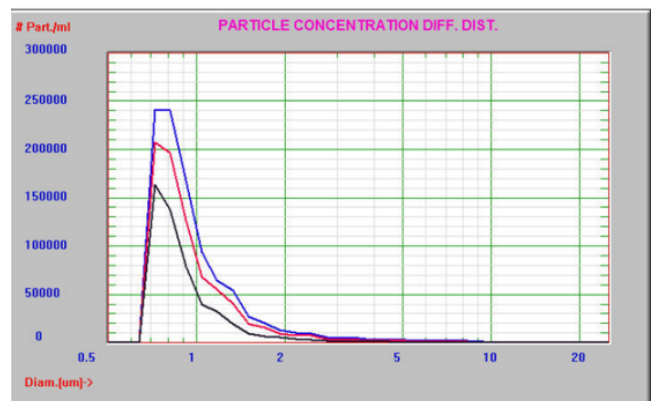


图4: 时间0(蓝色), 1小时(红色), 6小时(黑色)

Particle Sizing Systems

Building solutions one particle at a time.



Alp-AN-708

蛋白质团聚

Date: 2021.08

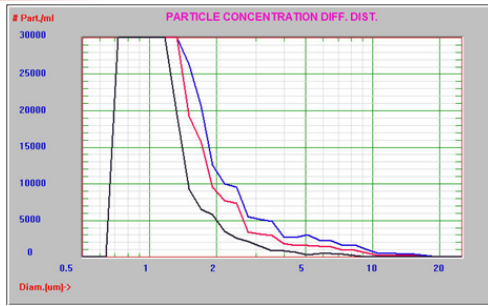
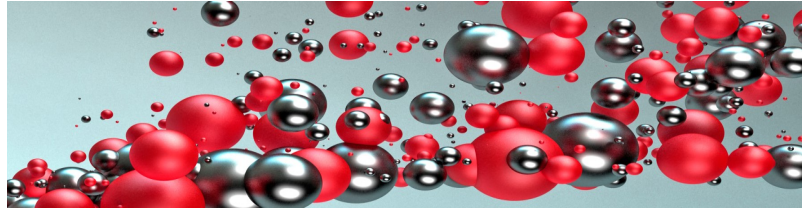


图5: 聚合的蛋白质尾部的扩展视图

数据3: 不同贮藏和加工条件下的蛋白质

一名使用者提供了一种未知的蛋白质。在FX-Nano 上分析了缓冲液和三种不同的制备/储存条件, 以确定聚合蛋白的粒径和浓度。缓冲液和蛋白样品中 > 0.19um 颗粒的浓度见表1。图形结果以差分计数格式 (图6) 和累积格式 (图7) 显示。

Sample	Particles/mL > 0.19 μm
Protein A (red)	4.78×10^8
Protein B (green)	2.36×10^8
Protein C (blue)	1.10×10^8
Buffer (purple)	0.36×10^8

表1: 缓冲液和三种蛋白样品的颗粒浓度

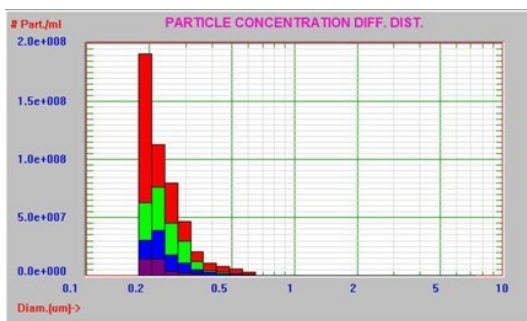


图6: 样本数据分布重叠图

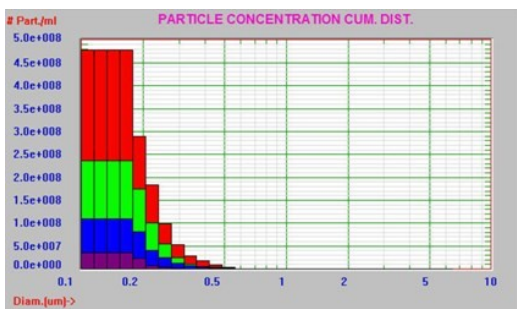


图7: 累积分布

图8和图9显示了相同的聚合蛋白数据, 但Y轴的浓度以对数标度表示, 以更好地显示大浓度范围的结果。

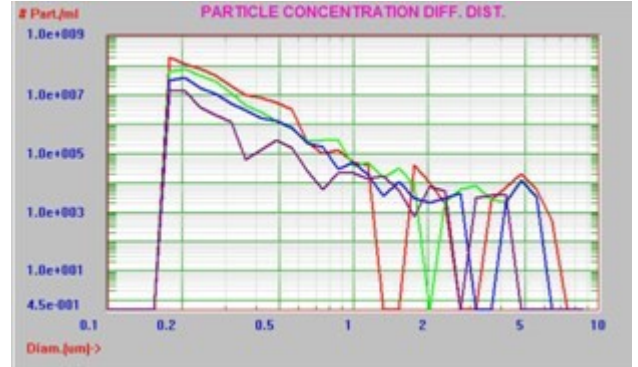


图8: Differential distribution, log scale

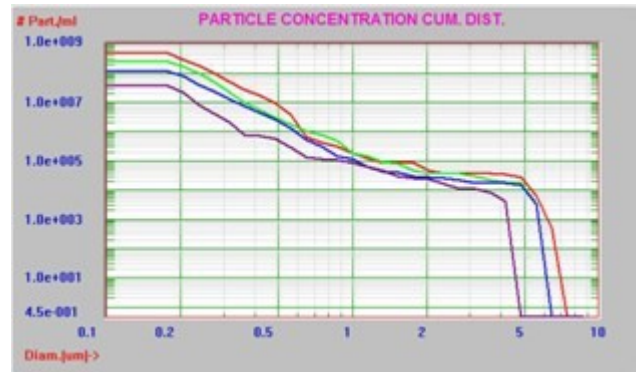


图9: Cumulative distribution, log scale

结论:

该Accuizer FX-Nano提供了一种分析工具, 能够轻松量化蛋白质聚集物的大小和浓度。独特的两个传感器方法涵盖了广泛的动态范围, 需要提供详细的, 高分辨率的aggre尾部视图封闭的蛋白质。准确的计数数据允许比较不同浓度的样品的结果。SIS取样器可以用于此应用所需的小样本量。此外, 通过去除FX-Nano传感器, 该系统可以用于注射中USP <787>和<788>的标准颗粒物。

Particle Sizing Systems

Building solutions one particle at a time.

