

AN-708 蛋白聚集

概述

基于治疗的蛋白质溶液聚集可能产生有害的免疫原性。对于较大尺寸的团聚体，可以测量这些团聚体，但在 0.15 至 2 微米范围内的较小团聚体很难量化。动态光散射(DLS)技术可以证明聚集体的存在，但不能提供任何关于聚集体的绝对浓度的信息。单粒光写传感器技术(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。

引言

生物治疗药物已被证明容易诱导产生抗药物抗体(ADA)。证据表明，蛋白质聚集具有增强免疫原性的能力，因此增强了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准备注射用药物，例如：

1. 蛋白质合成与纯化
2. 在运输过程中为了稳定而进行冻干
3. 注射前的复溶

虽然冻干的好处是可以稳定蛋白质以供运输，但目前还不清楚冻干蛋白质在复溶后是否会恢复到其单体状态。如果少量的蛋白质在这一过程中聚集，就有可能引起患者对治疗过程的免疫反应。

开发一种简单的方法来测定复溶后大小与浓度的直方图形式的聚集程度，将能够在配制过程中筛选这些药物，以确保在复溶后中导致单体释放而不会产生大量的聚合。

粒子计数技术

很少有技术能够测量目标尺寸范围内的颗粒大小和浓度以量化蛋白质聚集。许多药学科学家都熟悉的光阻法，因为它被用于美国 USP788-注射液中的不溶性微粒和 USP729 测量脂质乳状液尾部的试验。但是传统光阻法的传感器检测下限是 1 μm 附近，并且浓度限制对于许多蛋白质聚集样品来说太低。

PSS Accusizer FX-Nano 系统(如下所示)是设计在更小的颗粒尺寸和更高的浓度下工作。这是通过使用两个传感器完成的;FX-Nano 传感器测量范围为 0.15-0.6 μm ，LE400 传感器测量范围为 0.5-400 μm 。新的 FX-Nano 传感器使用聚焦光束来减少检测的总体积，从而提高了传感器的浓度限制。该传感器与 SIS 进样器联用，使进样体积低至 250 μL 。此配置通过了 USP787 治疗性蛋白注射剂中的不溶性微粒。



通过两个传感器一次就能测试聚合蛋白的大小和浓度，它的动态范围是 0.15 - 40 μm 。LE 传感器单独使用时的工作范围为 0.5 -400 μm ，这使它成为非常灵活的系统。

案例 1：过滤前后的免疫球蛋白

免疫球蛋白(IgG)，约 150 kDa，1% PBS。使用 FX 和 LE 传感器以及 SIS 采样器的 Accusizer FX- nano 来测量未稀释的样品。结果如图 1 所示。总颗粒计数= 109,343，浓度= 9.7×10^8 颗/mL。

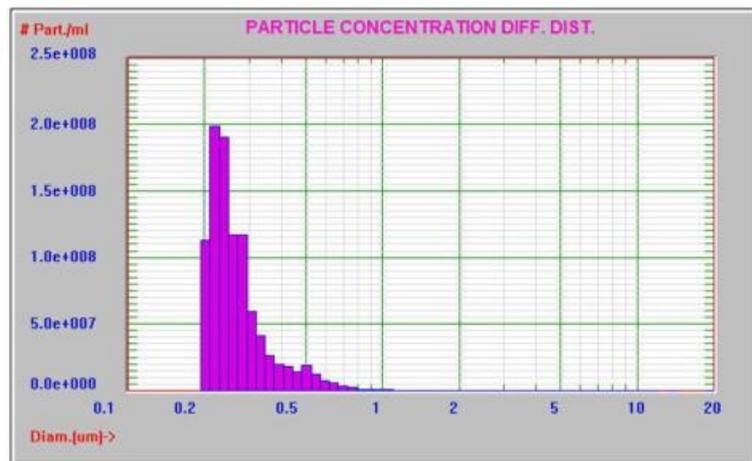


图 1: 未过滤的 IgG

使用 PSS 的 Nicomp 380 动态光散射仪测试它，通过图 2，以评估单体大小并大致了解聚集蛋白的大小。峰#1（天然蛋白）：14.6nm，强度 52%（总质量 99.6%）。2 号峰（聚集的尾巴）：395nm，强度为 48%（总质量的 0.4%）。AccuSizer FX-Nano 被用于详细研究聚集在 200-500 nm 或更大尾端。

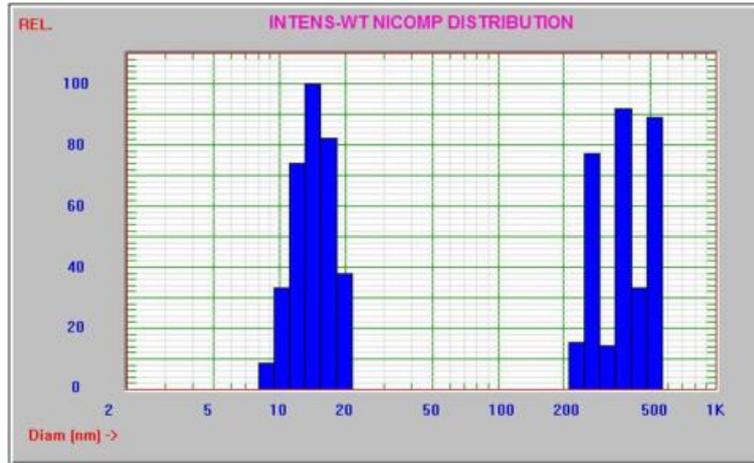


图 2: DLS Nicomp380 测试未过滤 IgG 的数据

蛋白质样品然后通过 0.2 μm 再次过滤后，使用 AccuSizer FX-Nano 系统分析。过滤前后的对比结果如图 3 所示。PBS 的结果也显示为黑色。过滤后的浓度从 9.7×10^8 颗/mL 降低到 3.1×10^8 颗/mL。AccuSizer FX-Nano 系统可以清楚地看到聚集颗粒尾巴的减少，并且可以轻松识别。

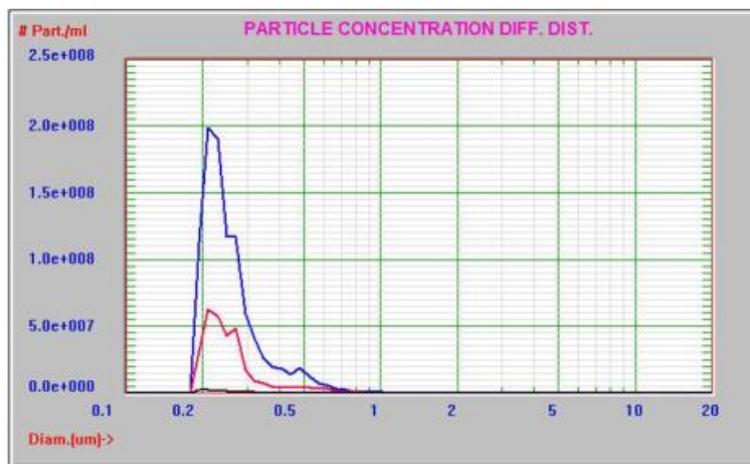


图 3: 过滤前(蓝色)和过滤后(红色)。

案例 2: 孵育前后的免疫球蛋白

样品制备用于研究孵育对 IgG 蛋白样品的影响。图 4 显示了在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育之前，然后在孵育 1 和 6 小时后 IgG 样品的粒径分布。仅使用 AccuSizer FX 系统测量样品。将聚集蛋白定义为 $> 0.7 \mu\text{m}$ ，浓度降低如下：9.77、7.75，降至 5.08×10^5 颗/ mL。显然，这种聚集程度随热培养的增加而降低，表明溶出度提高。聚集体的尾部在图 5 中进行了放大，以获得更多详细信息。

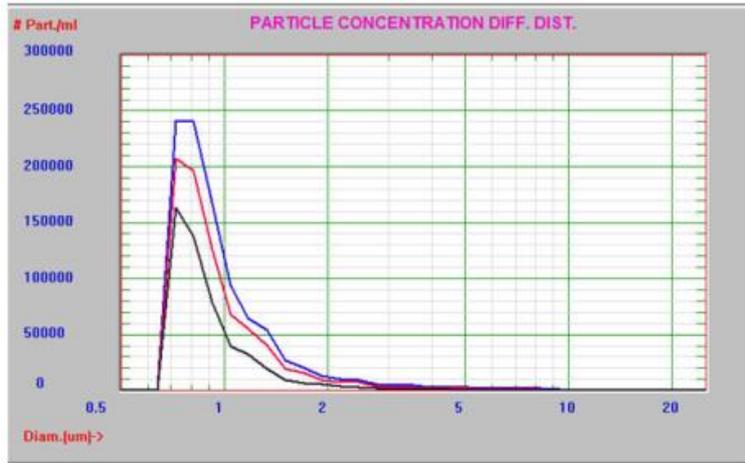


图 4: 时间 0(蓝色), 1 小时(红色), 6 小时(黑色)

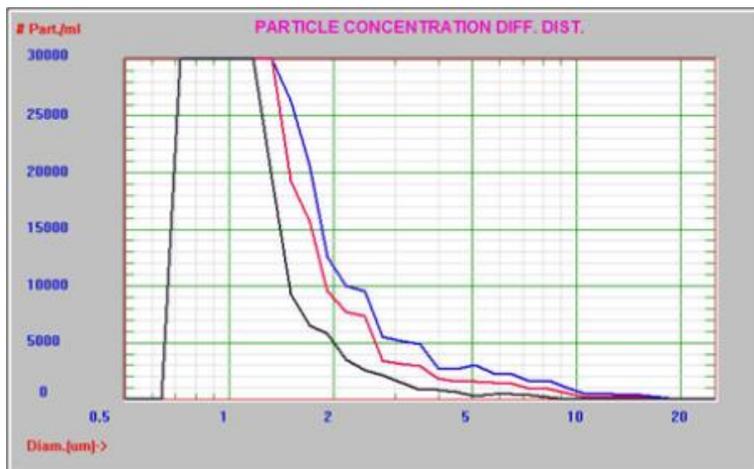


图 5: 聚集蛋白尾部的放大

案例 2: 蛋白质在不同的储存和加工条件

客户提供了未知的蛋白质。在 AccuSizer FX-Nano 上分析了缓冲液和三种不同的制备/存储条件, 以确定颗粒大小和聚集蛋白的浓度。表 1 中显示了缓冲液和蛋白质样品中 > 0.19 µm 的颗粒浓度。图 6 中的差异计数格式和图 7 中的累积格式显示了图形结果。

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

表 1: 缓冲液和三个蛋白样品的颗粒浓度

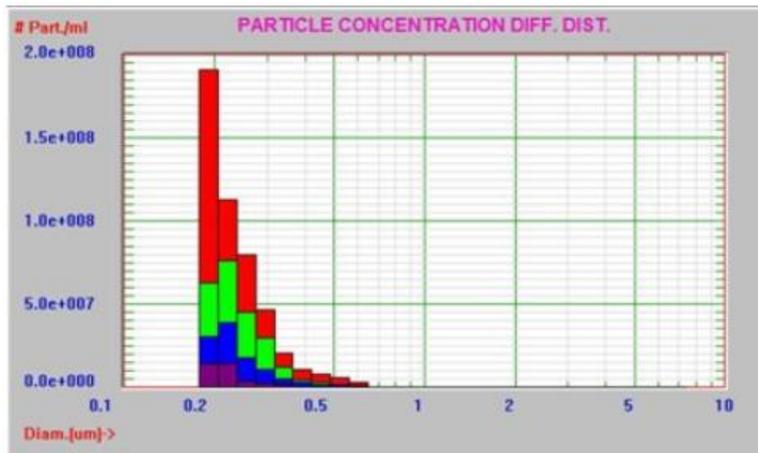


图 6: 差异分布

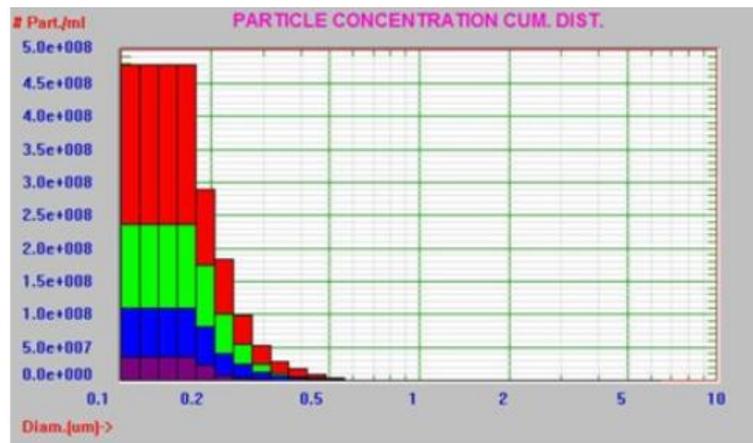


图 7: 累积分布

图 8 和图 9 显示了相同的聚合蛋白数据，但 Y 轴上的浓度以对数标度表示，以便更好地显示结果的大浓度范围。

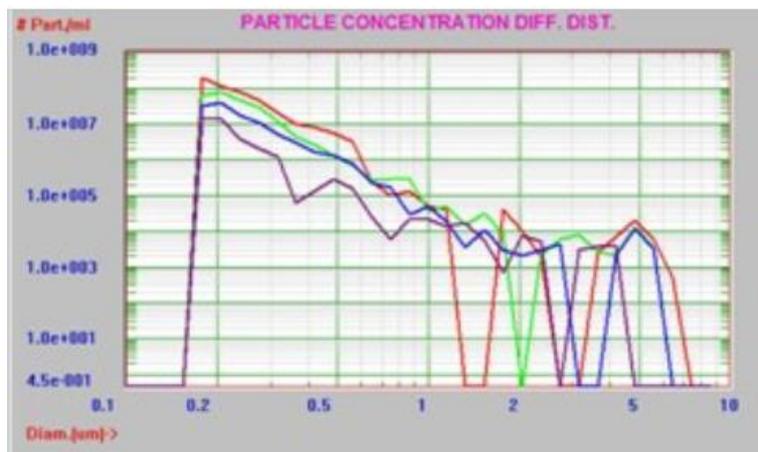


图 8: 微分分布，对数尺度

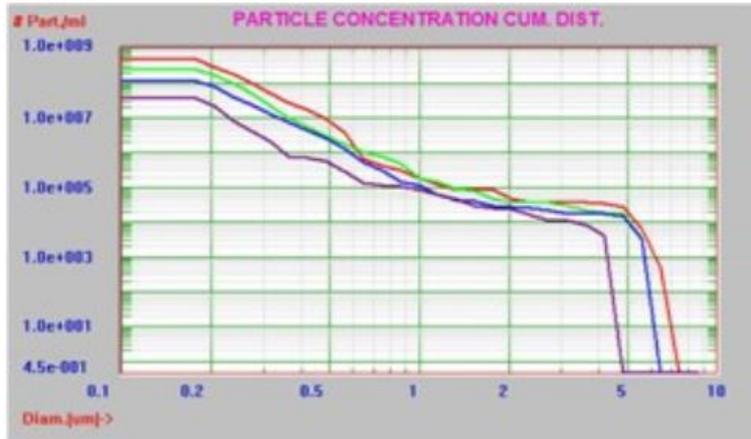


图 9: 积分分布, 对数尺度

结论

AccuSizer FX-Nano 提供了一种分析工具, 能够轻松量化蛋白质聚集体的大小和浓度。独特的两个传感器方法涵盖了动态范围的广泛动态范围, 可提供聚集蛋白尾巴的详细高分辨率视图。精确的计数/ mL 数据可用于比较不同浓度样品的结果。SIS 采样器可以处理此应用程序所需的小样本量。另外, 通过移除 FX-Nano 传感器, 该系统可用于标准的 USP <787>和<788>注射用颗粒物。

Particle Sizing Systems
8203 Kristel Circle, New Port Richey, FL 34668

Phone: +1 727•846•0866 | Fax: +1 727•846•0865

Website: www.pssnicomp.com

E-mail: sales@pssnicomp.com