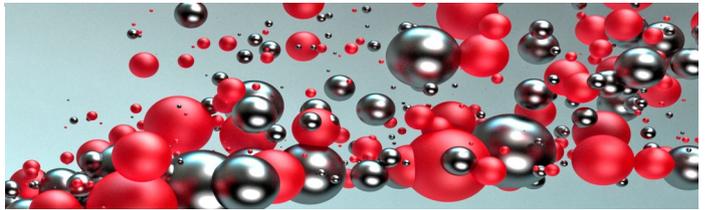


AN-CN-11

AccuSizer 780SIS 研究预充式注射器中硅油滴对蛋白质注射液中粒子数目的影响



摘要:

USP 787和USP788描述了治疗用蛋白质和医用注射液中怎样测量肉眼不可见的颗粒物。大部分这类药物是通过预充式注射器进行包装。这些注射器里都有硅油，因为硅油可以降低注射药物时注射器的阻力。这些硅油形成的乳滴在用显微镜方法进行计数统计的时候会造成一定的误差。本文主要通过使用AccuSizer 780SIS研究这些硅油滴在蛋白质注射液计数方面的影响。

简介:

注射药物颗粒物的检测主要包括肉眼可见和不可见两个方面。对于肉眼不可见的检测主要是通过液体颗粒计数或者显微镜两种方法来完成。后文中提到的检测过滤前后的粒子数量，主要是为了排除由于注射器中螺帽，机筒和活塞本身带来的额外的粒子影响。尽管和纤维，金属碎片等外来污染物相比，注射器中这些硅油粒所造成的安全危害较小，但是他们也可以通过液体颗粒计数来监测。并且预充式注射器内部的硅油乳粒会带来大量不同大小的颗粒。



图1

材料介绍:

注射器：实验中用到的注射器是来自 BD PosiFlush Normal Saline Syringe, 10 mL, Ref no. 306546 如图1.硅润滑油：医用的硅润滑油应用到注射器的螺帽，机筒和内壁，使得注射器可以更好的推动。

本文测量了盐水和盐水与蛋白质混合后在注射器中颗粒的变化。

蛋白质：Athens Research & Technology, Immunoglobulin G, Human Plasma, Lot no. IG2014-02, Cat no. 16-16-090707, lyophilized (冻干) from 22.4 mL 20 mM phosphate buffer (磷酸盐缓冲液), pH 7.4, w/ 150 mM NaCl & 0.05% sodium azide (叠氮化钠). 蛋白质在PBS(聚丁二酸丁二醇酯)中进行分散;磷酸盐缓冲药品, Sigma Aldrich P4417-50TAB。

方法学:

首先通过对注射器的粒子进行测量，没有进行过任何以下激活处理包括没有插入AccuSizer的样品管或者没有移除机筒并将其倒入一个干净的烧杯或者推动活塞进入一个干净的烧杯。

IgG蛋白用过滤的PBS溶液配成0.1mg/ml的溶液。用移液枪取0.5ml的溶液加入到包含过滤后的PBS溶液和食盐水中的10ml注射器中。使用AccuSizer仪器取1ml的样品不稀释直接测量，重复三次检查重复性。

检测仪器:

AccuSizer FX Nano SIS 仪器拥有两个传感器LE-400;0.5 μ m-100 μ m和FX Nano;0.15 μ m-10 μ m，如图2所示。AccuSizer SIS取样器可将进样量准确的下调至100 μ l。AccuSizer FX Nano SIS是仅有一个注射进样器和两个传感器，并没有增加检测器或者电脑的数量。

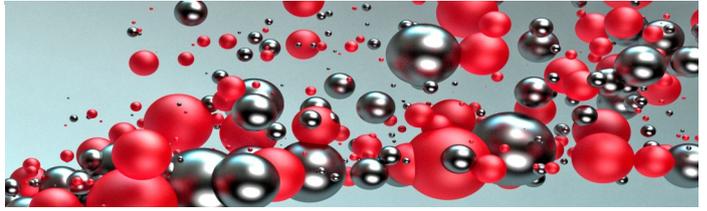


图2



AN-CN-11

AccuSizer 780SIS 研究预充式注射器中硅油滴对蛋白质注射液中粒子数目的影响



结果讨论:

从24个注射器中随机的选择了8个注射器。其中4个用只有LE400的传感器进行分析同时没有推动活塞，具体结果如图3所示，另外四个则将通过活塞将样品推到一个干净的烧杯中，如图4所示。横坐标X用来表示粒子的大小，纵坐标表示粒子的浓度 粒子数量/ml。

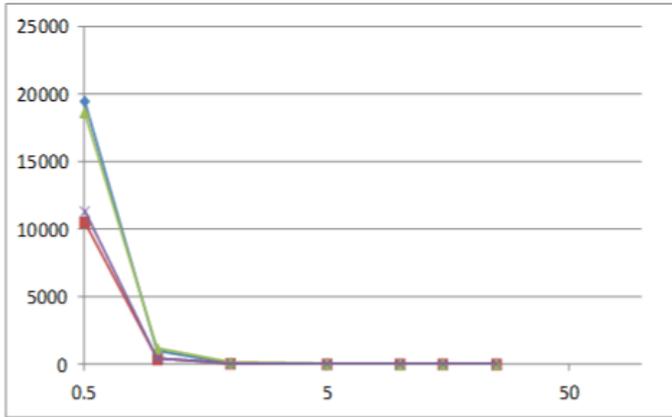


Figure 3: Without activation, sampled directly from the syringe

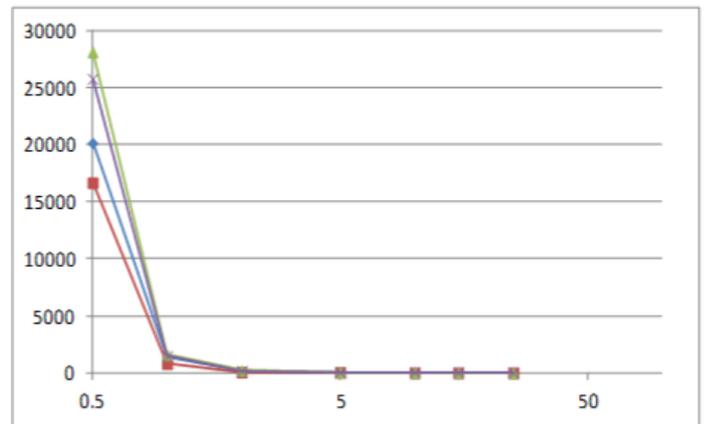


Figure 4: With activation, after extracting the sample by pushing the plunger

讨论:

实验设计的目的是期望通过推动活塞进入到烧杯中会因为硅油乳粒的存在而使得颗粒浓度有一定的增加。两个没有激活的样品在图标3可以看出大于0.5 μ m的粒子浓度约为10,000个/ml，另外的两个大于0.5 μ m的粒子浓度在20,000个/ml。激活的四个样品大于0.5 μ m的粒子浓度大约在16,000个/ml和28,000个/ml。说明注射器中硅油的存在会增加。

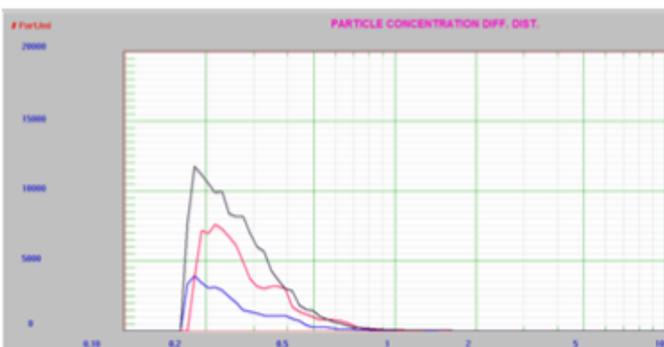


Figure 5: Saline (and silicone oil droplets) from three activated syringes

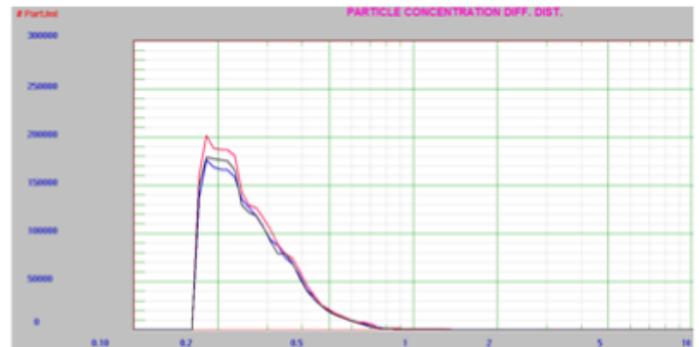


Figure 6: IgG protein in filtered PBS

蛋白质的测量结果:

USP787是用来描述治疗用蛋白质，同时USP788对于理想结果的判定通过标准是10 μ m和25 μ m，但是FDA建议检测更小的蛋白质粒子，这样才能给出更好的标准关于检测蛋白质聚集的标准。



AN-CN-11

AccuSizer 780SIS 研究预充式注射器中硅油滴对蛋白质注射液中粒子数目的影响

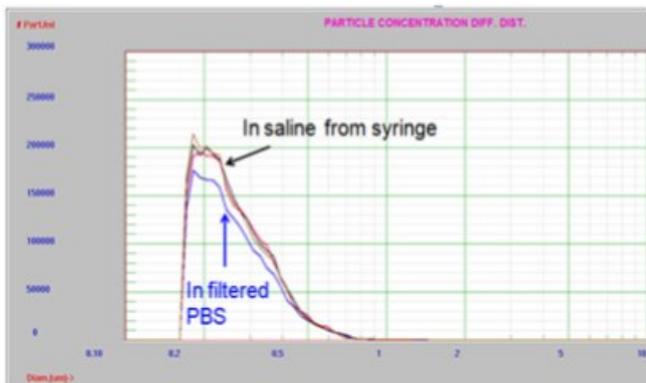
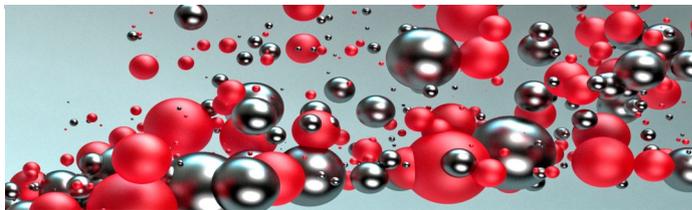


Figure7: Diluted 2:1 using filtered PBS (blue) and saline from the activated syringe.

三个激活的盐水的样品和分散在PBS里的IgG蛋白样品通过包含两个传感器的AccuSizer FX Nano SIS进行测量，结果如图5和图6。之后这蛋白质被过滤后额PBS（blue）：盐水=2：1的混合液进行稀释，具体结果如图7。

讨论：

可以从图5看出，注射器和注射器中由于硅油滴的存在引起的粒子数量的变化在更小的范围被发现。同时说明不同的注射器里硅油所造成的粒子数目也有区别。

AccuSizer 780 FX Nano SIS仪器可以对0.2µm-0.5µm的粒子进行计数，因为它的检测下限可以降到0.15µm。这种新的对于小粒子的敏感性的技术正在寻找其他领域的应用，它可以很好的应用到蛋白质的检测中了，如图6所示的蛋白质分散在过滤后的PBS溶液和图7所示的蛋白质和盐水混合的溶液。可以明显的区分出在盐水和蛋白质溶液中的粒子大小和数目。

结论：

AccuSizer 780 FX Nano SIS符合所有关于USP787和788的检测要求。同时对于分析不可见的粒子是最好的选择，因为它的检测下线可以精确到0.15µm，最小的检测样品量可以低到100µl。这种低量程的计数工具为实验提供更多有趣的结果，特别是可以帮助研发人员更好的在研究治疗和注射用的蛋白质聚集的问题。这种独特的技术为AccuSizer 780 FX Nano SIS提供了其他颗粒检测仪器所不具备的能力。它不仅是一个液体颗粒计数器还是一个粒度仪。

参考文献：

1. USP 787, Subvisible particulate matter in therapeutic protein injections;
2. USP 788, Particulate matter in injections;
3. PSS Application: Protein Aggregation, available at www.pssnicomp.cn.

