

用原位非接触测量技术 监测注射疫苗在注射器中的蛋白质聚集

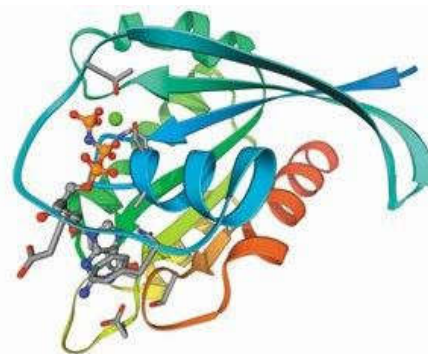
D. Jacob¹ ; B. Pedrono¹, S. Boj¹, S. Race²

1: Cordouan Technologies SAS, Pessac- FRANCE ; 2: Xigo nanotools Inc, Bethlehem- USA

关键词： 疫苗、蛋白质、原位测定、聚集、生物制药、非接触测量、纳米粒度仪、VASCO Kin、DLS

概述

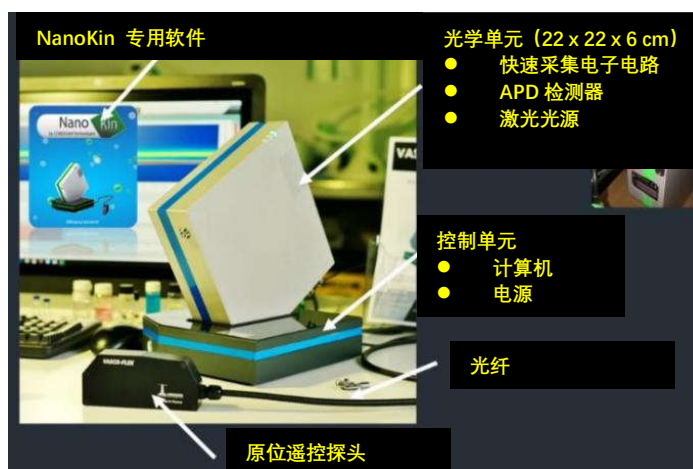
注射用生物制药产品中蛋白质和活性成分（API）的聚集仍然是影响产品稳定性和可用性的主要问题。蛋白质聚集可以发生在蛋白质治疗药物生命周期的所有阶段，包括表达，复性，纯化，灭菌，运输，储存和递送过程^[1, 2]。众所周知，蛋白质聚集的机制尚不清楚，但是在某些制造阶段会增加物理降解和聚集体形成的风险，例如配方组成，细胞培养过程中的微生物或药瓶污染物的影响，以及药物储存过程中存在的化学降解可能。特别是已经证明，储存容器的环境起着类似于预填充注射器的作用，例如，从橡胶塞中漏出的硅油和玻璃分层会诱发聚集。在国际上对生物制药产品控制的卫生法规越来越严格的背景下，在生产和储存过程中，对治疗性蛋白质药物的变性和降解过程进行原位监测，对生产商和研究人员来说是一个关键的竞争优势。



目前的测量技术和局限性

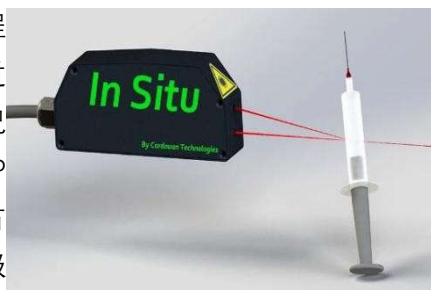
如今，许多不同的分析技术被用于研究微米级的蛋白质聚集体，例如光阻法（LO），动态图像法粒度分析技术（DIPA）的微流成像（Occhio IPAC）和库尔特计数法（CC）。对于亚微米聚集体的早期检测和量化，通常使用其他技术，如多角度静态光散射（MALS）与分离技术相结合，尺寸排阻色谱（SEC）、分析超速离心（AUC）和非对称流场流动分馏（AF4）^[3]。另外，批量动态光散射（DLS）是另一种有用的光学技术，用于在 SEC 或场流分馏（FFF）中遇到的稀释或剪切导致的聚集体解离监测，以及在许多条件或温度下表征聚集体。所有这些公认的技术在它们的使用范围内是互补和有效的，但是这些方法需要在测量之前或测量期间对样品进行一些特定的准备、转移和处理，这些过程可能会改变样品的聚集状态。所以，在许多情况下，不对样品进行任何操作和处理，直接在密封的小瓶或注射器等存储介质中进行测量是非常有必要的。但是前面提到的技术都不适合直接在注射剂中进行测量。这样就需要换一种思维：如果不能将样品带到测量仪器中，就将测量引入到样品中！

原位非接触测量：VASCO Kin[®] 概念



为了解决此类应用，法国 Cordouan 纳米技术公司开发了命名为 VASCO Kin[®] 的新系统（见左图），该系统基于实时原位非接触式远程 DLS 测量。DLS 是胶体科学和蛋白质表征研究中普遍采用的技术之一，它是基于对粒子布朗运动引起的散射光波动分析的成熟且非常强大的技术^[4]。它可以在一分钟内精确测量从 0.5nm 到 10um 的颗粒粒度。尽管当今商用 DLS 系统提供了不同的测量配置，但它们都要求用户取样，稀释，转移到样品池中，这些操作都可能会影响样品蛋白质的聚集状态。

VASCO Kin 是一种灵活的 DLS 系统，这得益于其独特的光纤远程探头（OFRP），使传统 DLS 的限制问题迎刃而解。OFRP 是一个经过优化的，高度耐用的光学机械组件，可以在无需对样品分批处理的情况下进行直接的、非接触的测量。通过特殊的光纤连接到光学单元，OFRP 将激光束射入样品中，并以 170° 的角度向后收集样品的散射光（参见右图）。连接配备专用快速采集电子电路的高灵敏度单光子雪崩光电二极管检测器（APD），实时监控散射光强度的波动，并通过强大的数学算法将其转换为时间分辨的粒度动力学分析。关 VASCO Kin 的更多详细信息，请参见^[5]。



疫苗注射器的测量

为了证明 VASCO Kin 实现在注射器中非接触原位测量的能力，我们对一种商用可注射流感疫苗进行了一系列粒径测量（见图 1-左）。这种疫苗是一种复杂的培养基，由多种不同成分混合而成：来自三种不同干细胞的去活化和碎片化的病毒，和包括 ppi 水（质子泵抑制剂）、氯化钾、氯化钠、生理盐水缓冲液和微量的鸡蛋蛋白（卵清蛋白）、甲醛、新霉素、辛醇 9 等几种赋形剂。为了进行测量，从塑料包装 1 中取出疫苗注射器（见图 1），并将其放置在距离 Kin 远程探头 6 cm 处的专用支架上（见图 1-右）。



图 1：流感疫苗注射器从其透明包装中取出(左)；带有 VASCO Kin 远程探头的测量装置(右)，安装在专用的可平移平台上，并放置在为实验目的而设计的支架前。

进一步的实验表明，即使不去除塑料透明包装进行测量，结果与去除包装的结果也非常一致。

为了比较和证明这种疫苗的老化效应，我们将两支疫苗分别储存在 7℃ 的冰箱中和保存在室温下。各储存 8 个月后，在相同的条件下测量了两个疫苗。其粒度分布结果如下图所示：

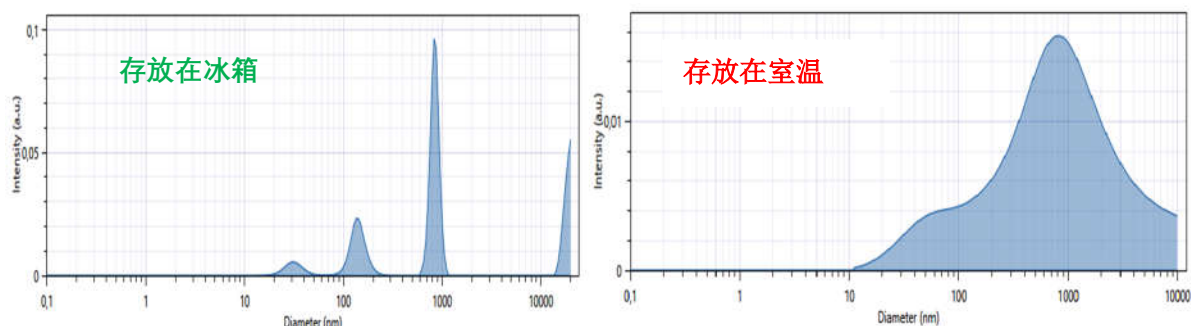


图 2：储存在冰箱和储存在室温疫苗的粒度分布测量结果

对于储存在冰箱中的疫苗(图 2 左)，可以注意到样品的粒度分布相对复杂，显示了从 30 nm 到 800 nm 的三个峰值。这些峰值分别对应病毒片段和蛋白质。另外，还有粒度超过 10 μm 的团聚体存在。

相比之下(图 2 右)，该疫苗储存在室温下清楚地显示了一些明显的粒度分布的变化。现在看来像是一个从 10 nm 到 10 μm 广泛的连续分布。上述结果首次证明了原位 DLS 测量注射器内样品的有效性和准确性，并为进一步研究所发生的粒度变化机理奠定了基础。

结论

用 VASCO Kin 纳米粒度仪及其远程光纤探头进行非接触式原位直接测量注射疫苗的纳米粒径及其分布，这具有创新性的意义。它不仅省去了样品的前处理步骤，节约了比色皿等耗材，而且为该纳米粒度测量系统现场监测生物制药产品中蛋白质聚集的情况开辟了新的应用领域。VASCO Kin 还可以用于在各种类型的反应器配置耦合^[6]（双夹套玻璃反应器，高压和高温超临界 CO₂ 高压釜，微波反应器，微流体芯片等）中实时监控纳米粒子合成动力学。有关与其它装置联用的详细信息请查阅 NOTE-C02。

参考文献:

- [1] E.Y. Chi, "Excipients and their Effects on the Quality of Biologics", AAPS J. (2012), accessed January 2015.
- [2] M. Hasija, L. Li, and N. Rahman et al., Vaccine: Development and Therapy
- [3] R. Manning et al., "Review of Orthogonal Methods to SEC for Quantitation and Characterization of Protein Aggregates," BioPharm International 27 (12)
- [4] Berne, B.J.; Pecora, R. Dynamic Light Scattering; Wiley, New York, 2nd edition- 2000 (ISBN 0-486-41155-9)
- [5] VASCO Kin : <https://www.cordouan-tech.com/products/vasco-kin/>
- [6] A. Schwamberger & al, "Combining SAXS and DLS for simultaneous measurements and time-resolved monitoring of nanoparticle synthesis", Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 343 (2015) 116–122