

人血白蛋白中蛋白聚合物的研究

徐明明, 赵沁, 周勤, 郑璐侠, 陈钢, 邵泓* (上海市食品药品检验研究院, 国家食品药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203)

摘要 目的: 研究人血白蛋白中不同尺寸的蛋白聚合物的现状, 探讨不同尺寸蛋白聚合物之间的相关性, 改进检测方法, 提升血液制品类生物制品质量。方法: 采用分子排阻色谱法、微流成像颗粒分析技术、光阻法、人工灯检法分别对5家企业的人血白蛋白样品中纳米级可溶的聚合物、1~100 μm 亚可见颗粒、 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒、 $\geq 50 \mu\text{m}$ 的可见颗粒进行检测。结果: 纳米级可溶的聚合物结果在不同企业间存在一定差异, 企业D、企业E的含量低于其他3家企业。亚可见颗粒结果在不同企业间存在较大差异, 其中企业C约是企业B数量的10倍。不溶性微粒和可见异物结果各企业间基本无差异。结论: 4种不同的分析方法检测到的不同尺寸蛋白聚合物结果相互之间没有明显的相关性, 且蛋白的单体、低聚物、亚微米颗粒、亚可见颗粒、可见颗粒聚合途径受多种因素影响, 小分子蛋白聚合物的含量多少并不是大分子亚可见颗粒和可见颗粒形成的唯一前提。因此, 监测和控制部分蛋白聚合物不能获取其他蛋白聚合物的信息。在质量标准中应联合采用多种方法, 分别对不同尺寸的蛋白聚合物进行检测和限定, 全面控制药品质量。

关键词: 人血白蛋白; 蛋白聚合物; 亚可见颗粒; 不溶性微粒; 可见颗粒/可见异物

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)11-1246-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.11.007

Research of Protein Aggregates in Human Albumin

Xu Mingming, Zhao Qin, Zhou Qin, Zheng Luxia, Chen Gang, Shao Hong* (NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective: To study protein aggregates of different sizes in human albumin and discuss their correlation, so as to improve the detection methods and promote the quality of biological products of human blood. **Methods:** SEC-HPLC, light obscuration particle count test, Micro-flow imaging (MFI) and lamp test were used separately to study the nanometer soluble aggregates, 1~100 μm subvisible particulate matter, $\geq 10\mu\text{m}$ and $\geq 25\mu\text{m}$ particulate matter, $\geq 50\mu\text{m}$ visible particulates in human albumin from five enterprises. **Results:** The results of nanometer soluble aggregates shows some differences among different enterprises, and the content of enterprise D and E are lower than that in other three enterprises. The results of subvisible particulate matter vary greatly among different enterprises, and the number of the subvisible particulate matter of enterprise C is about ten times of enterprise B. The result of particulate matter and visible particulates shows little difference among enterprises. **Conclusion:** There is no significant correlation between the results of different size protein aggregates

with four different analysis methods. And the polymerization pathway of protein monomer, oligomer, submicro particulate matter, subvisible particulate matter and visible particulate matter is affected by many factors. The content of small molecule polymer is not the only premise for the formation of large molecule particulate matter and visible particles. Therefore, monitoring and controlling some protein aggregates can not obtain information about others. In the quality standard, various methods should be combined to detect and limit protein aggregates of different sizes in specification in order to control the quality of drugs.

Keywords: human albumin; protein aggregates; subvisible particulate matter; particulate matter; visible particulates

人血白蛋白由健康人血浆经低温乙醇蛋白分离法或经批准的其他分离法分离纯化,并经病毒灭活后制成。其主要适应症为失血创伤、烧伤引起的休克等,临床上一般采用静脉滴注或静脉推注的方法输入患者体内^[1]。人血白蛋白属于治疗类蛋白质,在其生产和储存过程中蛋白的聚集难以避免,形成的蛋白聚合物不仅会降低疗效,更严重的是蛋白聚合物通过静脉注射进入患者体内会诱发免疫反应,甚至引起过敏性休克,严重则危及生命^[2]。因此蛋白聚合物是生物制药最棘手的不良产物之一,也是药品监督管理部门关注并监控的重点。

蛋白聚合物异质性大、形貌多样、尺寸(通常以粒径表示)分布极广,从几纳米到数百微米均有分布。文献^[3]根据蛋白聚合物尺寸大小大致分为纳米级可溶的聚合物($<100\text{ nm}$,主要为二聚体和多聚体)、亚微米颗粒($100\sim 1000\text{ nm}$,包括可溶的聚合物)、亚可见颗粒($1\sim 100\ \mu\text{m}$,主要为不溶的半透明和高透明颗粒)、可见颗粒($\geq 50\ \mu\text{m}$,主要为不溶的颗粒和絮状物)。目前,美国药典(The United States Pharmacopeia, USP)、欧洲药典、《日本药局方》《中华人民共和国药典》(以下称《中国药典》)针对蛋白制剂中纳米级可溶的聚合物主要是采用分子排阻色谱法(SEC-HPLC)和电泳法等方法,亚可见颗粒/不溶性微粒主要是采用光阻法和显微计数法等方法,可见颗粒/可见异物则主要采用灯检法等方法进行检测和限定。除了药典收载的方法,USP通则1787^[4]中推荐以及文献^[2,5]均报道了动态光散射法、电子显微技术、纳米粒子跟踪分析技术、微流成像颗粒分析技术(MFI)等多种分析方法对不同尺寸大小的蛋白聚合物进行检测,目前尚无一种技术或方法能对所有尺寸大小的蛋白聚合物进行全方位的检测。

人血白蛋白中的蛋白聚合物属于固有颗粒,它的产生理论上是一个从寡聚到多聚,粒径从小到大的动态变化过程,小粒径聚合物占绝大多数,并且小粒径聚合物的多少直接影响大粒径聚合物的形成。《中国药典》2020年版^[6]收载的人血白蛋白质量标准中,针对蛋白聚合物,采用SEC-HPLC法控制多聚体(纳米级可溶的聚合物)的含量,采用光阻法控制不溶性微粒($\geq 10\ \mu\text{m}$ 和 $\geq 25\ \mu\text{m}$ 不溶的且不透明的聚合物和其他颗粒)的数量,采用人工灯检法控制可见异物($\geq 50\ \mu\text{m}$ 不溶的聚合物和其他异物)。本文在上述3种分析方法的基础上,还采用MFI技术检测人血白蛋白中亚可见颗粒($1\sim 100\ \mu\text{m}$ 不溶的不透明、半透明和高透明颗粒),因缺少仪器未对亚微米颗粒($100\sim 1000\text{ nm}$)进行检测,仅根据4种不同分析方法的检测结果探讨人血白蛋白样品中不同粒径的蛋白聚合物之间的相关性,小粒径聚合物的多少是否显著影响大粒径聚合物的形成,通过监测和控制部分小粒径蛋白聚合物的含量是否可以达到控制所有蛋白聚合物的目的。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪,配备2489 UV检测器,Empower3色谱工作站(Waters公司);MFI 5200型微流成像分析仪,配备Bot1自动进样器,MVSS软件(Protein Simple公司);GWF-8JA微粒分析仪(天津天河医疗仪器有限公司);YB-2型澄明度检测仪(天津大学精密仪器厂)。

1.2 样品和试样

人血白蛋白样品为5家生产企业5个不同批号样品,详见表1(本研究收集了5家企业的27批样品进行试验,每家企业3~7批不等,选取了每家企业的1批样品)。15 μm 微粒标准品(批号:CC15, Thermo Scientific公司,浓度:3000粒 $\cdot\text{mL}^{-1}$);磷酸二

氢钠、磷酸氢二钠和异丙醇等均为色谱纯。

2 方法

2.1 SEC-HPLC法

采用《中国药典》2020年版^[6]通则3121人血白蛋白多聚体测定法, TSK3000SW色谱柱(7.8 mm × 600 mm, 10 μm), 流动相为含1%异丙醇的pH 7.0、0.2 mol · mL⁻¹磷酸盐缓冲液, 柱温25℃, 流速0.6 mL · min⁻¹, 检测波长为280 nm。用流动相将供试品稀释至12 mg · mL⁻¹, 上样量为20 μL, 每个样品取4瓶, 每瓶重复测定2次, 按面积归一化法计算纳米级可溶的聚合物含量(包含多聚体和二聚体)。

2.2 MFI技术

每次进样前彻底冲洗仪器, 并采用自动进样器吹打的功能将样品混匀。用0.2 mL待测样品冲洗管路, 然后进行照度优化(执行照度优化时仪器将再次用0.22 mL样品冲洗管路), 再进行样品分析和数据采集。样品分析体积为0.43 mL。15 μm微粒标准品重复测定3次。每个样品取4瓶, 每瓶重复测定3次, 采用仪器自带的MVSS软件提取微粒的图像、粒径和计数等信息用于进一步分析。

2.3 光阻法

采用《中国药典》2020年版^[6]通则0903不溶性

微粒检查法第一法光阻法进行测定。取样品小心翻转20次使溶液混合均匀, 静置适当时间脱气, 小心开启容器, 直接将容器置于取样器上。每个样品取4瓶, 分别测定4次, 每次取样5 mL, 弃去第1次数据, 取后续测定结果的平均值计算。

2.4 人工灯检法

采用《中国药典》2020年版^[6]通则0904法可见异物法第一法(灯检法): 将供试品置遮光板边缘处, 明视距离通常为25 cm, 手持容器颈部, 轻轻旋转和反转容器(但应避免产生气泡), 分别在黑色和白色背景下目视检查, 按直、横、倒三步法旋转检视, 重复观察, 总检查时限为20 s, 光照度为1000 lx。每批样品取20瓶检查。

3 结果与分析

3.1 纳米级可溶聚合物结果与分析

SEC-HPLC法根据被分析物的尺寸大小进行分离, 可对纳米(通常≤30 nm)尺寸范围的可溶蛋白聚合物进行检测, 并报告其在所有蛋白中的百分含量。5批样品中纳米级可溶聚合物含量为5.9%~9.6%, 不同企业存在一定差异, 企业D和企业E的样品中可溶聚合物含量低于其他3家企业, 具体数据见表1。

表1 人血白蛋白中纳米级可溶聚合物结果

企业	批号	可溶聚合物	
		含量 /%	RSD/% (n=8)
A	201910042	9.0	0.5
B	201907AZ03	9.6	0.1
C	20180722A	8.7	0.2
D	20190730	6.8	0.7
E	20190605	5.9	0.1

3.2 亚可见颗粒结果与分析

MFI技术^[4, 7-11]是近几年开发的新型技术, 其检测原理是精确控制样品流经检测池的流速, 高频成像检测器对动态连续的样品中的颗粒物进行静态的图像捕获, 获取一系列的颗粒物照片。通过软件对所获取到的颗粒物照片进行形态学参数描述和计数分析, 根据形态学参数可对颗粒进行大致分类。

该方法能分辨出与背景差别较小的透明或半透明微粒, 大幅提高对蛋白颗粒的检测灵敏度, 因此MFI可对1~100 μm的不透明颗粒、半透明和高透明的蛋白颗粒绝对数量进行检测, 并从形态学上区分不同颗粒来源, 比如蛋白聚体、硅油、气泡、纤维等, 是可应用于药物质量控制的新型技术。

15 μm微粒标准品测得的粒径均值为15.09 μm

(RSD为0.3%, $n=3$), 12~18 μm 粒径范围的颗粒数为2465粒· mL^{-1} (RSD为2.1%, $n=3$)。5批样品中含有的亚可见颗粒数量为775.0~7345.3粒· mL^{-1} , 不同企业间存在较大差异, 企业B与企业C的结果相差约10倍, 其他企业的样品颗粒数居于这2个企业之间。另外样品中检测到的亚可见颗粒主要

为蛋白颗粒(约占总颗粒的95%), 颗粒的粒径以1~10 μm 为主(约占总颗粒的99%以上)。同一企业同一批次样品不同瓶之间的亚可见颗粒数量存在一定差异, 12次测定结果的RSD为6.9%~32.2%, 具体数据见表2和图1。

表2 人血白蛋白中亚可见颗粒结果

企业	批号	1~100 μm 所有颗粒		1~100 μm 蛋白颗粒		$\geq 10 \mu\text{m}$ 颗粒	$\geq 25 \mu\text{m}$ 颗粒
		浓度/ (粒· mL^{-1})	RSD/% ($n=12$)	浓度/ (粒· mL^{-1})	RSD/% ($n=12$)	浓度/ (粒· mL^{-1})	浓度/ (粒· mL^{-1})
A	201910042	3516.8	6.9	3368.6	6.7	21.3	0.5
B	201907AZ03	775.0	16.5	729.5	17.5	8.5	0.8
C	20180722A	7345.3	16.6	7092.6	16.7	25.7	0.0
D	20190730	2941.2	12.3	2870.0	12.3	17.1	0.4
E	20190605	3291.5	32.2	3071.6	25.4	32.1	2.7

亚可见颗粒结果 (粒· mL^{-1})

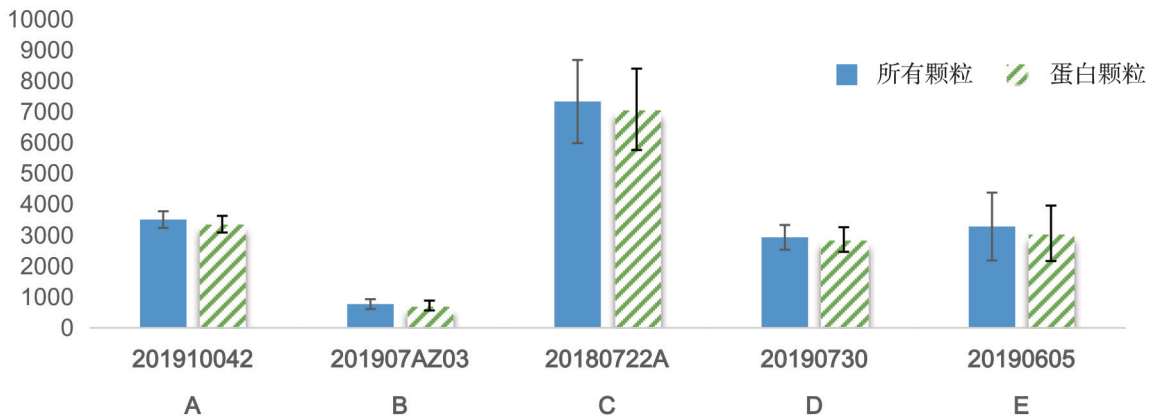


图1 人血白蛋白中亚可见颗粒结果

3.3 不溶性微粒结果与分析

光阻法的检测原理^[10]为当液体中的微粒通过窄细的检测通道时, 与液体流向垂直的入射光被微粒阻挡而减弱, 使得由传感器输出的信号降低, 信号变化与微粒的截面积大小相关, 可实现对不透明的颗粒绝对数量的检测。但半透明和透明的蛋白颗

粒与液体之间的对比度差异较小, 较难被检测。5批样品中, $\geq 10 \mu\text{m}$ 的颗粒均为0.9~1.7粒· mL^{-1} , $\geq 25 \mu\text{m}$ 的颗粒均为0.03~0.4粒· mL^{-1} , 含有的 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的颗粒数基本无差异, 具体数据见表3。

表3 人血白蛋白中不溶性微粒数量

企业	批号	$\geq 10 \mu\text{m}$ 颗粒	$\geq 25 \mu\text{m}$ 颗粒
		浓度 / (粒 · mL ⁻¹)	浓度 / (粒 · mL ⁻¹)
A	201910042	1.2	0.4
B	201907AZ03	0.9	0.1
C	20180722A	1.5	0.3
D	20190730	1.3	0.03
E	20190605	1.7	0.1

3.4 可见异物结果与分析

人工灯检法^[9]是在合适的光源照度下检测是否存在不得检出的明显可见异物或超出规定量的细微可见异物,对大量蛋白聚体的产生具有一定的提示价值,但灵敏度有限。5批样品的可见异物均符合规定,且不同企业之间基本无差异。

3.5 不同分析方法的检测结果之间的相关性

4种不同检测方法的测定结果汇总详见表4。人工灯检法是一种简单的检测手段,MFI技术和光阻法测定亚可见颗粒的绝对数量,SEC-HPLC法测定聚合物在所有蛋白中的百分含量。从计量方式上,肉眼判断、颗粒的绝对数量与颗粒在所有蛋白中的百分含量之间没有可比性。但是从结果来看,纳米级可溶的聚合物含量相对较低的企业D和企业E,其相应的不溶性微粒、亚可见颗粒、可见异物结果并没有明显低于其他3家企业,因此小粒径聚合物的多少没有显著影响大粒径聚合物的形成,人血白蛋白样品中不同尺寸蛋白聚合物之间没有明显的相关性。

Barnard等^[8]对亚可见颗粒的蛋白质量进行了估算,某一粒径颗粒的蛋白质量=颗粒的体积×密

度×颗粒数×0.75,颗粒的体积= $4/3 \pi R^3$,密度为 $1.43 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (文献^[12]报道的30种不同蛋白的平均密度),0.75为蛋白在整个聚合物体积中占比(因为聚合物内部同时含有水和蛋白,Barnard等假设含75%的蛋白,25%的水)。以 $50 \mu\text{m}$ (MFI描述为等效圆直径,即与检测到颗粒占据相同的像素面积的圆形的直径)颗粒浓度为 $1 \text{ 粒} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为例,蛋白质量约为 $7 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,占人血白蛋白(浓度 $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的0.000035%。也就是人血白蛋白中含量为0.1%的聚合物需要 $50 \mu\text{m}$ 颗粒的浓度为 $2857 \text{ 粒} \cdot \text{mL}^{-1}$,需要 $10 \mu\text{m}$ 颗粒的浓度为 $357125 \text{ 粒} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此相对于SEC方法,MFI技术是一个非常灵敏的微米粒径蛋白聚合物的检测技术。

另外有文献^[13]报道,蛋白从单体、低聚物、亚微米颗粒、亚可见颗粒、可见颗粒这个聚合途径中没有任何一个步骤是必须的,小分子可溶的蛋白聚合物的含量多少并不是大分子亚可见颗粒和可见颗粒形成的唯一前提,蛋白的聚集不仅与蛋白浓度相关,还与其他外界的影响因素相关。

表4 不同检测方法测定结果汇总

检测方法	检测颗粒尺寸	结果计量	各企业样品测定结果的差异
SEC-HPLC法	纳米级可溶的聚合物	占有所有蛋白的百分含量	企业D和企业E低于其他3家企业
MFI技术	$1 \sim 100 \mu\text{m}$ 亚可见颗粒	绝对数量	企业B最少,企业C最多,差约10倍,其他企业介于二者之间
光阻法	$\geq 10 \mu\text{m}$ 、 $25 \mu\text{m}$ 不溶性微粒	绝对数量	基本无差异
灯检法	$\geq 50 \mu\text{m}$ 可见颗粒/可见异物	肉眼判断	基本无差异

4 讨论

4.1 同一企业相同工艺生产的不同批次产品之间的差异

本研究收集了5家企业的27批样品进行实验,每家企业3~7批不等。每家企业不同批次样品的结果差异均较小,并且由于数据量较大,本文未进行全部展示,只选取了每家企业1批样品进行结果展示。但是每家企业均提供了同一时期的几批样品,因此未能对不同储存时间的样品进行检测以考察储存时间对蛋白聚合物形成的影响。后续研究会考察该因素。

4.2 蛋白聚合物与颗粒物、不溶性微粒、可见异物等的关系

USP43通则788^[14]定义颗粒物为除气泡外可流动的、随机存在于溶液中且不溶于溶液的颗粒。USP43通则1787^[4]进一步将颗粒物分为亚可见颗粒和可见颗粒,亚可见颗粒的粒径通常为2~100 μm,而可见颗粒的粒径通常大于100 μm。USP43通则1787^[4]中的亚可见颗粒和可见颗粒分别为《中国药典》2020年版^[6]中描述的不溶性微粒和可见异物,但可见异物的粒径或长度通常大于50 μm。

治疗类蛋白制剂中的亚可见颗粒/不溶性微粒、可见颗粒/可见异物均包括了蛋白类和非蛋白类颗粒。而蛋白类亚可见、可见颗粒是治疗类蛋白制剂中专属的一类不良产物,由蛋白聚集产生。因此严格意义上来说,文献^[1]中蛋白聚合物根据分子尺寸大小分类为纳米级可溶的聚合物、蛋白类亚微米颗粒、蛋白类亚可见颗粒、蛋白类可见颗粒。另外,理论上蛋白聚合物专指由单一蛋白形成的聚合物,但是蛋白在聚集的过程中不可避免地会与其他粒子如硅油等发生缔合,因此蛋白聚合物包括了单一蛋白聚合物和蛋白与非蛋白的混合聚合物。

理论上亚可见颗粒即不溶性微粒,但是光阻法测定的不溶性微粒主要为不透明的颗粒,MFI测定的亚可见颗粒为不透明、半透明和透明的颗粒,因此MFI测定的亚可见颗粒结果远高于光阻法测定的不溶性微粒结果。MFI还能通过图像进行参数分析进而判断颗粒是否为蛋白聚体,有助于对颗粒的来源进行分析并进行有针对性的控制,这也使MFI检测更有意义。

4.3 蛋白聚合物为固有颗粒

USP43通则1787^[4]从来源上将颗粒物分为外来

颗粒、内在颗粒和固有颗粒。外来颗粒与产品和生产过程无关,是外来的、非预期的物质,如来自人的衣服碎屑和毛发等;内在颗粒与产品和生产过程相关,是生产过程中产生或随着时间变化产生,如生产过程中使用的硅油等;固有颗粒则是产品属性相关的一种预期的物理状态或颗粒,在治疗类蛋白制剂中主要指蛋白聚合物。因此从来源上看,蛋白聚合物属于固有颗粒,应采用适宜的方法增加对固有颗粒的理解和控制。

4.4 国内外药典对颗粒物监控的要求和趋势

各国药典目前均仅对10 μm和25 μm以上的不溶性微粒,以及对≥50 μm的可见异物进行监控,判定标准基本一致。对10 μm以下的颗粒未作任何限定。文献^[15]报道可知,对人体来说,2 μm以上的颗粒不能参加肾交换排出体外而残留在体内,对人存在长期、潜在的危害。因此,应对2~10 μm的颗粒进行检测与分析,USP通则787^[16]也推荐采用包括MFI技术在内的多种技术对小于10 μm的颗粒进行关注,目前已有企业对产品中的这部分颗粒进行了监测。

4.5 联合采用多种分析方法获取蛋白聚合物分布的全面特征

有许多可用的技术来测量和表征蛋白聚合物,每种技术分析蛋白聚合物特定属性的能力不同,控制角度不同,各有其优点和局限性。由于蛋白聚合物的聚合机制十分复杂,目前尚无一种技术或方法能够同时满足所有种类和尺寸大小的聚合物的检测要求,将纳米到微米甚至毫米级别的蛋白聚合物全部表征。

在产品的研发过程中,应对蛋白聚合物的深入描述,采用多种方法联用全面表征蛋白聚合物的形成和分布。通过使用正交的方法,可以更好地确定颗粒的性质(外来的、内在的或固有的)、大小分布等信息,从而对颗粒的存在进行风险评估,并帮助识别潜在的形成机制等,为建立一个合理的、全面的蛋白聚合物控制策略提供基础。

在质量标准中,应在蛋白聚合物的深入描述的基础上制订控制策略。文献^[12]报道,聚集体通常以连续体的形式存在,但是纳米级可溶的聚合物和亚可见颗粒、可见颗粒的形成不具有—致性,例如依靠光阻法测定≥10 μm和≥25 μm颗粒含量不能揭示1~10 μm微粒的变化和趋势,因此应采用

多种方法分别对不同粒径的蛋白聚合物进行分析和限定。

本研究采用的几种分析方法结果表明,人血白蛋白样品中不同尺寸蛋白聚合物之间没有明显的相关性,文献^[13]也报道,蛋白的单体、低聚物、亚微米颗粒、亚可见颗粒、可见颗粒的聚合途径受多种因素影响,小分子蛋白聚合物含量的多少并不是大分子亚可见颗粒和可见颗粒形成的唯一前提。因此,监测和控制部分蛋白聚合物的含量不能获取其他蛋白聚合物的信息。在质量标准中应联合采用多种方法,避免采用单一方法的局限性,全面控制药品质量。

参考文献:

- [1] 丁锐,纪宏,余立.人血白蛋白不溶性微粒检测方法的建立及测定结果[J].中国医院药学杂志,2010,30(14):1197-1200.
- [2] 高恺旻,颜晓梅.生物制药领域蛋白质团聚检测技术的研究进展[J].分析化学,2018,10(46):1507-1517.
- [3] Linda O Narahi, Jeremy Schmit, Karoline Bechtold-Peters, et al. Classification of Protein Aggregates[J]. Journal of Pharmaceutical Science, 2012, 101(2): 493-498.
- [4] USP-NF. <1787> Measurement of Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections[S]. 2020.
- [5] Linda O Narhi, Vincent Corvari, Dean C Ripple, et al. Subvisible (2-100 μm) Particle Analysis During Biotherapeutic Drug Product Development: Part 1 Considerations and Strategy[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104(6): 1899-1908.
- [6] 中华人民共和国药典:三部[S]. 2020.
- [7] Zahir S Akhunzada, Mario Hubert, Erinc Sahin, et al. Separation, Characterization and Discrimination Analysis of Subvisible Particles in Biologics Formulations[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2019, 20(3): 1-12.
- [8] James G Branard, Satish Singh, Theodore W Randolph, et al. Subvisible Particle Counting Provides a Sensitive Method of Detecting and Quantifying Aggregation of Monoclonal Antibody Caused by Freeze-thawing: Insights into the Roles of Particles in the Protein Aggregation Pathway[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 2(100): 492-503.
- [9] 郭莎,张峰,刘春雨,等.一种抗TNF α单抗不同粒径级别蛋白聚体监测结果的比较与评价[J].中国药事,2018,32(8):1073-1078.
- [10] 郭莎,张峰,刘春雨,等.过滤对一种IgG2亚型EGFR单抗中不溶性微粒的影响[J].中国药事,2018,32(9):1245-1250.
- [11] 郭莎,王开芹,武刚,等.抗PD-L1单抗的质量控制研究[J].药物分析杂志,2019,39(1):13-22.
- [12] Michael L Quillin, Brian W Matthews. Accurate Calculation of the Density of Proteins[J]. Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography, 2000, 56(7): 791-794.
- [13] B Robert Simler, Guo DH, Jennifer E Dahl, et al. Mechanistic Complexity of Subvisible Particle Formation: Links to Protein Aggregation Are Highly Specific[J]. Journal of Pharmaceutical Science, 2012, 101(11): 4140-4154.
- [14] USP-NF. <788> Particulate Matter in Injections[S]. 2020.
- [15] Food and Drug Administration (FDA). Guidance for Industry: Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products[S]. 2014.
- [16] USP-NF. <787> Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections[S]. 2020.

(收稿日期 2021年5月17日 编辑 肖妍)