

单抗制剂中典型不溶性微粒的形态特征分析

郭莎^{1#}, 李萌^{2#}, 贾哲^{1,3}, 贺鹏飞¹, 高洁¹, 韩静², 吴昊^{2*}, 王兰^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629; 2. 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016; 3. 烟台大学药学院, 烟台 264005)

摘要 目的: 分析单克隆抗体(简称单抗)中典型不溶性微粒图片特征, 建立典型不溶性微粒的图谱特征数据库和相应的预警机制。方法: 通过采用微流成像技术检测反复冻融、含气泡或硅油、酶解、氧化等不同条件下的单抗中存在的不可溶性微粒, 筛选关键特征参数用于区别典型不溶性微粒。结果: 不同类型不溶性微粒长宽比、密实度、强度、粗糙度和透明度等参数有明显区别, 以此可区分不同类型不溶性微粒。此外, 获得了不同种类微粒的关键形态特征, 初步建立了图谱特征数据库。结论: 利用微流成像技术建立对典型不溶性微粒进行比较和分类的方法, 可以建立相应预警机制, 对单抗中不溶性微粒进行溯源分析和风险评估。

关键词: 单克隆抗体; 微流成像技术; 不溶性微粒; 形态表征; 安全性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)07-0787-11
doi:10.16153/j.1002-7777.2023.07.008

Morphological Characterization of Typical Insoluble Particles in Monoclonal Antibody Formulation

Guo Sha^{1#}, Li Meng^{2#}, Jia Zhe^{1,3}, He Pengfei¹, Gao Jie¹, Han Jing², Wu Hao^{2*}, Wang Lan^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China; 2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract Objective: To analyze the picture characteristics of typical insoluble particles in monoclonal antibody (mAb) solution and establish the database of typical insoluble particle footprint and associated warning mechanism. **Methods:** Different types of insoluble particles which were generated by repeated freezing-thawing mAb solutions, addition of silicone oil, air bubbles, enzymolysis of mAb samples, and oxidized mAb samples, which were detected by Flow Imaging Technology to sort out the critical characteristic parameters which could be selected to distinguish typical insoluble particles. **Results:** The aspect ratio, compactness, intensity, roughness, transparency and other parameters of different types of insoluble particles were obviously different, so that

基金项目: 2020年国家药品标准提高项目课题眼用注射剂的不溶性微粒检测(编号 2020S11); 辽宁省科技厅省博士科研启动基金计划项目(编号 2021-BS-131)

作者简介: 郭莎 Tel: (010) 53852177; E-mail: guosha@nifdc.org.cn
并列第一作者: 李萌 Tel: 18801313865; E-mail: 18801313865@163.com
通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn
吴昊 Tel: 13904221830; E-mail: haowu@syphu.edu.cn

different types of insoluble particles could be distinguished. In addition, the critical morphological characteristic of different types of particles were obtained to preliminarily establish the database of typical insoluble particle footprint. **Conclusion:** The Flow Imaging Technology-based method that could be used to compare and classify typical insoluble particle were invented to establish the corresponding warning system and carry out traceability analysis and risk assessment of insoluble particles in mAb.

Keywords: monoclonal antibody; flow imaging technology; insoluble particles; morphological characterization; safety

从1986年第一个获得上市许可的单克隆抗体（简称单抗）产品，至今已有超过100种单抗经过临床试验成功获批上市。越来越多的患者能够使用高效、可负担的单抗药物，但是随着大量的单抗制剂投入到市场，药品的安全问题变得尤为重要^[1-2]。注射剂中不溶性微粒的超标会引起病患不正常的免疫应答、产生中和抗体及严重副作用^[3-4]，因此，不溶性微粒是影响单抗药物安全性的重要因素之一。

不溶性微粒容易在药品的生产、储存、运输和使用等过程中形成^[2]，例如药品在纯化过程中，pH值和离子强度的变化可能会引起蛋白质空间构象的改变，使蛋白质聚集成寡聚体和微米级不溶性微粒。又如，内包材（如预充式注射器）中往往存在硅油，而析出的硅油液滴会形成微米级的颗粒，蛋白质分子也会吸附在硅油-水的界面上，发生空间构象的改变，增加药品的免疫原性^[3]。再如，药品在运输和使用中不可避免地会经受很多的外界应力，如振荡等机械冲击力、流体的剪应力等，这些应力会使蛋白质构象改变、形成不溶性微粒。由此可见，不溶性微粒可在单抗药物全生命周期管理的各个阶段产生，其产生也是药品本身或药品所在体系不稳定性的体现。

2020年版《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）对于静脉注射剂中 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒的含量有明确的规定和要求^[5]。目前已上市药品都应满足药典要求，但在因不良反应而召回的药品中，仍存在着由于不溶性微粒超标而引起安全风险。这是因为《中国药典》中规定采用光阻法和显微镜法对注射剂中的不溶性微粒进行检测，但是光阻法和显微镜法在对不溶性微粒的检测上有一定的局限性，因原理所限会存在计数偏低的情况^[6]。为了更精确地检测制剂中的不溶性微

粒含量，一般会采用微流成像法作为补充，对制剂中不溶性微粒进行表征和统计^[7]。其原理为高速摄像机对通过微通道流通池中的样品进行拍照，记录样品中不溶性微粒的形态特征，并对所有不溶性微粒图片进行分析和计数。虽然微流成像法在工业界有了一定应用，但是缺乏对所收集图片的进一步理解，例如单抗样品中大量的不溶性微粒图片被保存下来，却没有得到很好的挖掘、解释和应用。很多研究证明，不同种类的不溶性微粒会在形态上有很大的区别，例如长宽比、透明度及圆整度等，但是缺乏系统的研究和归纳，无法将这些形态特征应用到图片的识别和实际检定中。本研究通过收集反复冻融、含气泡或硅油、酶解、氧化等不同类型的单抗不溶性微粒图片，统计分析不溶性微粒形态的关键参数，整理出能够体现典型不溶性微粒关键特征参数，开发一种检测和鉴别不溶性微粒种类的新思路。

1 试验材料和方法

1.1 材料

西林瓶（7 mL，肖特玻璃苏州有限公司）；液氮（辽宁嘉医特种气体有限公司）；单抗A、单抗A辅料（中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室保存）；磷酸缓冲盐溶液（pH=7.4, Life Technologies Corporation）；Tergazyme酶（Alconox Inc.）；一次性注射器（10 mL，长春白求恩医疗器械有限公司）；赛托利斯滤器（0.22 μm ，PVDF, Millipore）。

1.2 分析测试仪器

微流成像仪（FlowCAM 8100, Yokogawa Fluid Imaging Technologies, Inc.）；水浴锅（DF-101S型，巩义市予华仪器后弦公司）；移液枪[1 mL，大龙兴创实验仪器（北京）股份公司]；恒温摇床（SHA-BA型，江苏科技仪器有限公司）；紫外

灯(ZF-2型,上海市安亭电子仪器厂);注射泵(LSP01-1B型,保定迪创电子科技有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 反复冻融蛋白质的制备与检测

将3 mL单抗A置于西林瓶中,将西林瓶完全沉浸于液氮中冷冻,2 min后将西林瓶取出,置于30 °C水浴锅中加热10 min。加热完毕后再将西林瓶放于液氮中冷冻,重复6次,制备为供试品溶液。分别取供试品溶液与未受应力的蛋白质溶液(单抗A)各1 mL采用微流成像法测量其中不溶性微粒形态。

1.3.2 气泡的制备与检测

将3 mL单抗A置于西林瓶中,用移液枪进行反复大幅度吹打,产生气泡;分别取吹打和无吹打样品各1 mL采用微流成像法测量样品中不溶性微粒形态。

1.3.3 硅油液滴的制备与检测

将硅油与超纯水混合形成1%的混合物,此时溶液分为上下层,将混合物置于摇床混匀,再将此混匀溶液置于探头式超声仪中超声30 min,溶液中形成稳定的硅油微乳;将20 μL硅油微乳分别加入到4 mL超纯水和4 mL单抗A溶液中,摇床混匀10 min;分别取稀释后的硅油乳液、单抗A硅油微乳复合溶液和蛋白质对照品溶液各1 mL,采用微流成像法进行不溶性微粒检测。

1.3.4 酶解蛋白质和氧化蛋白质的制备与检测

将1 mL单抗A置于FlowCAM流通池内,部分蛋白质将吸附在流通池和管路界面,使用20 mL超纯

水对流通池进行清洗,直至不溶性微粒降到较低水平,排干流通池内样品,将1% Tergazyme酶解液置于流通池内,静置3 min,此时吸附在界面的蛋白质被酶解,采用微流成像法对酶解后的蛋白质进行测量。

将3 mL单抗A溶液置于西林瓶中,放在紫外灯下照射2 h;2 h后取被氧化的蛋白质样品1 mL采用微流成像法测量溶液中颗粒形态。

1.3.5 制剂中辅料晶体的制备与检测

将单抗A辅料溶液置于-20 °C环境中,使得溶液中有少量结晶析出,通过微流成像法测量不溶性微粒形态。

1.3.6 微流成像法检测参数

手动进样,进样量200 μL,流速0.15 mL·min⁻¹,自动图像速率为每秒27帧,黑色像素15.00,白色像素15.00。

1.3.7 统计学分析

试验数据采用SPSS 22.0版进行统计学分析。各组间采用单因素方差分析进行评价,经统计学处理,ns表示 $P \geq 0.05$,*表示 $P < 0.05$,**表示 $P < 0.01$ 。

2 试验结果

2.1 不同处理条件下样品中不溶性微粒的形态参数

微流成像法的分析过程是首先拍摄不溶性微粒的图片,再对微粒图片进行形态分析,在形态分析的过程会采用一系列参数对形态进行表征,其中应用较多的参数及相应含义见表1。

表1 微流成像法中参数含义

名称	范围	解释
长宽比 (Aspect Ratio)	[0, 1]	表示粒子的形态关系,其中圆和正方形的值为1,接近0的粒子是指又长又细的粒子。
圆拟合度 (Circle Fit)	[0, 1]	表示粒子和圆的拟合程度,数值越接近于1的粒子形态越趋近于圆。
密实度 (Compactness)	[1, ∞)	表示粒子周长的平方与4π乘面积的比。形状越复杂,值越大。圆的形状最简单值为1。
凸性 (Convexity)	[0, 1]	表示粒子的填充面积与凸面积之比,其中凸面积相当于取一个橡皮筋,并将其围绕填充区域拉伸所得的总面积。其中圆的值为1,接近0的粒子表面越凸出。
边缘梯度 (Edge Gradient)	[0, 255]	表示构成粒子外边界像素的平均强度。其中边缘梯度值越大粒子外圈越清晰,值越小边缘越模糊。
纤维卷曲度 (Fiber Curl)	[0, 1]	表示粒子的弯曲长度与总长度之比,也被称为弯曲指数。值越大表明粒子弯曲程度越大。

续表 1

名称	范围	解释
强度 (Intensity)	[0, 255]	表示组成粒子像素的平均灰度值, 等于灰度总和与组成该粒子的像素数之比。其中值越接近于 255, 像素越深。
粗糙度 (Roughness)	[1, ∞)	表示粒子表面不平整程度的指标, 等于周长与凸周长之比, 值接近于 1 表明粒子表面光滑; 较大值的粒子有内部孔。
对称性 (Symmetry)	[0, 1]	表示粒子的中心对称关系, 其中对称性值为 1 的粒子的对称性越好, 值越接近于 0 粒子对称性越差。
透明度 (Transparency)	[0, 1]	表示粒子的形态关系, 其中 0 为填充圆的值, 接近 1 的值表示细长或不规则形状或有许多内部孔的颗粒形状。

2.2 冻融蛋白质微粒的形态特征

当蛋白质经历反复冻融过程, 溶液中会形成大量的不溶性微粒。从图1可见, 冷冻解冻后的单抗A形成不溶性微粒的特征与对照组蛋白质有明显区别。根据表2和图2中的数据, 冷冻解冻蛋白质样

品中不溶性微粒的强度及密实度较对照组显著减小, 粗糙度降低, 在形态上的具体体现为微粒图片颜色加深。此外, 冷冻解冻蛋白质中不溶性微粒长宽比和圆整度较对照组, 数值上更接近1, 在形态上更为接近圆形。

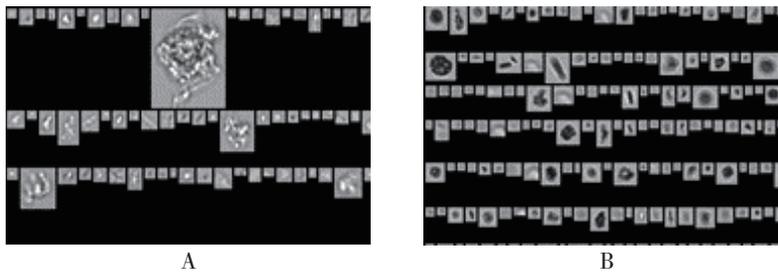
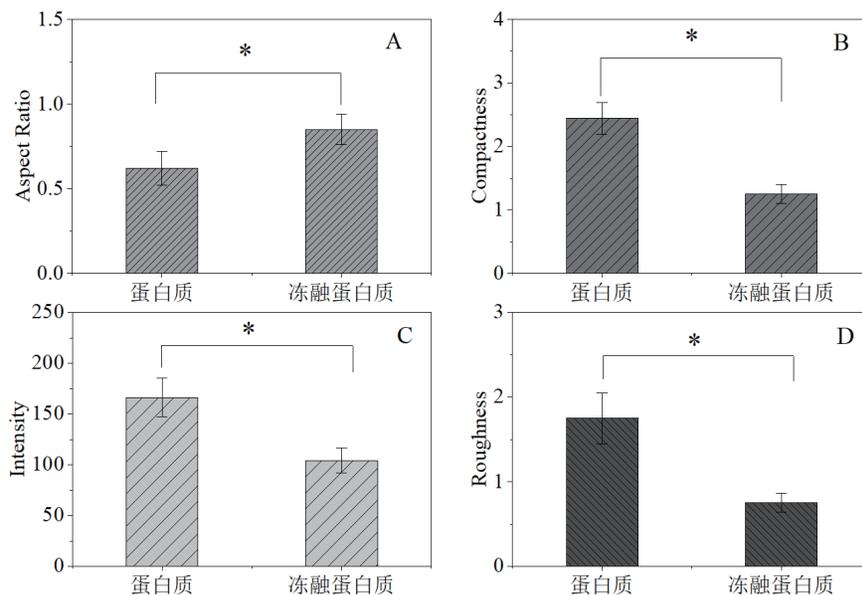


图1 对照蛋白质 (A) 及冻融蛋白质 (B) 的颗粒形态



A. 长宽比; B. 密实度; C. 强度; D. 粗糙度; ${}^{ns}P \geq 0.05$, ${}^*P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$ 。

图2 对照蛋白质和冻融蛋白质溶液的颗粒参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

表2 单抗A在不同处理条件下不溶性微粒的参数比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

名称	对照蛋白质	冻融蛋白质	气泡	蛋白质-气泡	硅油	蛋白质-硅油	酶解蛋白质	氧化蛋白质	结晶	滤器脱屑
长宽比 (Aspect Ratio)	0.62 ± 0.1	0.85 ± 0.09 [*]	0.99 ± 0.01 [*]	0.4 ± 0.14 ^{ns}	0.88 ± 0.1 ^{ns}	0.64 ± 0.15 ^{ns}	0.52 ± 0.16 ^{ns}	0.59 ± 0.23 ^{ns}	0.53 ± 0.13 ^{ns}	0.36 ± 0.18 [*]
圆拟合度 (Circle Fit)	0.74 ± 0.15	0.82 ± 0.09 ^{ns}	0.98 ± 0.02 [*]	0.13 ± 0.02 [*]	0.89 ± 0.05 ^{ns}	0.44 ± 0.2 [*]	0.06 ± 0.02 ^{**}	0.37 ± 0.1 [*]	0.46 ± 0.17 [*]	0.32 ± 0.25 [*]
密实度 (Compactness)	2.44 ± 0.25	1.25 ± 0.15 [*]	1.11 ± 0.01 ^{**}	3.45 ± 0.04 [*]	1.06 ± 0.09 [*]	1.9 ± 0.44 ^{ns}	26.15 ± 6.91 ^{**}	3.76 ± 0.6 ^{ns}	1.64 ± 0.32 [*]	2.69 ± 0.88 ^{ns}
凸性 (Convexity)	0.94 ± 0.11	0.99 ± 0.02 [*]	1 ± 0 ^{ns}	0.74 ± 0.09 [*]	1 ± 0 ^{ns}	0.88 ± 0.07 ^{ns}	0.58 ± 0.07 [*]	0.85 ± 0.19 ^{ns}	0.95 ± 0.06 ^{ns}	0.9 ± 0.13 ^{ns}
边缘梯度 (Edge Gradient)	67.4 ± 8.53	98.89 ± 23 ^{ns}	126.41 ± 11.57 [*]	66.01 ± 8.98 ^{ns}	112.65 ± 17.4 [*]	81.83 ± 12.21 ^{ns}	50.32 ± 9.39 [*]	58.59 ± 13.86 [*]	82.66 ± 20.78 ^{ns}	68.58 ± 25 ^{ns}
纤维卷曲度 (Fiber Curl)	0.86 ± 0.07	0.04 ± 0.01 ^{**}	0 ^{**}	0.44 ± 0.2 [*]	0.09 ± 0.01 ^{**}	0.25 ± 0.17 [*]	3.11 ± 0.2 ^{**}	0.25 ± 0.04 [*]	0.09 ± 0.01 ^{**}	0.17 ± 0.02 [*]
强度 (Intensity)	166.15 ± 19.03	104.25 ± 12.18 [*]	56.11 ± 2	129.01 ± 12.78 ^{ns}	134.3 ± 8.46 ^{ns}	133.88 ± 6.38 ^{ns}	131.6 ± 12.27 ^{ns}	167.09 ± 4.77 ^{ns}	131.72 ± 9.73 ^{ns}	135.63 ± 9.02 ^{ns}
粗糙度 (Roughness)	1.75 ± 0.3	1.17 ± 0.04 [*]	1.07 ± 0.01 [*]	1.32 ± 0.11 [*]	1.22 ± 0.06 [*]	1.21 ± 0.07 [*]	3.26 ± 0.89 [*]	1.23 ± 0.24 [*]	1.16 ± 0.03 [*]	1.19 ± 0.12 [*]
对称性 (Symmetry)	0.42 ± 0.32	0.750 ± 0.11 ^{ns}	0.98 ± 0.03 [*]	0.34 ± 0.11 ^{ns}	0.78 ± 0.21 ^{ns}	0.53 ± 0.17 ^{ns}	0.32 ± 0.13 ^{ns}	0.57 ± 0.23 ^{ns}	0.67 ± 0.15 ^{ns}	0.57 ± 0.23 ^{ns}
透明度 (Transparency)	0.25 ± 0.05	0.09 ± 0.03 [*]	0.05 ± 0.03 [*]	0.32 ± 0.07 ^{ns}	0.09 ± 0.03 [*]	0.17 ± 0.06 ^{ns}	0.36 ± 0.05 [*]	0.23 ± 0.19 ^{ns}	0.17 ± 0.06 [*]	0.34 ± 0.15 [*]

注：与未经处理的对照蛋白质相比，^{ns} $P \geq 0.05$, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 气泡与蛋白质微粒的形态特征

利用微流成像法对样品进行测试时, 气泡极易在样品准备和检测中出现。气泡和蛋白质有明显区别, 如图3-B所示, 气泡一般为同心圆, 且有明显的黑色边界。具体体现在颗粒长宽比和密实度接近1, 强度远低于蛋白质强度, 透明度接近于0。若不溶性微粒与气泡结合则可能出现图3-C情况, 微粒上有颜色较深的圆形气泡。

从图4可以看出, 当蛋白质和气泡结合后, 整体形态和蛋白质类似, 因此蛋白质-气泡复合物的长宽比和蛋白质接近, 但是整体结构更复杂, 颗粒密实度增加, 复合物整体的强度介于蛋白质和气泡之间, 因此, 在检测中若发现蛋白质颗粒的强度显著减小, 密实度显著增加, 应考虑有气泡掺入的可能。

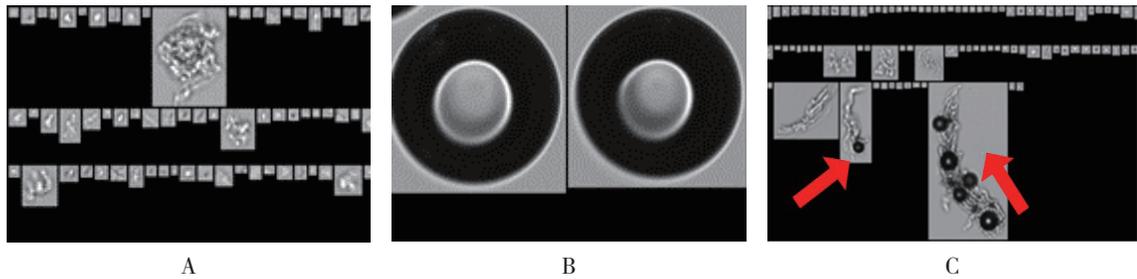
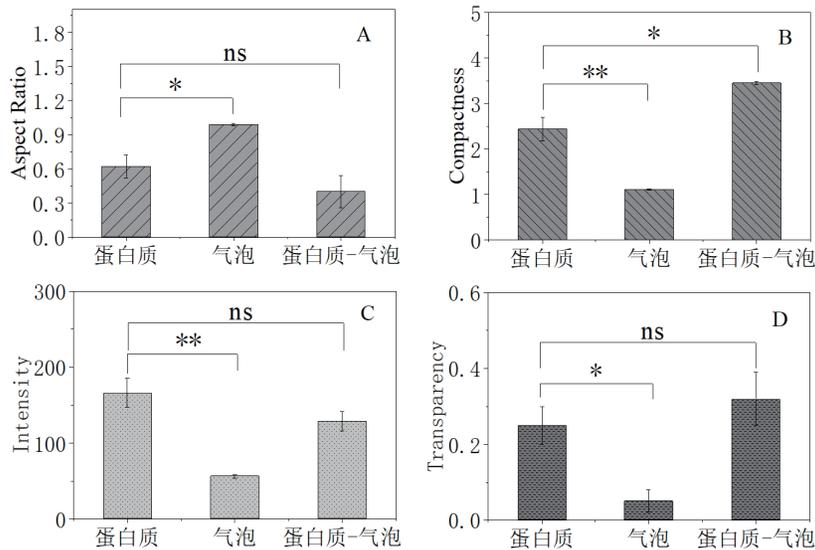


图3 蛋白质(A)、气泡(B)及蛋白质-气泡复合物(C)的颗粒形态



A. 长宽比; B. 密实度; C. 强度; D. 透明度; ^{ns} $P \geq 0.05$, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

图4 蛋白质、气泡及蛋白质-气泡复合物的颗粒参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.4 硅油与蛋白质微粒的形态特征

蛋白质类药物储存容器中常引入硅油作为润滑剂，因此在使用和运输的过程中，硅油液滴很容易脱落进入制剂中，形成亚微米级颗粒。硅油与蛋白质相比，在形态上有明显区别，如表2和图6所示，硅油相比于蛋白质透明度和密实度低，圆整度接近于1。在蛋白质制剂中可以观察到蛋白质-硅油复合物，如图5-C，多数蛋白质颗粒吸附在硅油表面，形态上与蛋白质-气泡复合物有明显不同。

从参数统计上看，蛋白质-硅油复合物的长宽比与强度值均与蛋白质接近，而密实度与透明度略有下降，这种变化与蛋白质-气泡复合物类似；不同的是，硅油与气泡的折光性不同，从参数对比上看，硅油的强度值与蛋白质-硅油复合物更接近，而气泡的强度值则远远小于蛋白质-气泡复合物，加上在实际样品中既存在纯硅油/纯气泡，也存在蛋白质-硅油/蛋白质-气泡复合物，因此含硅油样品能与含气泡样品有较好的区分。

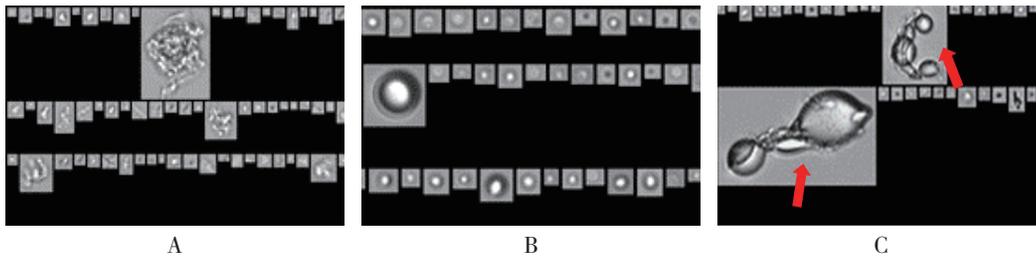
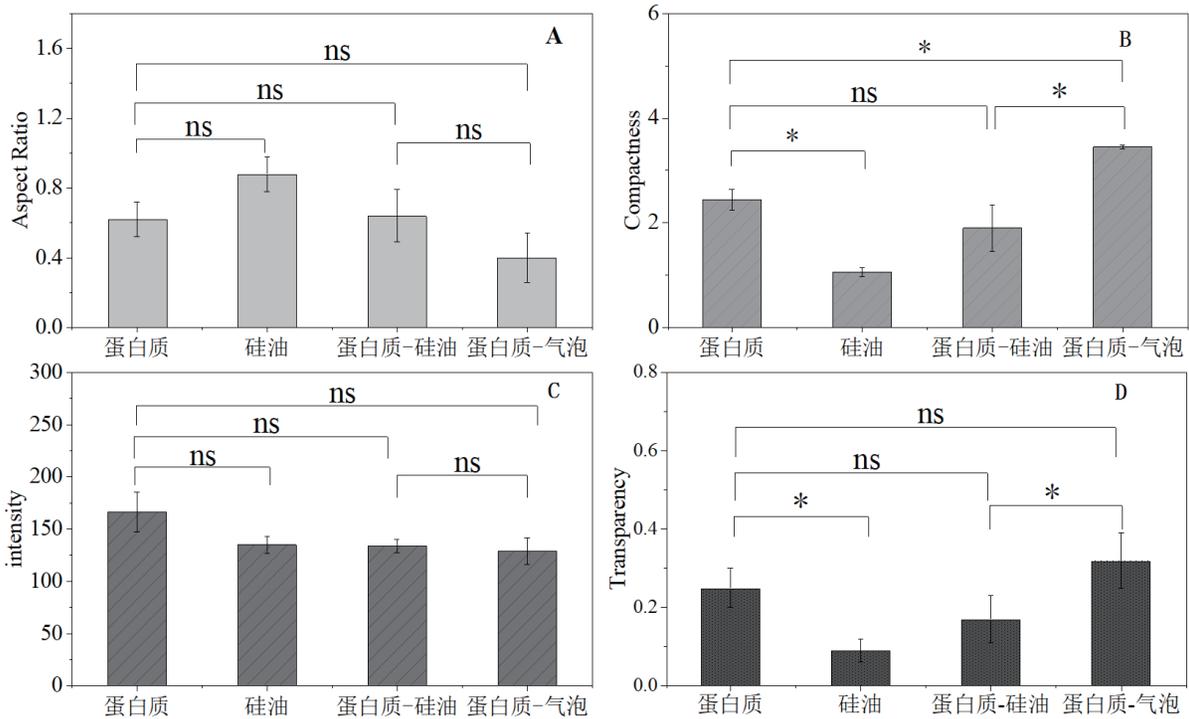


图5 蛋白质(A)、硅油(B)及蛋白质-硅油复合物(C)的颗粒形态



A. 长宽比; B. 密实度; C. 强度; D. 透明度; ^{ns} $P \geq 0.05$, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

图6 蛋白质、硅油及蛋白质-硅油的颗粒参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 酶解蛋白质微粒和氧化蛋白质微粒的形态特征

在使用微流成像法检测样品的过程中,常需要加入蛋白水解酶清洗流通池通路,如果清洗不彻底,酶解后蛋白质会从界面脱落形成不溶性微粒,形态如图7-B所示,参数如图8所示。其中,蛋白质的不规则度增加,圆拟合度减小,整体密实度急

剧增加,纤维卷曲度大大增加,强度略有减小。此外,蛋白质在储存运输过程中,会存在氧化现象,氧化后蛋白形态相比于蛋白质对照品,圆拟合度下降,密实度增加,从形态上观察整体更亮(见图7-C)。

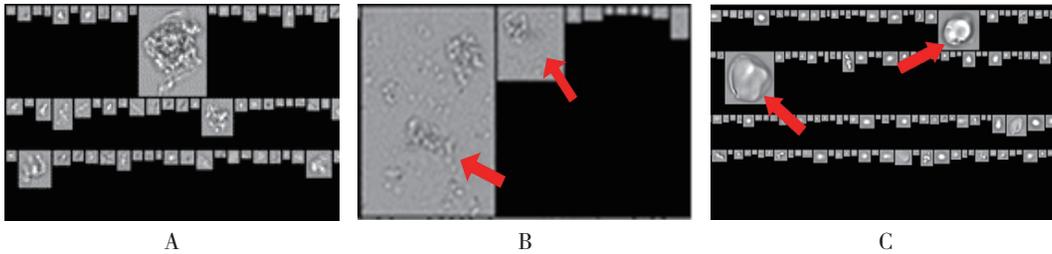
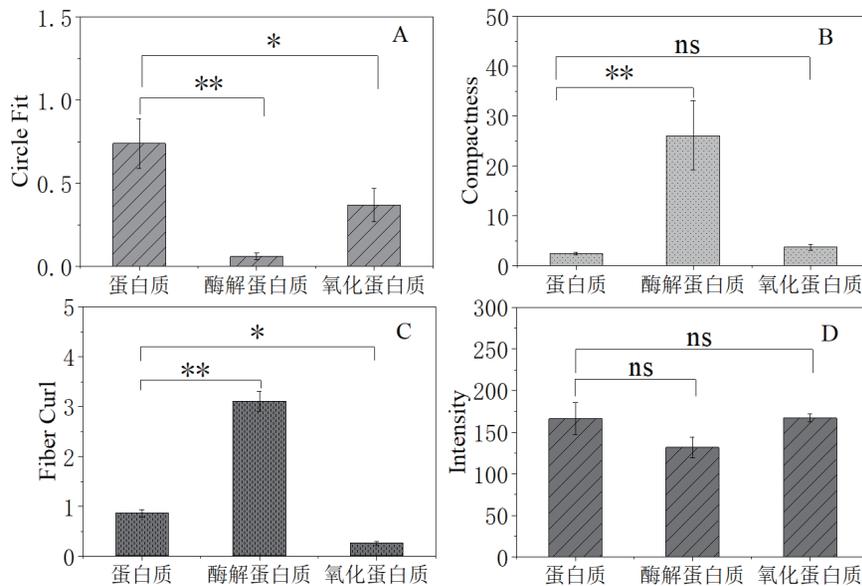


图7 对照蛋白质(A)、酶解蛋白质(B)及氧化蛋白质(C)的颗粒形态



A. 长宽比; B. 密实度; C. 形状卷曲度; D. 强度; ^{ns} $P \geq 0.05$, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

图8 对照蛋白质、酶解蛋白质及氧化蛋白质的颗粒参数($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.6 蛋白质中可能出现的杂质微粒的形态特征

当温度发生改变时,蛋白质溶液中的辅料会有结晶析出,结晶形态如图9-B所示。结晶呈现一定的几何形态,但由于其中辅料不是单纯一种成分,因此,形状不是完全规则的。在蛋白质制剂生产过程中会使用过滤器进行过滤,此过程中可能会有部分过滤器材质脱落,其中过滤器脱屑如图9-C

所示,从表1和图10中数据可见,辅料结晶、滤器脱屑与蛋白溶液颗粒有明显的不同,其中2种杂质的卷曲度更小,整体强度和粗糙度相比于蛋白颗粒较低,具体图像体现为图片效果更接近背景,结构简单,边界清晰,但滤器脱屑形态相对结晶形态更复杂,密实度增大。

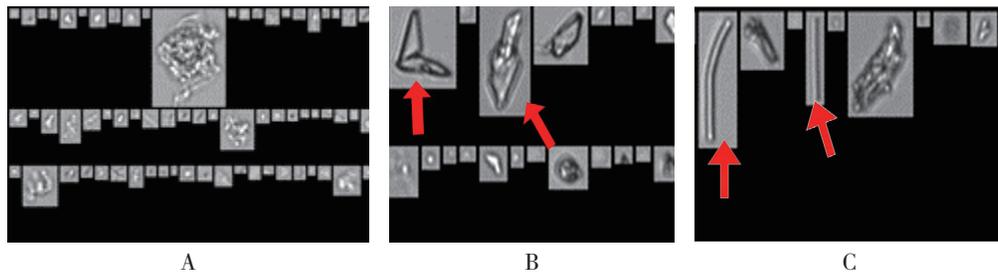
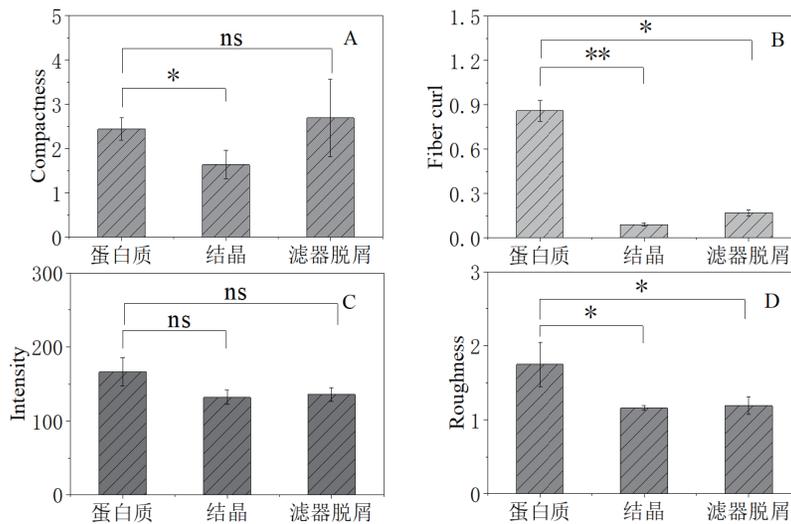


图9 蛋白质(A)、辅料中结晶(B)及滤器脱屑(C)颗粒形态



A. 密实度; B. 形状卷曲度; C. 蛋白质颗粒、辅料结晶、滤器脱屑的强度; D. 粗糙度; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图10 蛋白质颗粒、辅料中结晶及滤器脱屑颗粒的参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

3.1 冻融对蛋白质颗粒形态的影响

单抗药物从生产储存到运输使用过程中, 蛋白质可能会经过多次冻融过程^[8-9], 在此期间, 蛋白质的疏水基团和亲水基团会发生一定程度上的反转^[10-11], 而液体中的气泡在冻融过程中也会有溶解和逸出的变化, 这些影响会造成蛋白质一定程度上的结构改变, 并使蛋白质易于发生聚集, 形成不溶性微粒。与未冻融蛋白质对比, 形成的不溶性微粒的蛋白质结构不同, 形成的不溶性微粒的形态会有较大的区别。此外, 不溶性微粒的折光率也会发生一定程度的改变, 影响微粒图片的明暗程度。当在检测过程中发现强度、密实度和粗糙度普遍降低且图片更暗的颗粒, 提示可能是蛋白质经历了冻融过程, 从而产生了该特征的不溶性颗粒。

3.2 气泡对蛋白质颗粒形态的影响

气泡在蛋白质制剂的生产和运输储存过程中

很容易形成, 例如过滤、搅拌、运输及灌装等操作都会有引发气泡产生的可能。气泡产生后, 蛋白质会吸附在空气-液体界面处, 空气作为疏水介质, 会使吸附在界面的蛋白质发生结构改变; 当界面发生移动, 原本聚集在气泡表面的蛋白质会因为气泡移动产生的剪切力使得蛋白质被移出表面^[11], 这个过程在含有气泡的蛋白质中是动态存在的。气泡一般为边界明显的同心圆, 当蛋白质颗粒与气泡结合, 会形成蛋白质-气泡复合颗粒, 与蛋白质颗粒相比, 参数如密实度、透明度等会有差异, 颗粒形态上也较易辨识。

3.3 硅油对蛋白质颗粒形态的影响

硅油属于二甲基硅氧烷聚合物, 具有较好的稳定性和生物相容性, 是较为常见的内包材润滑剂, 常用于预充针内表面、胶塞上或西林瓶中^[12-14]。硅油具有较小的表面张力, 在受到外界应力的条件下, 极易从内包材表面脱落, 形成不溶于水的圆形

硅油液滴。而在溶液中形成的液滴尺寸也远小于气泡，且折光率也和水溶液相差较大，图片较之气泡更亮。硅油是一种非极性的疏水分子，蛋白质吸附在硅油-水的界面会导致蛋白质的聚集和不溶性微粒的形成^[15-17]，不溶性微粒也会和硅油液滴融合形成微米级的蛋白质-硅油颗粒。由于硅油与气泡较易区分，故蛋白质-气泡颗粒与蛋白质-硅油也较易区分，需要注意的是，蛋白质-气泡颗粒中，二者基本保持各自的形态，而蛋白质-硅油颗粒中，蛋白质和硅油间相互影响，颗粒会呈现出不同于蛋白质和硅油的新的形态，如果没有一定经验，不易识别蛋白质-硅油颗粒。

3.4 酶解和氧化对蛋白质颗粒形态的影响

酶解和紫外照射等刺激会使蛋白质中的氨基酸发生氧化、脱酰胺等化学变化，使蛋白质稳定性降低，高级结构发生改变，易于形成聚集体和不溶性微粒^[18-20]。这些颗粒多为不规则的形状，长宽比较对照蛋白质颗粒明显下降。从图像上看，酶解后的蛋白质不溶性颗粒体积比对照蛋白质颗粒小，结构松散，有酶解碎裂的痕迹。蛋白质在发生氧化反应后，由于发生了同一改变，使得蛋白质内部结构更简单，整体亮度更高。这些特征使得该类性质蛋白质具有可识别性；反之，若检测中观察到该类特征的蛋白质，也可推测蛋白质可能经历了相应刺激。

3.5 杂质颗粒形态

在蛋白质的生产处理过程中，会导致一些不可溶性杂质的出现，例如辅料以结晶的形式析出、过滤过程中滤膜的残屑等。此类杂质相对蛋白质颗粒而言体积明显增大，但是由于结晶和碎屑的不可控性，其形态大多为不规则状，其长宽比较小，可以和气泡做出明显的区分。

4 总结与展望

微流成像法作为定量检测注射剂中不溶性微粒的重要手段已经在工业界得到较多的应用，此外，美国药典也收载该方法，作为不溶性微粒检测的补充技术，说明监管界对不溶性微粒的表征也提出了新的要求。然而，如何有效发挥该方法的优点，挖掘深层次的应用途径，还有待进一步探索和总结。微流成像法的核心数据是微粒形态，目前的应用多数停留在如何区分蛋白类颗粒和非蛋白类颗粒的层面，至于在其他更丰富类型

颗粒上的应用有限。

本研究对比了常见且典型的不溶性微粒形态特点，并尝试利用不溶性微粒的特征对其进行快速的区分和分类，不但拓展了相关研究人员的视野，也提供了根据不溶性微粒形态特征反向推测蛋白可能经受的影响，拓宽了不溶性微粒来源识别的途径，是应用微流成像法深入表征不溶性微粒的范例和参考。本研究提供的图像较典型，对于不同样品类别及制剂环境等因素影响下得到的图像可能不会完全一致。在此建议研究人员对于较易区分的图像可直接参照本研究的典型图像肉眼识别及判断，对于不易直接识别的非典型图像，应将参数与图像结合参考后判定微粒特征。鉴于目前数据量有限，今后会持续积累数据并积极拓展本研究在实际情形中的应用，并结合案例持续加强相关数据的收集，进而提高方法的精密度和适用性。在方法应用与数据积累相互促进下，为单抗制剂中典型不溶性微粒的形态特征提供有效补充和有力工具，为蛋白质制剂的安全提供能力支撑和技术保障。

[致谢：感谢张志俊工程师在文章准备过程中的技术支持和有建设性的讨论。]

参考文献：

- [1] 郭莎, 贾哲, 吴昊, 等. 单克隆抗体颗粒表征的现状与挑战[J]. 中国药事, 2022, 36(2): 161-169.
- [2] 郭莎, 张峰, 于传飞, 等. 单抗制剂多维度稳定性分析[J]. 中国药学杂志, 2021, 56(15): 1241-1248.
- [3] Gerhardt Alana, McGraw Nicole-R, Schwartz Daniel-K, et al. Protein Aggregation and Particle Formation in Prefilled Glass Syringes[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 103(6): 1601-1612.
- [4] Pardeshi NN, Ahmadi M, Sierzputowska I, et al. Subvisible Particles in Solutions of Remicade in Intravenous Saline Activate Immune System Pathways in In Vitro Human Cell Systems[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 110(8): 2894-2903.
- [5] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 125<0903>.
- [6] S Zölls, Gregoritz M, Tantipolphan R, et al. How Subvisible Particles Become Invisible - Relevance of the Refractive Index for Protein Particle Analysis[J]. Institute for Cultural Interaction Studies, Kansai University, 2013, 102(5): 1434-1446.

- [7] 郭莎, 武刚, 崔永霏, 等. 2种型号微流成像分析仪测定微粒标准品及单抗样品的结果对比[J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (4): 655-665.
- [8] Roberts CJ. Therapeutic Protein Aggregation: Mechanisms, Design, and Control[J]. Trends in Biotechnology, 2014, 32 (7): 372-380.
- [9] Hauptmann A, Hoelzl G, Loerting T. Distribution of Protein Content and Number of Aggregates in Monoclonal Antibody Formulation After Large-Scale Freezing[J]. Aaps Pharmscitech, 2019, 20 (2): 72-85.
- [10] Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. Surface-Induced Denaturation of Proteins During Freezing and its Inhibition by Surfactants[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1996, 85 (12): 1325-1330.
- [11] Liu L, Qi W, Schwartz DK, et al. The Effects of Excipients on Protein Aggregation During Agitation: An Interfacial Shear Rheology Study[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 102 (8): 2460-2470.
- [12] Gerhardt A, McGraw NR, Schwartz DK, et al. Protein Aggregation and Particle Formation in Prefilled Glass Syringes[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 103 (6): 1601-1612.
- [13] 沈志伟. 硅油对晶状体蛋白体外积聚性影响研究[D]. 上海: 中国科学院研究生院(上海应用物理研究所), 2017.
- [14] Auge Kristin-B., Blake-haskins Angela-W., Devine Sean, et al. Demonstrating the Stability of Albinterferon Alfa-2b in the Presence of Silicone Oil[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100 (12): 5100-5114.
- [15] Renuka Thirumangalathu, Sampathkumar krishnan, Margaret Speed Ricci, et al. Silicone oil-and Agitation-Induced Aggregation of a Monoclonal Antibody in Aqueous Solution[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98 (9): 3167-3181.
- [16] K Höger, Mathes J, W Frieß. IgG1 Adsorption to Siliconized Glass Vials-Influence of pH, Ionic Strength, and Nonionic Surfactants[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2015, 104 (1): 34-43.
- [17] Ludwig DB, Carpenter JF, Hamel J, et al. Protein Adsorption and Excipient Effects on Kinetic Stability of Silicone Oil Emulsions[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 99 (4): 1721-1733.
- [18] Kerwin BA, Remmele RL. Protect from Light: Photodegradation and Protein Biologics[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007, 96 (6): 1468-1479.
- [19] Ilikovi N, Bravar M. The Effects of Photo-Degradation on the Electrical Properties of Poly (Ethylene Terephthalate)[J]. Polymer Degradation & Stability, 1985, 13 (2): 139-145.
- [20] Basle YL, Chennell P, Tokhadze N, et al. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 109 (1): 169-190.

(收稿日期 2022年4月28日 编辑 郑丽娥)