微流数字成像技术在蛋白药物制剂不溶性微粒分析中的应用

谢力琦，毕宝帅，黄　懿
（上海探实生物技术有限公司，上海 201206）

摘要：不溶性微粒可以指示注射剂的潜在质量问题和免疫原性风险，是注射剂质量管理中必须评估的质量指标。微流数字成像（MDI）技术是检测不溶性微粒的新方法，相较于不溶性微粒检测“金标准”的光阻法，除了可以提供颗粒的大小和数量信息外，还可以通过高分辨图像获得颗粒种类和形状等特性数据，并且所需样本量少，特别适用于蛋白药物注射剂的质量分析。文章从不溶性微粒的成因和各国药品监管机构和药典对注射剂不溶性微粒质量控制的技术要求出发，综述了 MDI 技术在蛋白药物处方筛选和工艺研究中的应用进展，以保障蛋白药物制剂的安全性和有效性。

关键词：蛋白药物；注射剂；不溶性微粒；微流数字成像；质量控制
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)01-0036-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.003

Application of Microflow Digital Imaging in Particulate Matter Analysis of Protein Drug Formulations

XIE Liqi, BI Baoshuai, HUANG Yi
(*Shanghai Tanshi Biotech Co., Ltd., Shanghai 201206*)

ABSTRACT: Particulate matter can indicate potential quality problems and immunogenic risks of injections, so as to be a necessary indicator for injection evaluation in the quality management. Microflow digital imaging (MDI) is a new technology for detecting particulate matter. Compared with the light obscuration method, which is the “gold standard” for particulate matter analysis, MDI can not only provide the detailed information on the size and quantity of particles, but also obtain the type and shape characteristics through high-resolution images. In addition, MDI requires a small sample volume and is especially suitable for the quality analysis of protein drug injections. From prospects of the formation causes of particulate matter and the technical requirements of drug regulatory agencies and pharmacopoeias in various countries for the quality control of particulate matter in injections, this paper reviews the application progress of MDI technology in formulation development and process research of protein drugs, in order to ensure the safety and efficacy of protein drug formulations.

Key Words: protein drug; injection; particulate matter; microflow digital imaging; quality control

不溶性微粒是一类不溶于制剂的、非代谢性的、肉眼看不见的颗粒物，一般粒径为 0.1 ～ 50 μm［《美国药典》（USP NF 2022）<1788> 章节］。近几十年来，以治疗性蛋白质为代表的生物制药产业发展迅速，在抗病毒、抗肿瘤和自身免疫性疾病的治疗中具有显著疗效[1]。治疗性蛋白药物中的不溶性微粒即使在极低含量（如小于蛋白总质量的 0.1%）时也可能导致免疫原性或输液相关的过敏反应[2]，引起有效性和安全性风险，需要进行严密监控。在治疗性蛋白药物的研发、生产、运输及给药过程中，如何控制或降低蛋白质产品内的不溶性微粒，是生物制药公司的关注重点，也是各国药品监管机构重点监督的环节。本综述总结了微流数字成像（microflow digital imaging，MDI）技术在检测蛋

收稿日期：2023-05-04
作者简介：谢力琦（1984—），女，博士，从事生物制品质量研究工作。
E-mail：Freesiaxie@qq.com

白药物不溶性微粒检测中的应用进展。

1 蛋白药物制剂中不溶性微粒概述

治疗性蛋白药物中不溶性微粒的主要成分为蛋白颗粒或蛋白与异源晶核的混合颗粒，也包含少量硅油滴、纤维、玻璃及胶塞中的橡胶等[3]。这些不溶性微粒可能造成药物活性丧失、药效降低、增加血管堵塞和引起免疫原性风险等。因此，不溶性微粒被认为是蛋白药物制剂的关键质量属性[3—4]。蛋白质的聚集可能出现在制造、运输、贮存等环节，甚至在患者给药期间也可能会出现[4—5]。蛋白质分子可能会吸附在多种界面上，如气 - 液界面、瓶（卡式瓶或预充式注射器）- 液界面、液 - 液（硅油 - 水）界面等，这种吸附行为可能会造成蛋白质分子构象发生变化，导致变性、聚集[6—7]。此外，在药品生产和流通的各个阶段，蛋白质分子可能在各种环境因素（如紫外线、搅拌或温度变化等）的干扰下发生聚集，进而生成不溶性微粒[1—4]。蛋白药物制剂中任何颗粒的存在都是引发安全性风险的主要因素，会受到监管机构的特别关注。各国药典已对注射剂产品中≥ 25 和≥ 10 μm 的颗粒数量做出限制；而目前人们对于蛋白药物制剂中 0.1 ～ 10 μm 的颗粒也越来越关注，现在普遍认为这一粒径范围内的颗粒也具有免疫原性[4]，USP <787>、<1787> 章节中已经建议关注该尺寸范围的不溶性微粒数量。随着 MDI 等颗粒分析新技术的发展，0.1 ～ 10 μm 不溶性微粒的定量和表征能力得到显著提高。

2 不溶性微粒检测方法的比较

2.1 光阻法

光阻法是检测注射剂中不溶性微粒的常用分析方法，收载于《中华人民共和国药典》2020 年版（ChP 2020）四部通则 0903，USP <787>、<788>、<789>、<1787>、<1788> 章节和《欧洲药典》第 10 版 2.9.19 章节。光阻法的原理是将光照射到溶液流经的流动通道上，当溶液中的颗粒流经通道时，测得透射光量会减少，通过检测透射光的减少量就可计算颗粒的大小[8]。光阻法可准确测定乳胶标准粒子的数量，在测量 1 ～ 300 μm 的不溶性微粒方面具有操作简单、通量高的优势[9]。然而，气泡和蛋白聚集体等相对透明的粒子，其折射率接近于背景溶液的折射率[10]，透射光的减少量可能低于光阻法的检测灵敏度，因此光阻法不仅不能充分评估这类粒子的大小，也会低估这类颗粒的数量。此外，光阻法很难获得颗粒形状等特性参数以区分颗粒的类型[8,11]。根据药典要求，对于每个供试品，光阻法需要进行 4 次检测，每次进样体积为 5 mL，增加了蛋白药物制剂的检测成本。

2.2 显微计数法

对于特定的供试品，如因为黏度过高、易结晶等特性问题而不适合采用光阻法分析的，可选用显微计数法（ChP 2020 四部通则 0903 不溶性微粒检查法第二法），即将样品颗粒过滤于微孔滤膜上，然后在显微镜下进行形态观察和计数。显微计数法的准确性依赖于操作人员的经验，额外的过滤步骤可能引入较大的不确定度。另外，蛋白药物制剂中的蛋白质等颗粒可能在样品制备（如薄膜过滤过程中溶液对颗粒的持续冲刷）过程中溶解，造成计数和尺寸测量的不准确。

2.3 MDI

随着分析仪器和图谱分析软件的发展，越来越多的新技术被应用于蛋白药物的不溶性微粒检测上，其中 MDI 的应用较广泛。

MDI 是基于显微图像分析的颗粒表征技术，当含有不溶性微粒的溶液流经微量流通池时，摄像系统依靠频闪装置提供的光源在显微放大装置的帮助下，快速捕获每个不溶性微粒的图像，通过多参数图谱分析软件对微粒尺寸、透明度和形态等性质进行解析，进而识别微粒的种类，最终输出颗粒的大小和数量分布信息[1,8]。与光阻法相比，MDI 的检测不受基质折射率差异的影响，对高透明粒子更为敏感。此外，高分辨率图像所提供的微粒形态特征有助于将蛋白聚集体和其他不溶性微粒区分开来，用于颗粒的鉴别[1]。值得一提的是，MDI 技术需要的样品体积仅为 200 μL 至 1 mL，远低于光阻法，对于分析蛋白药物制剂更为经济。基于以上技术优势，MDI 已作为第三法写入了 USP <1788.3> 章节，

但由于该技术尚未经过充分评估和验证，暂未被建议列入放行分析方法。当然，MDI 技术也存在一定的局限性，其检测颗粒的准确度和精度与溶液介质、颗粒成分以及尺寸密切相关，如由于光衍射的影响，MDI 对粒径 5 μm 及以下的颗粒无法做到准确的形态学识别，对小尺寸颗粒检测的准确度和精度低于大颗粒 [12]；另外，在黏度较高的溶液中，MDI 可能会高估玻璃粒子的尺寸，微流通池也仍然存在颗粒吸附、堵塞和污染的挑战 [13]。

3　MDI 在蛋白药物制剂中的应用

优化制剂处方、选择适宜的贮存方式是生物制药公司控制蛋白药物制剂中不溶性微粒水平的常用手段。MDI 技术因具有检测样品用量小、识别颗粒形态分辨率高的优势，被广泛应用于蛋白药物制剂的处方开发、生产工艺研究和工艺批次可比性分析中。

3.1　处方筛选研究

适宜的制剂处方能保证蛋白药物制剂在货架期内的稳定性，而贮存期间颗粒的形成是蛋白药物制剂稳定性问题的重要指征。在早期处方开发过程中，MDI 提供的颗粒计数信息可用于平行比较不同处方制得的蛋白药物制剂的稳定性，获得的高分辨率聚集体形态图片也有助于推测蛋白药物的降解路径。

在处方研究中，MDI 技术可以快速分析表面活性剂颗粒的大小、形态和分布等信息，辅助制剂工程师选择合适的表面活性剂、分散剂、渗透压调节剂等辅料并确定其适宜用量，筛选出能保障蛋白药物制剂稳定性的优选处方。例如，CORDES 等 [14] 采用 MDI 技术分析了阿巴西普在不同 pH 值缓冲溶液中的颗粒数量；BARNARD 等 [15] 采用 MDI 技术比较了某 IgG2 抗体药物在由组氨酸缓冲体系、Tween、海藻糖组成的处方中的颗粒特征，并筛选出了优化处方；BICKEL 等 [16] 采用 MDI 技术分析了氯化钠对某单克隆抗体聚集体形成的影响，观察到溶液中微米级颗粒的数量会随氯化钠浓度的增加而增加（氯化钠浓度从 0.5 mol/L 增至 1.5 mol/L，颗粒数量增加了 100 倍），并且蛋白颗粒的团聚形态也与氯化钠的离子强度有关（低浓度氯化钠下主要形成细长的聚合体，高浓度下则呈无定型状态）。此外，该研究还观察到氯化钠诱导形成的颗粒多为可溶性聚集体，这些聚集体可随溶液的稀释而恢复为单体，揭示了盐离子对抗体药物胶体稳定性的影响机制。综上所述，MDI 技术在制剂处方筛选中的应用广泛，可为制药企业提高生产效率、降低成本、提高产品质量提供有效的技术支持。

3.2　预充式注射剂（prefilled syringes，PFS）中蛋白质聚集情况的研究

PFS 具有降低污染风险、减少过度填充、剂量准确、易于给药和患者依从性高等优点 [17]，是治疗性蛋白药物的优选包装形式。应用于 PFS 内部的硅油会诱导蛋白药物制剂中亚微米级和微米级蛋白颗粒的形成，这些不溶性微粒在人体内会引起增强的免疫响应，导致不良反应的发生 [5]。因此，需对 PFS 中不溶性颗粒的种类、数量和尺寸进行严格控制。皮下注射用 PFS 的装量为 0.25 ～ 5 mL，单支制剂的装量无法满足药典中常规方法检测不溶性微粒所需样品量的要求，而 MDI 技术所需的样品量特别适配于 PFS 的颗粒分析，对推动 PFS 的发展起到了积极作用。GERHARDT 等 [18] 利用 MDI 技术探寻硅化注射器中蛋白聚集的主要原因，通过将含有单克隆抗体或溶菌酶的无表面活性液体制剂分别置于硅化和非硅化玻璃注射器内，同时考虑了存在气泡的暴露条件，在旋转条件下孵育，再检测蛋白药物制剂中的颗粒浓度。结果显示，所有试验条件下均检测到粒径≥ 2 μm 的颗粒，并且在含有气泡的硅化玻璃注射器、搅拌条件下检出的颗粒浓度最高，证明三相（硅油 - 水 - 空气）接触界面产生的毛细作用力是造成蛋白聚集体和颗粒形成的主要原因，解释了硅油 - 水、气 - 水和搅拌对 PFS 中颗粒产生的协同效应。KRAYUKHINA 等 [5] 采用 MDI 技术观察到硅油与药物蛋白形成的复合颗粒，而在使用不含硅油滴的环烯烃聚合物 PFS 包装时，则未观察到相应颗粒的形成。此外，KRAYUKHINA 等 [19] 报道使用带有锥形针头的 PFS 有助于降低高黏度、高浓度的蛋白药物注射时所需的推力，同时通过 MDI 技术证实不同针尖不会引起 PFS 中颗粒分布

的差异。

3.3 注射用冻干制剂中的颗粒研究

对于在液体状态下长期稳定性不佳的蛋白药物制剂，可选择制成冻干制剂。ZHOU 等 [20] 采用 MDI 技术对以注射用水复溶的冻干制剂进行了检测，观察到大量纳米级至微米级的气泡（在冻干前的原液中几乎无检出），这些气泡表现出长期稳定的特点，复溶注射液放置 1 周后仍可观察到有气泡悬浮，且不易通过脱气除去，而高浓度的纳米级气泡有可能提高蛋白质的聚集率，是蛋白药物中不溶性微粒和可见异物的潜在来源。SNELL 等 [21] 采用 MDI 技术对不同退火工艺条件和不同制剂处方所得制品中的不溶性微粒进行表征，结果表明纳米级气泡可能来源于固体中的纳米级气孔，这些气泡的浓度与甘露醇的结晶程度相关。在甘露醇结晶过程中，水的升华可诱导纳米结晶形成纳米级气泡。因此尝试在低甘露醇处方中添加海藻糖或蔗糖为冻干保护剂，结果观察到复溶液中纳米级气泡的浓度降低。除了纳米级气泡外，FANG 等 [22] 在冻干过程中观察到，较高的冰核温度（ice nucleation temperature）可以减少蛋白聚集，而在冷冻浓缩液中停留时间过长则会加剧蛋白聚集。在冷冻步骤中，选择合理的制剂处方、冰核温度及冷冻浓缩液停留时间将有助于控制蛋白药物冻干制剂复溶后的颗粒水平。除此之外，MDI 技术还被应用在单抗冻融试验 [23]、埃博拉病毒疫苗冻干试验 [24] 和大规模冷冻过程中新型小体积包装容器评价 [25] 等领域。

3.4 蛋白药物制剂灌装工艺中颗粒的研究

在治疗性蛋白质生产过程中，界面应力的存在可能造成蛋白质颗粒的产生；同时，界面对蛋白质分子的吸附作用和机械应力的破坏，也可能造成大量蛋白质颗粒的形成 [26]。这些应力在灌装过程中的影响尤为突出。MDI 技术可检测出工艺过程中 1 ～ 100 μm 尺度的蛋白聚集体和颗粒。相关文献 [26] 表明，灌装泵上脱落的外源粒子所诱导的非均质聚集是产品中出现不溶性微粒的重要潜在原因。NAYAK 等 [27] 的研究则表明，使用不同类型的泵，所得单抗制剂中产生的微粒粒级（即物料颗粒的粒度范围）会有所不同，微粒粒级从高到低依次是旋转活塞泵（陶瓷）、旋转活塞泵（不锈钢）、滚动隔膜泵、时间 - 压力灌装系统、蠕动泵。WU 等 [28] 在对径向柱塞泵灌装过程的研究中，观察到气蚀和泵送颗粒脱落不是产生蛋白聚集体的主要原因，蛋白质分子与泵表面之间的静电相互作用才是蛋白质聚集和颗粒形成的主要原因，通过调整泵表面所带电荷的类型，可以利用静电相互作用的原理减少蛋白质的吸附。HER 等 [26,29] 使用 MDI 技术对药液中形成的纳米颗粒和微粒进行检测，考察灌装过程中使用的软管类型、处方、泵送后搅拌工艺参数（加速度和速度）及表面活性剂等因素的影响。结果表明，处方中添加表面活性剂或选择适当的缓冲剂可有效减少颗粒形成，泵的加速能力（pump acceleration）对溶液中的颗粒浓度无显著影响，但较高的泵送速度（400 r/min）可能会促进颗粒的形成。最后，该研究组认为应在处方开发过程中补充填充泵考察项目，以确保灌装泵运行过程中颗粒水平得到控制，生产出高质量的产品。

4 总结

在不溶性微粒的检测分析中，相较于光阻法，MDI 技术的样本需求量更低、可提供高分辨率图像和多种颗粒特性参数，帮助研究人员将蛋白聚集体和其他不溶性微粒区分开来，是分析蛋白聚集体形成机制和其他不溶性微粒来源的有力工具，特别适用于蛋白药物制剂的分析。但 MDI 技术也存在一定的局限性：对 5 μm 及以下范围内的颗粒无法做到准确识别；微流通池易污染、易堵塞；尚未经过充分评估和全面验证等。综上所述，与光阻法相比，MDI 技术可以在更小的体系下，获得更丰富的颗粒特性数据，可作为光阻法的有力补充，为蛋白药物制剂在产品生命周期中颗粒水平的控制提供进一步保障。

参考文献：

[1] KIYOSHI M, SHIBATA H, HARAZONO A, *et al*. Collaborative study for analysis of subvisible particles using flow imaging and light obscuration: experiences in Japanese

biopharmaceutical consortium［J］. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(2): 832-841.

［2］ PARDESHI N N, ZHOU C, RANDOLPH T W, *et al*. Protein nanoparticles promote microparticle formation in intravenous immunoglobulin solutions during freeze-thawing and agitation stresses［J］. *J Pharm Sci*, 2018, **107**(7): 1852-1857.

［3］ 贾东晨, 何　伍. 抗体药物制剂处方中的可见异物/不溶性微粒[J]. 中国新药杂志, 2022, **31**(10): 933-936.

［4］ CARPENTER J, CHERNEY B, LUBINECKI A, *et al*. Meeting report on protein particles and immunogenicity of therapeutic proteins: filling in the gaps in risk evaluation and mitigation［J］. *Biologicals*, 2010, **38**(5): 602-611.

［5］ KRAYUKHINA E, YOKOYAMA M, HAYASHIHARA K K, *et al*. An assessment of the ability of submicron- and micron-size silicone oil droplets in dropped prefillable syringes to invoke early- and late-stage immune responses［J］. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(7): 2278-2287.

［6］ 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.

［7］ GANDHI A V, RANDOLPH T W, CARPENTER J F. Conjugation of emtansine onto trastuzumab promotes aggregation of the antibody-drug conjugate by reducing repulsive electrostatic interactions and increasing hydrophobic interactions［J］. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(6): 1973-1983.

［8］ FROMMKNECHT T. Comparisons of two different analytical methodologies for the characterization of sub-visible particles in therapeutic protein formulations［EB/OL］. (2011-12-31)［2023-05-04］. https://kuscholarworks. ku. edu/bitstream/handle/1808/9784/Frommknecht_ku_0099M_11894_DATA_1. pdf;sequence=1.

［9］ FANG W J, LIU J W, ZHENG H J, *et al*. Protein sub-visible particle and free radical formation of a freeze-dried monoclonal antibody formulation during dropping［J］. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(4): 1625-1634.

［10］ SHIBATA H, HARAZONO A, KIYOSHI M, *et al*. Quantitative evaluation of insoluble particulate matters in therapeutic protein injections using light obscuration and flow imaging methods［J］. *J Pharm Sci*, 2022, **111**(3): 648-654.

［11］ YONEDA S, NIEDERLEITNER B, WIGGENHORN M, *et al*. Quantitative laser diffraction for quantification of protein aggregates: comparison with resonant mass measurement, nanoparticle tracking analysis, flow imaging, and light obscuration［J］. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(1): 755-762.

［12］ HELBIG C, AMMANN G, MENZEN T, *et al*. Backgrounded membrane imaging (BMI) for high-throughput characterization of subvisible particles during biopharmaceutical drug product development［J］. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(1): 264-276.

［13］ VARGAS S K, ESKAFI A, CARTER E, *et al*. A comparison of background membrane imaging versus flow technologies for subvisible particle analysis of biologics［J］. *Int J Pharm*, 2020, **578**: 119072.

［14］ CORDES A A, CARPENTER J F, RANDOLPH T W. Accelerated stability studies of abatacept formulations: comparison of freeze-thawing- and agitation-induced stresses［J］. *J Pharm Sci*, 2012, **101**(7): 2307-2315.

［15］ BARNARD J G, SINGH S, RANDOLPH T W, *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］. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(2): 492-503.

［16］ BICKEL F, HEROLD E M, SIGNES A, *et al*. Reversible NaCl-induced aggregation of a monoclonal antibody at low pH: characterization of aggregates and factors affecting aggregation［J］. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **107**: 310-320.

［17］ 侯晴晴, 张毅兰. 预灌封注射器中硅油使蛋白药物产生不溶性微粒问题的探讨[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(6): 730-736.

［18］ GERHARDT A, MCGRAW N R, SCHWARTZ D K, *et al*. Protein aggregation and particle formation in prefilled glass syringes［J］. *J Pharm Sci*, 2014, **103**(6): 1601-1612.

［19］ KRAYUKHINA E, FUKUHARA A, UCHIYAMA S. Assessment of the injection performance of a tapered needle for use in prefilled biopharmaceutical products［J］. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(1): 515-523.

［20］ ZHOU C, CLELAND D, SNELL J, *et al*. Formation of stable nanobubbles on reconstituting lyophilized formulations containing trehalose［J］. *J Pharm Sci*, 2016, **105**(7): 2249-2253.

[21] SNELL J R, KUMAR N S K, SURYANARAYANAN R, *et al*. Nanobubbles in reconstituted lyophilized formulations: interaction with proteins and mechanism of formation [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(1): 284-292.

[22] FANG R, BOGNER R H, NAIL S L, *et al*. Stability of freeze-dried protein formulations: contributions of ice nucleation temperature and residence time in the freeze-concentrate [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(6): 1896-1904.

[23] HORN J, JENA S, AKSAN A, *et al*. Freeze/thaw of IGG solutions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, **134**: 185-189.

[24] CHISHOLM C F, KANG T J, DONG M, *et al*. Thermostable Ebola virus vaccine formulations lyophilized in the presence of aluminum hydroxide [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2019, **136**: 213-220.

[25] BLUEMEL O, RODRIGUES M A, BUECHELER J W, *et al*. Evaluation of two novel scale-down devices for testing monoclonal antibody aggregation during large-scale freezing [J]. *J Pharm Sci*, 2022, **111**(7): 1973-1983.

[26] HER C, CARPENTER J F. Effects of tubing type, formulation, and postpumping agitation on nanoparticle and microparticle formation in intravenous immunoglobulin solutions processed with a peristaltic filling pump [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(1): 739-749.

[27] NAYAK A, COLANDENE J, BRADFORD V, *et al*. Characterization of subvisible particle formation during the filling pump operation of a monoclonal antibody solution [J]. *J Pharm Sci*, 2011, **100**(10): 4198-4204.

[28] WU H, RANDOLPH T W. Aggregation and particle formation during pumping of an antibody formulation are controlled by electrostatic interactions between pump surfaces and protein molecules [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(4): 1473-1482.

[29] HER C, TANENBAUM L M, BANDI S, *et al*. Effects of tubing type, operating parameters, and surfactants on particle formation during peristaltic filling pump processing of a mab formulation [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(4): 1439-1448.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封底：中国医药工业信息中心

封三：鲁南厚普制药有限公司

27、100 页：公益广告