

蛋白质药物

——开发与生产

Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals

[美] S. L. 那伊 M. J. 阿凯尔斯 主编
Steven L. Nail Michael J. Akers

童望宇 沈亚领 张懿旻 译



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

TQ464.7
NY
C11

蛋白质药物 ——开发与生产

Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals

[美] S. L. 那伊 M. J. 阿凯尔斯 主编
Steven L. Nail Michael J. Akers

童望宇 沈亚领 张懿旻 译



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

蛋白质药物——开发与生产/[美] 那伊 (Nail, S. L.), [美] 阿凯尔斯 (Akers, M. J.) 主编; 童望宇等译. —北京: 化学工业出版社, 2006. 3
书名原文: Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals
ISBN 7-5025-8359-9

I. 蛋… II. ①那…②阿…③童… III. ①蛋白质-药物-开发②蛋白质-药物-生产 IV. TQ464. 7

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2006) 第 018003 号

Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals/Edited by Steven L. Nail and Michael J. Akers

ISBN 0-306-46745-3

Copyright©2002 by Springer Science+Business Media Inc. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Springer Science+Business Media Inc.

本书中文简体字版由 Springer Science+Business Media Inc. 授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2004-6127

蛋白质药物

——开发与生产

[美] S. L. 那伊 M. J. 阿凯尔斯 主编

童望宇 沈亚领 张懿旻 译

责任编辑: 杨燕玲

责任校对: 郑捷

封面设计: 史利平

*

化学工业出版社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

http: //www. cip. com. cn

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫印刷有限责任公司印刷

三河市东柳万龙印装公司装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 17 $\frac{3}{4}$ 字数 385 千字

2006 年 5 月第 1 版 2006 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8359-9

定价: 49.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

译者序

以重组蛋白质药物为主体的生物医药产业将成为本世纪的朝阳产业。1982年美国Lilly公司首先将重组胰岛素投放市场,标志着第一个重组蛋白质药物的诞生,当前全世界已有近百种蛋白质药物上市,数千种蛋白质药物处于各期研发阶段状态。蛋白质药物通常可分为多肽和基因工程药物、单克隆抗体和基因工程抗体、重组疫苗等。与以往的小分子药物相比,蛋白质药物具有高活性、高特异性、低毒性、生物功能明确、有利于临床应用的特点。由于具有生产成本较低、研发成功率较高、临床使用安全可靠的优点,蛋白质药物已成为医药产品中的重要组成部分。目前我国已开发成功21种基因工程药物和疫苗,批准上市的蛋白质药物已有19种。尽管如此,专论蛋白质药物剂型产业化的书籍此为首本。

本书为美国堪萨斯大学 Ronald T. Borhardt 教授主编的著名的《制药生物技术系列》中的第十四卷——《蛋白质药物——开发与生产》。本书由 Steven L. Nail 博士和 Michael J. Akers 博士主编,共8章,每章分别由各领域中专业知识、经验和写作能力杰出的专家撰写,适合于蛋白质药物研究、开发、生产、质量控制及管理部门的技术人员参考。

本书由童望宇、沈亚领、张颢旻共同翻译。由于译者水平有限,书中难免有诸多遗漏、错误和不足之处,敬请读者不吝指数,以便进一步完善与提高。在本书翻译过程中,得到了实验室李博、王凤清、姚雪凌及家人丁良霜、童斐斐的大力帮助,在此表示深深的谢意!

谨以本译文献给我善良、正直、勤劳可敬的父母!

童望宇

2006年3月

于华东理工大学

生物反应器工程国家重点实验室

序

未来制药研究人员面临的一个主要挑战将是为新一代的药物设计成功的剂型。这些药物中许多将为氨基酸单位的化合物（如多肽，蛋白质）、核苷单位化合物（如反义分子）、碳水化合物（如多糖）或脂类复合物。

通过合理的药物设计，合成药剂师正在筛选非常有效和专一的多肽和反义候选药。由于这些正被开发的药物分子具有与专一性大分子（如受体、酶、RNA、DNA）进行最佳相互作用的分子特性，因而具有药理效果。合理药物设计并不意味着合理药物释放，但它尽可能综合并兼顾药物分子传递特性，结合体内药物靶点和给药方式以获取最佳运输效果。

同合理药物设计一样，分子生物学对制药工业也具有重大的影响。它使得生产可用于药物应用的大批量高纯度的蛋白质、多糖及脂类物质成为可能。像多肽和反义分子一样，对于这些复杂的生物技术产品来说，成功的剂型设计对制药研究人员是一项主要的挑战。

可接受的药物剂型的开发是一个复杂的过程，需要制药公司许多部门，如研究、开发与生产部门研究人员间的同心协作。本书编辑及出版商衷心希望其能对制药公司开发领域的研究人员（如药物代谢、毒理学、药物动力学和药效学、药物释放、制剂前、制剂以及物理化学和分析化学）有显著帮助。此外，我们希望该书能对从事药物开发的科学家与从事研究的科学家（如药物化学、药理学、免疫学、细胞生物学及分子生物学）以及从事生产制造的研究人员（如过程化学、工程学）之间起到桥梁作用。对于新一代的药物来说，成功的剂型设计不仅需要某一个高水平专家，而且还需要制药领域中各部门间研究人员的高度协作。

最后，参编写本书的每位人员衷心希望本书对于从事培养新一代制药研究人员的教师也能大有益处。除了在各自学科领域具有高水平的专业技能外，青年研究人员还需具有与其他学科领域专家进行有效交流的技巧。

Ronald T. Borchardt

前 言

生物技术时代，现已有许多关于重组 DNA 技术及蛋白质化学的基础书籍，但很少有适合药物研发人员和负责这些新的生物药物与其他生物技术产品剂型产业化研发相关人员的系统文献。此书将帮助解决这一困窘。

一旦活性生物药物分子有望进入临床研究和随后的产业化，在继续研究与开发这些生物分子的同时，许多其他工作也必须随之进行。活性成分必须制成最终制剂以便于医务专业人员和病人使用必须清楚生物药物分子的性质，以便开发适当的终产品制剂。产品最终制剂的开发不仅包括化学组成，而且包括外形包装、生产工艺以及生产过程中确保产品性质（如安全性、一致性、药效、纯度和品质）符合“药品生产质量管理规范”（GMP）的合适的控制策略。

本书共分 8 章，主要描述多肽及蛋白质药物剂型的产业化过程。每章的作者均根据其专业领域知识、经验和写作能力而得以入选，每章的主题是根据多肽和蛋白质有效成分在商业药物剂型成功开发中的重要性精心筛选而出的。正如在制药工业中人们所熟知的那样，科学家与技术专家都必须与产品生产过程中的各个部门相结合，以使产品得到美国食品药品监督管理局及世界其他管理部门的批准。

我们以药物的预制剂研究为第 1 章。该章对蛋白质分子的早期研究进行了系统的介绍，这些研究对蛋白质药物的制剂开发及最终剂型的生产是必需的。对于并不精通与最终剂型相关的药物蛋白质性质进行规范分析的人员，该章一定能简单易懂地帮助他们应用这些技术和理解蛋白质的性质与稳定性。

第 2 章制剂开发包括了本书其他章节与广受欢迎的综述文章中的相关内容。专设本章是为了更加强调和拓宽制剂开发、包装、生产和质量控制间的相互作用。此章强调一个全盘性的、关于制剂开发的方法，而不仅仅是局限于稳定性和其他一些制药学相关的问题。

随后有四章内容对多肽和蛋白质药物生产中至关重要的加工过程——无菌处理、热杀菌工艺、膜过滤及冷冻干燥进行了介绍。无菌处理的原理可见于第 3 章。此章包括小规模（临床试验用产品）和商业化大规模的无菌处理，同时也包括关于溶液状、悬浮液状及冷冻干燥产品剂型的无菌处理。

虽然热杀菌不能直接应用于蛋白质制剂的杀菌，但它对于容器、密封系统及其他加工设备的杀菌是必不可少的消毒措施。第 4 章讲述了热杀菌的基本原理，可作为对不熟悉热杀菌知识的制剂与工艺研发人员的入门知识。

第 5 章介绍膜过滤的应用，包括蛋白质下游工艺中的错流过滤及药物终产品无菌处理时的死过滤。为蛋白质药物产品提供可靠的无菌保证，选择合适的膜及凝胶过滤系统和进行可靠的完整性测试，制药技术人员应该对膜的理论与实际应用有一个全面的了解。不论是蛋白质下游分离过程中还是最终无菌处理过滤中，过滤污染是过滤中的一个棘手的问

题。本章将对此问题的机理进行一些说明，并介绍几个成功应用的过滤实例。

由于溶液中多数药物相关的蛋白质的理化性质并不足够稳定，不能制备成直接使用的无菌溶液，冷冻干燥是蛋白质药物制剂中的一个基本单元操作。针对缺乏冷冻干燥知识背景的制剂与工艺人员的众多要求，第6章全面介绍了冷冻干燥科学与技术的基本知识。该章不是对蛋白质冷冻干燥的专述，而是对蛋白质冷冻干燥中特别值得关注的问题进行了讨论，并指明未来研究的领域。

当涉及非常复杂、高效力、相对不稳定、来源于生物技术生产的药物分子时，严格遵守药品生产质量管理规范要求具有更重要的意义。第7章综述了关于生物制药从大量的原料药到终产品生产过程中的质量保证与质量控制问题，重点阐述了生物药品的质量保证与质量控制中最常见的观点与实践方法。

第8章本身就自成为一本书。作者对导致生物技术出现的管理环境的演化过程给出了一个历史的回顾。该章非常完整而详细地介绍了美国当前对于生物药品注册规定的变化过程。

本书内容旨在满足生物制药研究人员及生物制药公司在工作中开发、生产、控制及管理部门其他技术人员的需求。我们相信在介绍多肽和蛋白质无菌剂型产业化的许多方面，此书的重要性是独一无二的。

致谢

我们感谢 Ronald T. Borchardt 教授邀请我们编写此书。我们也感谢我们的合作者对此书所做出的卓越贡献及付出。我们对为此书所引用的科技成果做出贡献的全球科学家、工程师和其他专家表示衷心的感谢。最感谢的是我们的妻子——Lisa Nail 和 Mary Akers，感谢她们的爱与支持！

Steven L. Nail
Michael J. Akers

原著编写人员

Michael J. Akers • Baxter Pharmaceutical Solutions LLC, Bloomington, Indiana 47402

Michael G. Beatrice • Corporate Regulatory and Quality Science, Abbott Laboratories,
Abbott Park, Illinois 60064-6091

Daniel J. Brose • Chemica Technologies, Inc. , Bend, Oregon 97701

Carl J. Burke • Department of Vaccine Pharmaceutical Research, Merck Research Laboratories,
West Point, Pennsylvania 19486

Suchart Chongprasert • Drug Control Division, Food and Drug Administration, Muang,
Nontaburi 11000, Thailand

Michael Dosmar • Separations Division, Sartorius Corp. , Edgewood, New York 11717

John Geigert • Biopharmaceutical Quality Solutions, Carlsbad, California 92009

Shan Jiang • Bayer Corporation, Clayton, North Carolina 27606

Maik W. Jornitz • Product Management, Sartorius AG, D-37075 Goettingen, Germany

Shawn A. Knopp • Genetics Institute, Andover, Massachusetts 01810

C. Russell Middaugh • Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Kansas,
Lawrence, Kansas 66047

Steven L. Nail • School of Pharmacy, Purdue University, West Lafayette, Indiana 47907

Gautam Sanyal • AstraZeneca Research and Development Boston, Waltham, Massachusetts 02451

Mary Stickelmeyer • Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana 46285

Michael Townsend • Isis Pharmaceuticals, Inc. , Carlsbad, California 92008

Vasu Vasudevan • Lilly Research Laboratories, Indianapolis, Indiana 46285

David B. Volkin • Department of Vaccine Pharmaceutical Research, Merck Research
Laboratories, West Point, Pennsylvania 19486

Richard T. Wood • Pfizer, Inc. , Terre Haute, Indiana 47808

目 录

1 预制剂研究	1
1.1 引言	1
1.2 蛋白质的结构特性和构象稳定性	2
1.2.1 紫外-可见光吸收光谱	3
1.2.2 荧光光谱	4
1.2.3 圆二色性光谱	6
1.2.4 傅里叶变换红外吸收光谱	8
1.2.5 差示扫描热量分析	9
1.3 蛋白质大小、四级结构、聚集状态和溶解度	10
1.3.1 电泳	10
1.3.2 色谱法	11
1.3.3 紫外分光光度法	12
1.3.4 分析型超速离心	13
1.3.5 光散射法	14
1.3.6 质谱	14
1.3.7 其他方法	15
1.3.8 溶解性	16
1.4 降解性共价反应及其对蛋白质理化性质和生物学特性的影响	16
1.4.1 制剂和储存过程中常见蛋白质结构的共价改变	17
1.4.2 蛋白质共价结构改变的检测方法及蛋白质共价修饰对构象完整性和 生物活性的影响	18
1.5 结论	21
参考文献	21
2 蛋白质药物剂型的开发	26
2.1 引言	26
2.2 为什么说蛋白质药物开发是独一无二的挑战	27
2.3 蛋白质药的一般制剂原则	28
2.4 为什么包装、生产与制剂是一个整体?	29
2.5 产业化的蛋白质药物剂型	30
2.6 化学稳定性	33
2.6.1 pH、水解与缓冲液	33

2.6.2	氧化、抗氧化剂及其他抗氧化方法	35
2.6.3	其他蛋白质化学不稳定性及制剂方法	37
2.7	物理稳定性	38
2.7.1	变性	38
2.7.2	聚集	39
2.7.3	吸附	39
2.7.4	沉淀	40
2.8	解决物理稳定性的制剂方法	40
2.8.1	表面活性剂	40
2.8.2	白蛋白	41
2.8.3	糖与多元醇	42
2.8.4	防冻剂	42
2.8.5	防失水剂	43
2.9	抗菌保护添加剂	45
2.10	其他添加剂	47
2.10.1	同渗重磨剂(张力)	47
2.10.2	冷冻干燥填充剂	47
2.10.3	悬浊剂	47
2.10.4	增溶剂	48
2.11	包装	48
2.11.1	玻璃	49
2.11.2	橡胶	50
2.11.3	塑料	53
2.11.4	硅树脂	54
2.11.5	给药器械	54
2.11.6	容器/塞子的密封完整性	55
2.12	制剂开发与生产界面	56
2.12.1	生产方法的前端分析	56
2.12.2	蛋白质产品生产的临界控制参数	58
2.12.3	临床试验药品	59
2.13	制剂开发期间的质量考虑	59
2.13.1	早期产品评价	59
2.13.2	文件记录	59
2.13.3	稳定性研究	60
2.13.4	经销中蛋白质产品稳定性的研究	62
2.14	制剂问题举例	62
2.14.1	聚集	62
2.14.2	氧化与脱氨	63
2.14.3	与玻璃表面的结合	63
2.14.4	与过滤器表面的结合	64

参考文献	65
3 蛋白质药品的无菌过程	72
3.1 引言	72
3.2 溶液剂、冷干剂及混悬剂的无菌过程	72
3.2.1 现行无菌过程	73
3.2.2 无菌生产的未来	82
3.3 蛋白质药无菌生产中的独特挑战	84
3.3.1 生产过程中的物理与化学稳定性	84
3.3.2 活性药物成分贮藏和影响蛋白质稳定性的配料事项	88
3.3.3 蛋白质的低浓度	90
3.3.4 蛋白质制剂的促微生物生长性质	94
3.3.5 器械清洗	94
3.3.6 消毒剂与灭菌剂的副作用	96
3.3.7 蛋白质制剂中的表面活性剂	96
3.4 药品生产的无菌工艺开发	97
3.4.1 实验室规模与早期临床试验生产工艺开发	98
3.4.2 III期临床与商业化生产工艺的开发	98
3.4.3 认证前的工艺开发研究	99
3.5 “药品生产认证”概念范围	101
3.5.1 认证总计划	101
3.5.2 稳定性批产品和产品/工艺批一致性材料整理	102
3.5.3 “产品认证协议”	102
3.5.4 “产品认证终报告”	103
参考文献	103
4 热杀菌的基本原理	106
4.1 引言	106
4.2 热对活细胞的影响	106
4.3 影响微生物抗热性的因素	107
4.3.1 物理/化学因素	107
4.3.2 水分含量	107
4.4 微生物的热失活	108
4.4.1 湿热杀菌	108
4.4.2 干热失活	108
4.5 无菌保证	109
4.6 热灭活动力学	109
4.6.1 对数减少值 (<i>D</i> 值)	109
4.6.2 温度系数或 <i>Z</i> 值	111
4.6.3 致死率	111

4.6.4	杀菌值 (F 值)	111
4.6.5	生物学指标	112
4.7	杀菌过程开发	113
4.7.1	终点建立	113
4.7.2	生物负荷的杀菌过程	113
4.7.3	生物负荷的监测	114
4.7.4	过度杀菌工艺	115
4.8	杀菌工程	115
4.8.1	蒸汽杀菌设备	115
4.8.2	干热灭菌/去热原设备	115
4.8.3	生产认证	115
4.9	终灭菌的药品参数发布	117
4.10	总结	117
	参考文献	117
5	膜过滤	119
5.1	引言	119
5.1.1	蛋白质药品生产中膜过滤器的应用	119
5.1.2	蛋白质药品生产中膜过滤的要求	122
5.2	过滤膜综述	123
5.2.1	过滤器与膜的发展史	123
5.2.2	过滤膜类型	124
5.3	膜过滤理论	126
5.3.1	膜过滤机理	126
5.3.2	膜过滤器操作理论	128
5.3.3	操作条件的影响	130
5.3.4	过滤器污染	131
5.4	无菌过滤过程	132
5.4.1	商用过滤膜	132
5.4.2	过滤器膜组类型	133
5.4.3	流速和压力操作模式	136
5.4.4	过滤器过早污染的防止	137
5.4.5	错流过滤器的清洗	138
5.4.6	无菌过滤系统的尺寸、设计与放大	139
5.4.7	工程实例: 无菌过滤的放大	141
5.4.8	过滤器系统准备与除菌	146
5.4.9	测试过滤器完整性的方法	146
5.4.10	认证发布	149
	附录 术语定义	150
	参考文献	151

6 冷冻干燥基础	153
6.1 引言	153
6.2 冷冻干燥过程综述	154
6.3 冷冻过程	156
6.3.1 溶质的结晶化	156
6.3.2 冷冻中的玻璃化	160
6.3.3 溶质的晶体与无定形体间冷冻干燥行为的差异	161
6.3.4 冷冻行为的其他类型	162
6.3.5 冷冻速率对蛋白质活性回收的影响	163
6.4 材料特性	164
6.4.1 热分析	165
6.4.2 光学显微镜	170
6.4.3 扫描电子显微镜	171
6.4.4 X射线粉末绕射	172
6.4.5 红外光谱	174
6.4.6 核磁共振	176
6.4.7 介电分析	177
6.5 干燥过程	178
6.5.1 冷冻干燥的退火	178
6.5.2 冷冻干燥过程中的坍塌	179
6.5.3 初级干燥中的传热与传质	180
6.5.4 二级干燥	182
6.5.5 过程监控	183
6.6 冷冻干燥制剂的稳定性	184
6.6.1 无定形体系中的分子运动和玻璃转换温度与稳定性的相关性	185
6.6.2 块收缩与贮藏时赋形剂的结晶	188
6.6.3 冷冻过程中的相分离：蛋白质稳定性涵义	189
6.7 总结	190
参考文献	191
7 生物制药产品的质量保证与质量控制	195
7.1 引言	195
7.2 生物制药生产厂家中的质量保证与质量控制	196
7.3 生物制药生产控制中的质量问题	197
7.3.1 表达构建研究	197
7.3.2 细胞基质研究	198
7.3.3 原料选择	200
7.3.4 生产认证研究	201
7.3.5 公共设施控制	203

7.4	生物制药产品的全面质量控制策略	206
7.4.1	产品特性	206
7.4.2	生产认证与放行检测	206
7.4.3	质量控制放行分析	207
7.4.4	技术规格	212
7.4.5	产品稳定性	215
7.5	生物制药公司中的质量最终评价	216
7.5.1	满足日益增加的遵从性期望	216
7.5.2	质量成本效率	217
7.5.3	步调的变化	218
7.5.4	万维网获取信息	219
	参考文献	219
8	蛋白质药物开发的管理	222
8.1	引言	222
8.1.1	生物技术的早期法规管理	223
8.1.2	传统生物制品的法规管理	224
8.1.3	遗传工程进展	226
8.2	生物技术产品的开发	227
8.2.1	模型生物技术产品的选择	228
8.2.2	生物技术“产品开发要旨”作为产品特性研究的一个支撑部分	230
8.3	生产变化	240
8.4	生产过程事项	241
8.4.1	发酵过程认证	241
8.4.2	细胞分离与收集	242
8.4.3	纯化	242
8.5	产品质量特性	243
8.5.1	纯度	243
8.5.2	药效	243
8.5.3	质量	244
8.6	新法规管理模式的演变	244
8.6.1	新法规管理模式的执行	251
8.6.2	完成新法规管理模式的未来必经之路	251
8.7	结论	252
	参考文献	252
	中西文名词对照	254

1 预制剂研究

David B. Volkin, Gautam Sanyal, Carl J. Burke, and C. Russell Middaugh

沈亚领 译

1.1 引言

预剂型研究通常是指主要药物原料的性质被细化到原料作为药物成分可接受的程度这样一个过程。对于传统的小分子（非大分子）药物，该过程通常可达到很严格的科学程度。例如，这些化合物原子水平的结构常通过 X 射线晶体学、核磁共振和质谱来得知，此外，与质谱检测器联用的现代高效色谱系统的灵敏度高到可简易地检测和确定这些化合物的改变后的形式。但是，较大分子和较高级结构（二级结构、三级结构、四级结构）的蛋白质结构复杂，使得研究小分子的较简易分析方法不能再简单地采用。不过，通过对蛋白质结构和稳定性的了解并采用更复杂的低分辨率方法学组合，将蛋白质视为一种化学实体（而不是生物实体）来处理还是有可能的。

一般实验者都希望通过 X 射线晶体分析和核磁共振来得到一种蛋白质早期候选药物原子水平分辨率结构，但这两种方法费时费力，且制备适合于 X 射线晶体学分析的蛋白质晶体非常困难，而核磁共振分析对蛋白质大小又有限制。然而如前所述，一旦通过这两种方法之一获得蛋白质结构，那么将被测样 X 射线晶体衍射谱或二维核磁共振谱与标准蛋白质谱图作比较就可以简单地确定蛋白质结构（Middaugh, 1994）。更重要的是，现代质谱方法，尤其是电喷雾和激光解析飞行时间质谱，已能高精度（即 0.01%）确定更大蛋白质的分子质量，但质谱法获得蛋白质构象的信息非常少，出于这个原因，对蛋白质预剂型的结构分析要广泛涵盖一系列针对不同蛋白质结构层面的检测方法。例如，可以通过远紫外圆二色谱和傅里叶变换红外光谱来鉴定蛋白质二级结构，用远紫外圆二色谱和分子内荧光法来鉴定三级结构。蛋白质寡聚状态及潜在的聚集现象可以通过分子筛色谱、分析型超离心、静态和动态光散射、化学交联的组合方法来探索。主要用来比较性探索不同蛋白质结构层面信息的技术有毛细管电泳、离子交换和反相高效液相色谱和等电聚焦。上述技术的组合应用可以勾勒出一个较完整的蛋白质结构图像，最重要的是，这些方法的适当组合可以检测蛋白质结构的改变，这些方法的使用在下面有更详细的描述。

蛋白质预剂型研究的最关键部分就是要找到蛋白质分子中的“薄弱点”。可以采用一套组合方法使一种蛋白质“受激”后评价其对各种物理和化学降解因素的敏感性，通常，温度、pH 和氧化还原条件最常用来诱导结构改变，因为这些因素通常可以显著增加蛋白质常见结构变化的速率，尽管这样的研究不能绝对地预测实时稳定性研究中的相应变化，

但可提供一些重要线索。蛋白质中最常见的化学变化包括天冬酰胺（或是相对少见的谷氨酰胺）残基的脱酰胺、肽键的断裂、胱氨酸的破坏、内部二硫键交换、半胱氨酸和甲硫氨酸的氧化、色氨酸、酪氨酸和半胱氨酸的光解，氨基的糖基化和氨甲酰化（Volkin 等，1995b）。这些变化常可以通过各种与质谱联用的色谱方法直接检查和鉴定，特别是变化程度显著时。如果蛋白质构象改变非常细微，检测就困难得多，因为实验者无法确定某一特定的方法，比如圆二色谱和荧光光谱，对发生改变的结构区域是否灵敏，这可能是蛋白质预制剂研究中最大的不确定性。不过应用多种检测技术和不同蛋白质环境刺激因素可使这种不确定性降至最小，并且能揭示在蛋白质天然状态下不能察觉的微小变化。鉴于此种考虑，如果能找到某蛋白质变性/复性可逆性条件，那么对蛋白质折叠和去折叠作透彻的热力学分析就非常有益，同样，研究蛋白质环境刺激因素对蛋白质聚集状态及主体可溶性的作用也非常有用。

这种信息对增强蛋白质稳定性的方法设计也有直接帮助。诸如蛋白质新的给药方式、冻干的必要性甚至重新设计蛋白质。在此我们特别强调三个方面。首先，如果一种蛋白质含有一个非常不稳定的关键残基，那么即使有潜在的免疫原性问题，也应该立即考虑构建合适的突变体。其次，如果一种蛋白质含有药理学上可接收的专一性配体结合位点，应该迅速找出并彻底研究这些位点，因为采用一种简单赋形剂可以大大提高蛋白质稳定性，此类情形的例子下面章节将作阐述。最后，如出于蛋白质稳定性和生物可利用度等原因对天然蛋白质作共价修饰，则应对所得的新蛋白质迅速开展类似的预制剂研究，因为针对修饰前天然蛋白质所作的前期研究不完全适用于修饰后。我们下面将更详细地讨论这些方法。

1.2 蛋白质的结构特性和构象稳定性

设计一个稳定的蛋白质剂型时，必须对蛋白质的折叠三级结构的完整性和稳定性进行全面分析，这是由于各种蛋白质拥有特有的生物学能力，能从初级结构正确折叠形成含最小自由能的高级结构。任何一种成功的剂型必须保证在实际的贮存环境中，尽可能长时间地维持这种“天然”结构。为了达到这一目的，我们应考虑如下研究方法：①灵敏地确定蛋白质天然结构不稳定性的生物物理学分析方法；②评估结构紊乱对功能的影响生物学分析方法；③天然结构稳态或去稳态热力学和动力学的监测方法。已经商品化或正处于开发阶段的药物蛋白质大部分都采用重组 DNA 技术制取，并且纯化过程可能涉及蛋白质的去折叠和重折叠，因此必须对此类蛋白质产品作生物物理学特性研究，以确证蛋白质具有正确折叠的生物学活性结构，这一步可视为过程研发的最后一步，或是蛋白质药物预剂型研究的第一步。

运用一些光谱学技术可以检测液态蛋白质的三级结构、评价蛋白质稳定性及不同剂型条件对蛋白质结构的影响，如果蛋白质溶液固有的热动力学稳定性不足以使蛋白质长时间贮存，剂型研究者也可以采用这些方法来筛选出合适的稳定剂。在下面的讨论中，我们将主要专注于光谱学技术，如紫外-可见光吸收、荧光（激发）、圆二色谱（CD）以及傅里叶变换红外（FTIR）吸收光谱。我们将讨论运用这些技术作蛋白质结构分析和折叠/去折叠研究，并讨论这些技术与蛋白质药物剂型开发的关系，此外还要讨论运用差示扫描热量（DSC）来监测蛋白质制剂的热稳定性。组合运用这些技术将为剂型研究者提供折叠后蛋

白质分子固有的结构稳定性方面的详细信息，这些信息能引导剂型研究者找到提高蛋白质稳定性的方法，并使蛋白质稳定性足以符合药用蛋白质要求。

1.2.1 紫外-可见光吸收光谱

源自三个芳香族氨基酸侧链（如：苯丙氨酸、色氨酸、酪氨酸）的近紫外吸收（250~320nm）带光谱特性依赖于它们所处的微环境，而当蛋白质的三级结构被打乱时，这种微环境就会改变。一般来说，随着周围环境极性增加的蛋白去折叠过程，其近紫外光谱会出现一个小的蓝移，结果，在280~295nm（含有色氨酸和酪氨酸残基贡献光谱中斜率最大的区间）范围内某一单波长吸收通常会发生变化，这种由扰动条件引起的变化极易监测。蛋白质折叠和去折叠状态之间的色氨酸或酪氨酸吸收改变的幅度通常比荧光检测观测到的变化要小得多，但紫外光谱有高精密度和高准确度特点，运用该光谱测量蛋白质的折叠和去折叠还是可行的。就如 Fink 和 Painter 对模型酶核糖核酸酶 A 所阐述的那样（1987），我们可以研究 pH、温度或离液剂对平衡态下蛋白质结构产生的影响。

运用紫外吸收强度的变化作为监测蛋白质折叠和去折叠信号时，如果蛋白质分子自我缔合到人射光波长相当的尺寸大小时，必须注意潜在的光散射可能引入显著的误差。当蛋白质去折叠或形成部分去折叠“熔球态”结构时，常常会发生聚集现象，这种现象在蛋白质制剂的热稳定性加速试验中也常常碰到。在300~350nm波长范围内，可以通过逐渐降低光密度值来揭示典型的光散射现象，因为这一范围内大部分蛋白质应该是没有特征吸收的。瑞利光散射理论指出，散射光强度与光波长的四次方成反比，显著的光散射甚至能产生近紫外最大吸收波长的假偏移，如果不进行修正，就可能被误解成芳香族残基所处的微环境中发生了变化进而构象发生改变。因此，在特定波长处，常利用光密度的对数值对波长的对数值作图来得到修正后的吸光值（Mach 等，1995）。

除了直接利用紫外光谱外，有实验表明，零阶光谱的二阶导数变换对芳香族氨基酸微环境极性改变后蛋白质三级结构的变化也非常敏感（Ragone 等，1984，1987）。与酪氨酸残基相比，电子基态时的色氨酸残基吸收对溶液极性的敏感性似乎要差一些，而荧光发射正好相反，因为荧光发射受电子激发态环境的影响要大得多，因此，这两种监测蛋白质结构变化的技术能很好地互补。目前已获得酪氨酸和色氨酸对二阶导数紫外吸收光谱去卷积的贡献（Mach 和 Middaugh，1994；Mach 等，1995），此外，258nm 处二阶导数光谱中苯丙氨酸的一个主要负峰也与酪氨酸和色氨酸峰分辨开来（Mach 等，1991），由此可见，在某一蛋白质的平衡和动力学去折叠或重折叠实验中，可以同时检测到这三个残基周围的大体环境变化。与通常的零阶紫外光谱相比，二阶导数紫外光谱的一个主要优点是可以将光散射造成的基线不稳定降到最低。

尽管 α -螺旋、 β -折叠和无序结构中的肽键在远紫外处能产生可辨别的吸收光谱，但通常我们不采用紫外吸收方法来监测蛋白质二级结构的变化，原因如下：①吸收带处在185~205nm 范围，这一波长范围内由于缓冲液中的盐和氨基酸侧链的干扰，使得精确测量变得困难；②这一波长范围内， β -折叠和无序结构的消光系数非常接近；③远紫外圆二色谱和傅里叶光谱为评价蛋白质二级结构成分及相关变化提供了更高、更精确的手段。