



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107850524 B

(45) 授权公告日 2021.03.12

(21) 申请号 201680040098.0

CN 101907549 A, 2010.12.08

(22) 申请日 2016.07.05

JP H0681117 A, 1994.03.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2014001409 A1, 2014.01.03

申请公布号 CN 107850524 A

CA 2430578 A1, 2003.11.30

(43) 申请公布日 2018.03.27

陈普敏 等. 采用泰勒分散法测量蜡分子扩散系数.《化工学报》.2014,第65卷(第2期),

(30) 优先权数据

陈普敏 等. 采用泰勒分散法测量蜡分子扩散系数.《化工学报》.2014,第65卷(第2期),

15175747.3 2015.07.07 EP

Mohsen Ghanavati 等. Application of

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

Taylor Dispersion Technique to Measure

2018.01.05

Molecular Diffusion Coefficient of

(86) PCT国际申请的申请数据

Hexane-Bitumen System.《AICHE JOURNAL》

PCT/GB2016/052025 2016.07.05

.2014,第60卷(第7期),

(87) PCT国际申请的公布数据

左敏 等. 利用泰勒分析和动态涂层毛细管电泳系统快速测定蛋白质的扩散系数.《高等学校化学学报》.2007,第28卷 (续)

W02017/006107 EN 2017.01.12

(73) 专利权人 马尔文仪器有限公司

审查员 褚为静

地址 英国伍斯特郡

(72) 发明人 奥克萨纳·巴克·尼·莱什奇申

赛伊·拉通德-达达 (续)

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司

责任公司 11240

代理人 梁丽超 田喜庆

(51) Int.Cl.

G01N 15/06 (2006.01) (续)

(56) 对比文件

US 2005182573 A1, 2005.08.18

CN 101793902 A, 2010.08.04

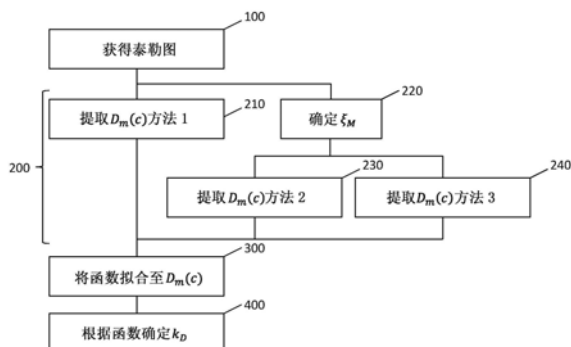
权利要求书2页 说明书9页 附图5页

(54) 发明名称

确定样品扩散特性和装置

(57) 摘要

一种确定溶剂内的互扩散系数 D_m 与溶质的浓度 c 之间的关系的方法。该方法包括：获得泰勒图(100)，该泰勒图包括溶质浓度 c 的多个测量值；以及根据泰勒图导出与溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数值 D_m (200)。



[转续页]

[接上页]

(72) 发明人 雷切尔·博特 卡尔·汉普顿

(51) Int.Cl.

G01N 35/08 (2006.01)

(56) 对比文件

Derek G. Leaist. Boltzmann Transformation of Taylor Dispersion Profiles to Determine Concentration-Dependent Diffusion Coefficients. Aqueous Cetylpyridinium Chloride near the Critical Micelle Concentration.《BERICHTE DER BUNSEN-GESELLSCHAFT-PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS》.1991,第95卷(第2期),

N. SARAFIANOS. An analytical method of

calculating variable diffusion coefficients.《JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE》.1986,第21卷

Cottet Herve 等. Determination of Individual Diffusion Coefficients in Evolving Binary Mixtures by Taylor Dispersion Analysis: Application to the Monitoring of Polymer Reaction.《ANALYTICAL CHEMISTRY》.2010,第85卷(第5期),

Seyi Latunde Dada. Analytic computations of nonideal corrections to blast wave overpressure predictions at high altitudes.《JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH: ATMOSPHERES》.2013,第118卷

1. 一种用于确定溶剂内的互扩散系数 D_m 与溶质的浓度 c 之间的关系的方法,包括:
获得包括溶质浓度 c 的多个测量值的泰勒图;

根据所述泰勒图导出与所述溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数 D_m 的值;

其中,所述方法包括将函数拟合至所述泰勒图;

其中,所述函数的形式为:

$$c = 0.5c_0 \operatorname{erfc}(u), \text{ 其中, } u = 0.5 \frac{y(t \pm t_M)}{\sqrt{t}}$$

其中, t 是测量时间; c 是浓度;并且 t_M 、 y 和 c_0 是待根据拟合确定的参数。

2. 根据权利要求1所述的方法,包括对所述泰勒图求微分以确定浓度相对于时间的变化率 $\frac{dc}{dt}$ 。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,根据拟合至所述泰勒图的所述函数并且根据所述浓度相对于时间的所述变化率来导出所述互扩散系数 D_m 的值。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,使用以下表达式来确定所述互扩散系数 D_m 的值:

$$D_m(c) = \frac{\left[-4 \frac{dc}{dt} \frac{\sqrt{\pi} t^{3/2} e^{u^2}}{(t + t_M) \sqrt{t_M}} \right]^2}{48} r^2 t_M$$

其中, r 是毛细管的半径。

5. 根据权利要求1所述的方法,包括对所述泰勒图执行变换以找出 ξ 与浓度 c 之间的关系,其中, $\xi = \frac{x}{2\sqrt{t}}$, ξ 是玻尔兹曼变换函数, x 是距离并且 t 是测量时间。

6. 一种用于确定溶剂内的互扩散系数 D_m 与溶质的浓度 c 之间的关系的方法,包括:
获得包括溶质浓度 c 的多个测量值的泰勒图;

从所述泰勒图中导出与所述溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数 D_m 的值;

还包括:对所述泰勒图执行变换以找出 ξ 与浓度 c 之间的关系,其中, $\xi = \frac{x}{2\sqrt{t}}$, ξ 是玻尔兹曼变换函数, x 是距离并且 t 是测量时间;以及

根据等式 $\xi_M = \frac{1}{c_L - c_R} \int_{c_R}^{c_L} \xi dc$ 确定界面 ξ_M ,其中, c_L 是浓度 c 的上限,并且 c_R 是浓度 c 的下限,反之亦然;

包括:

根据关系式 $c = 0.5c_0 \operatorname{erfc}(u)$ 确定与每个浓度值 c 相对应的 u 值;

使用关系式 $u = h(\xi - \xi_M) + m$,通过将直线拟合至 u 与 ξ 之间的关系式来确定参数 h 和 m ,

其中,导出与所述溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个所述互扩散系数 D_m 的值

包括使用关系式 $\frac{1}{h^2} + \frac{m\sqrt{\pi}}{h^2} \operatorname{erfc}(u) \exp(u^2) = \frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)}$,其中 v 是毛细管中的平均流速。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中, 通过数值确定与不同浓度 c 相对应的多个微分 $\frac{d\xi}{dc}$ 和多个积分 $\int_0^c \xi - \xi_M dc$ 并且使用表达式 $-\frac{1}{2} \frac{d\xi}{dc} \int_0^c \xi - \xi_M dc = \frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)}$, 来执行导出多个所述互扩散系数 D_m 的值, 其中 v 是毛细管中的平均流速。
8. 一种用于确定溶剂内的互扩散系数 D_m 与溶质的浓度 c 之间的关系的的方法, 包括:
获得包括溶质浓度 c 的多个测量值的泰勒图;
从所述泰勒图导出与所述溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数 D_m 的值; 以及
包括根据所述互扩散系数 D_m 的值与对应的浓度 c 之间的关系 $D_m(c)$ 来确定溶液中的所述溶质的扩散相互作用参数 k_D 。
9. 根据权利要求8所述的方法, 包括根据所述扩散相互作用参数 k_D 、摩擦系数 k_f 的估计以及所述溶质的微分比容 v_2 的估计来确定第二维里系数 A_2 。
10. 一种用于确定溶剂内的互扩散系数 D_m 与溶质的浓度 c 之间的关系的的方法, 包括:
获得包括溶质浓度 c 的多个测量值的泰勒图;
从所述泰勒图导出与所述溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数 D_m 的值; 以及
包括根据在所述泰勒图的持续时间内的所述互扩散系数的值来估计溶质颗粒团聚的度量。
11. 一种包括处理器的处理装置, 所述处理装置被配置为执行前述权利要求中的任何一项所述的方法。
12. 根据权利要求11所述的处理装置, 包括用于执行泰勒分散分析以获得泰勒图的仪器。

确定样品扩散特性的方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及一种确定样品扩散特性的方法,更具体而言,根据泰勒图这样做的方法。

背景技术

[0002] 开发在蛋白质团聚中保持稳定的生物制药产品是生物制药行业面临的主要挑战。因此,已进行重要研究来理解蛋白质自缔合或团聚调控机制以及如何防止或缓减其发生。对浓缩蛋白质溶液的影响变得更为显著的弱的或非特异性的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)已被确定为不可逆团聚物形成的一种途径(Lehermayr等,2011,Assessment of net charge and protein-protein interactions of different monoclonal antibodies, Journal of Pharmaceutical Sciences,100 (7):2551-2562;Connolly等,2012,Weak interactions govern the viscosity of concentrated antibody solutions:high-throughput analysis using the diffusion interaction parameter,Biophysical Journal,103:69-78)。

[0003] 稀释蛋白质溶液中的相互作用力和最终制剂中蛋白质团聚倾向之间的关系并不直接并且是溶质和溶剂特性(例如浓度、离子强度和pH)之间复杂的相互作用的产物(Saluja等,2008,Nature and consequences of protein-protein interactions in high protein concentration solutions,International Journal of Pharmaceutics,358:1-15)。这种关系由于赋形剂的存在而进一步复杂化,并且意味着对于开发中的每种制剂来说,经验性地确定蛋白质-蛋白质相互作用是必要的;并且这可达数百种不同的组合。

[0004] 扩散相互作用参数(k_D)是描述给定介质中溶质分子之间相互作用力的一个度量,并且有大量证据表明其可以成功预测制剂的团聚倾向(Saluja等,2010,Diffusion and sedimentation interaction parameters for measuring the second virial coefficient and their utility as predictors of protein aggregation, Biophysical Journal,99:2657-2665)。用于确定 k_D 的最广泛使用的技术是动态光散射(DLS),这是因为其允许互扩散系数(D_m)的相对不重要的测量; D_m 是 k_D 说明中的关键参数。为了确定 k_D ,一种是在一系列溶质浓度下测量互扩散系数,并且该值作为浓度的函数的曲线从斜率产出 k_D (等式1)。同样可从y截距中提取自扩散系数(D_0),该自扩散系数(D_0)描述了无限稀释分子的扩散以及单分子布朗运动的量度。

[0005] $D_m = D_0 (1 + k_D C)$ (等式1)

[0006] 更大的正 k_D 值表明在溶液中蛋白分子之间的排斥力占主导,而增长的负值则表明相互作用具有吸引倾向并且进而表明了不稳定状况。

[0007] 虽然数据收集行为简单并且该技术经由酶标仪很容易进行高通量筛选,但通过DLS的 k_D 确定可能因方法论问题而变得更加困难。第一个这种困难涉及由不同大小的颗粒所表现出来的偏置散射强度;其中,散射强度大约与分子半径的六次方(r^6)成正比。由于报告的是平均扩散系数,因此,结果值可能易受较大颗粒的偏离所影响。最糟糕的是,当存在

高阶团聚物或灰尘时,结果可能无法使用。实际上,这意味着样品必须相对纯净并且在测量期间保持稳定。这可能需要诸如过滤的清理过程,清理过程可能对某些类型的样品即非合理也非恰当。第二个问题涉及溶质浓度对样品体积粘度的潜在影响,从而可能反过来影响在此环境下分子的扩散。增加粘度起到限制扩散的作用,并且从而使颗粒看起来将比其实际上更大。就DLS而言,这意味着为了确定发生受限扩散所在数据点的正确的扩散系数,所有浓度下的粘度必须为已知,或者限制研究人员在不再具有代表性或相关性的条件下操作。

[0008] 核磁共振(NMR)是可用于确定 k_D 的第二种技术;然而,这种确定是非平凡的。专门的溶剂或样品构造的使用可能给样品制备引入复杂度,并且测量条件可能与最终制剂中的测量条件不同。在NMR测量中,在特定弛豫区域也必须发生分子扩散,并且特别地,这使得获得对于较大分子的准确的扩散系数更具挑战性。而且,必须考虑因污染物的存在导致的可能的误解,并且考虑可能需要专门人员进行有意义分析的过于复杂的光谱。此外,利用NMR确定扩散系数相当耗时并且价格昂贵,并且因而不适合大规模的筛选。

[0009] 超离心沉降速度法(SV-AUC)和自相互作用色谱(SIC)不能直接测量 k_D ,但是可以分别测量诸如沉降相互作用参数(k_s)和第二维里系数(A_2)的类似参数。

[0010] 可使用泰勒分散分析来导出互扩散系数。例如,可根据对脉冲泰勒图的最佳拟合的高斯分布的宽度来确定注入的样品的互扩散系数。通常,假设与互扩散系数的这种单个值相对应的浓度为注入时样品的浓度,而不考虑因分散导致的浓度的任何减少。要确定浓度与互扩散系数之间的关系,就需要不同的样品注入浓度下的这种测量的序列。

[0011] 上述技术要求在精确已知浓度(以及粘度)下制备和测量多个样品。当试图使参数与特性相关联时,使用单一完好而未修改的样品来操作是更有利的。

[0012] 期望的是一种研究样品扩散特性(例如互扩散系数随溶质浓度的变化)以及克服或改善这些问题中的至少一些的扩散相互作用参数的方法。

发明内容

[0013] 根据本发明的第一个方面,提供了一种确定溶剂内的互扩散系数 D_m 与溶质的浓度 c 之间的关系的方法。该方法包括:获得包括溶质浓度 c 的多个测量值的泰勒图;以及根据泰勒图导出与溶剂中的多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数值 D_m 。

[0014] 根据(单个)泰勒图导出与多个不同的溶质浓度相对应的多个互扩散系数避免了在不同浓度下制备多个样品并且获得多个样品中的每一个的泰勒图的需求。在不同(初始)浓度下制备和单独分析(无论是通过DLS还是TDA)多个样品表示用于确定互扩散系数 D_m 与浓度 c 之间的关系的现有技术方法。由于本公开的实施方式使能够根据单个泰勒图(并且因此,单个样品)确定互扩散系数 D_m 与浓度 c 之间的关系,因此,本公开表示现有技术上的重大突破。

[0015] 该方法可进一步包括:将函数拟合至泰勒图。

[0016] 函数可以是以下形式:

$$[0017] \quad c = 0.5c_0 \operatorname{erfc}(u), \text{ 其中, } u = 0.5 \frac{y(t \pm t_M)}{\sqrt{t}},$$

[0018] 其中, t 是测量时间; c 是浓度;并且 t_M 、 y 和 c_0 是待根据拟合确定的参数。

[0019] 该方法可进一步包括：对泰勒图求微分以确定浓度相对于时间的变化率 $\frac{dc}{dt}$ 。

[0020] 可根据拟合至泰勒图的函数并且根据浓度相对于时间的变化率来导出互扩散系数值 D_m 。

[0021] 可利用以下表达式来确定互扩散系数值 D_m ：

$$[0022] \quad D_m(c) = \frac{\left[-4 \frac{dc}{dt} \frac{\sqrt{\pi} t^{3/2} e^{u^2}}{(t + t_M) \sqrt{t_M}} \right]^2 r^2 t_M}{48}$$

[0023] 其中， r 是毛细管的半径。

[0024] 该方法可进一步包括对泰勒图执行变换以找出 ξ 与浓度 c 之间的关系，其中，

$$\xi = \frac{x}{2\sqrt{t}}。$$

[0025] 该方法可进一步包括：根据等式 $\xi_M = \frac{1}{c_L - c_R} \int_{c_R}^{c_L} \xi dc$ 确定界面 ξ_M ，其中， c_L 是浓度 c 的上限并且 c_R 是浓度 c 的下限，或其中， c_L 是浓度 c 的下限并且 c_R 是浓度的上限。

[0026] 该方法可进一步包括：

[0027] 根据关系 $c = 0.5c_0 \operatorname{erfc}(u)$ 确定与每个浓度值 c 相对应的 u 值；

[0028] 利用关系 $u = h(\xi - \xi_M) + m$ ，通过将直线拟合至 u 与 ξ 之间的关系来确定参数 h 和 m ；

[0029] 其中，导出与溶剂中多个不同的溶质浓度 c 相对应的多个互扩散系数值 D_m 包括使

$$\text{用关系式} \frac{1}{h^2} + \frac{m\sqrt{\pi}}{h^2} \operatorname{erfc}(u) \exp(u^2) = \frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)}。$$

[0030] 可通过数值确定与不同浓度 c 相对应的多个微分 $\frac{d\xi}{dc}$ 和多个积分 $\int_0^c \xi - \xi_M dc$

并且使用表达式 $-\frac{1}{2} \frac{d\xi}{dc} \int_0^c \xi - \xi_M dc = \frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)}$ ，来执行导出多个互扩散系数值 D_m 。

[0031] 该方法可进一步包括：根据互扩散系数值 D_m 与对应的浓度 c 之间的关系 $D_m(c)$ 来确定溶剂中溶质的扩散相互作用参数 k_D 。

[0032] 该方法可进一步包括：根据扩散相互作用参数 k_D 、以及摩擦系数 k_f 的估计和溶质的微分比容 v_2 的估计来确定第二维里系数 A_2 。

[0033] 该方法可进一步包括：根据在泰勒图期间的互扩散系数的值来估计溶质颗粒团聚的度量。

[0034] 根据第二个方面，提供了一种包括处理器的装置，该处理器被配置为执行第一个方面的方法。

[0035] 该装置可进一步包括执行泰勒分散分析以获得泰勒图的仪器。

[0036] 根据第三个方面，提供了一种机器可读介质，该介质包括用于配置处理器以执行根据第一个方面的方法的指令。

附图说明

[0037] 现在将参考附图对实例进行说明，其中：

- [0038] 图1是研究扩散特性的方法的示意图；
- [0039] 图2是示出了用于提取互扩散系数与浓度之间的关系的三种替代选择概述的示意图；
- [0040] 图3是示出了用于提取互扩散系数与浓度之间的关系的三种替代方法中的第一种示意图；
- [0041] 图4是示出了用于提取互扩散系数与浓度之间的关系的三种替代方法中的第二种的示意图；
- [0042] 图5是示出了用于提取互扩散系数与浓度之间的关系的三种替代方法中的第三种的示意图；
- [0043] 图6示出了浓度相对于 ξ 绘制的曲线图；
- [0044] 图7是根据实施方式的装置的示意图；
- [0045] 图8是碘化物溶液中BSA的正向泰勒图，其可用于实施方式中确定互扩散系数与浓度之间的关系；以及
- [0046] 图9是示出了根据实施方式的用于获得自扩散系数 D_0 和扩散相互作用参数 k_D 的估计以与根据泰勒图获得的估计相比较的一系列DLS测量值的曲线图。

具体实施方式

- [0047] 泰勒分散是利用剪切流加强样品的有效扩散率的过程。毛细管中的层流导致了流速和径向位置的变化。靠近管壁处，流动大体上是静止的，并且流速在中心处最大。这导致了相邻层的剪切，进而加强了样品的分散。
- [0048] 可使用泰勒分散分析(TDA)来分析样品中的种类的特性。可将一块(a plug of)样品注射至微孔毛细管中并且随后当其沿层流区域内的毛细管遍历时分散。注射的一块样品可以是狭窄的(具有较短的持续时间)，这也可称为样品脉冲，从而产生了脉冲泰勒图。可替换地，注射的一块样品可以长(即，具有较长的持续时间)，这也可称为样品的一部分，导致正向泰勒图。该块展现出的分散程度取决于该块中分子的扩散率并且可以在注射部位下游的一个或多个点处测量。响应于样品的种类的浓度检测器可位于注射部位下游的一个或多个位置。因此，浓度检测器(例如，UV-可见光光谱仪)可产生信号，该信号与经过检测器的流体的每个截面内的分子浓度成正比。来自检测器的结果信号典型地被称为与分子浓度的时间分辨分布相对应的泰勒图，泰勒图的宽度与样品种类的流体力学半径相关。
- [0049] 参考图1，根据示例性实施方式的一种方法包括：在步骤100获得泰勒图；并且然后在步骤200，例如通过在对应的多个不同浓度值处计算多个互扩散系数的值，根据泰勒图提取(或测定)互扩散系数 D_m 与浓度 c 之间的关系 $D_m(c)$ 。明显地，在下文中更加充分地公开的方法可以根据单个泰勒图确定互扩散系数与浓度之间的关系。
- [0050] 在100处获得的泰勒图可从块式注射或脉冲注射生成并且可以包括单个检测点或多个检测点。
- [0051] 一旦已获得 $D_m(c)$ ，那么在步骤300中，例如通过绘制 $D_m(c)$ 并将直线拟合至该关系，可以将函数拟合至 $D_m(c)$ 。在步骤400中，然后可以提取函数的参数并将该参数用于确定扩散相互作用参数 k_D 。
- [0052] 可替换地，在步骤600中，可使用互扩散系数与浓度之间的关系 $D_m(c)$ 来确定泰勒

图的过程中的团聚百分比。例如,团聚将导致互扩散系数发生变化,因此,互扩散系数 $D_m(c)$ 的不连续性可表明颗粒的团聚。

[0053] 可替换地,在步骤500中,例如利用分子量、摩擦系数和溶质的微分比容的估计,扩散相互作用参数 k_D 可反过来用于确定第二维里系数 A_2 。

[0054] 参考图2,示意性地示出了用于确定互扩散系数 D_m 与浓度 c 之间关系 $D_m(c)$ 的三种不同的示例性方法。提取 $D_m(c)$ 的步骤200扩展为三种不同的方法。这些方法中的第一种方法210与第二种方法230和第三种方法240不同。第二种方法230和第三种方法240均涉及在步骤220确定界面 ξ_M 。

[0055] 现在将更加详细地描述每种方法。本发明适应于根据单个测量值生成的泰勒图确定相互作用参数 k_D 的扩散。可以以段的形式注射样品以建立正向泰勒图或以脉冲的形式注射样品以建立脉冲泰勒图。示例性方法中的数学运算处理的是正向泰勒图,但技术人员将认识到可直接将此方法用于脉冲泰勒图。该方法使用泰勒图过程中浓度的固有变化来提供浓度系列,在浓度系列中参考与互扩散系数 D_m 相关的浓度来确定分子之间的相互作用状态。

[0056] 虽然通常使用UV吸收来确定泰勒图中的浓度,但该方法也将用于产生信号的任何检测方法,在该方法中,来自颗粒的浓度和信号可以例如基于以下中的任何一个:折射率、经由消光系数的荧光)合理地相关。泰勒图中的每个点均表示浓度,因此,单个泰勒图提供了多个溶质浓度。

[0057] 方法1——显式微分法

[0058] 该方法210在图3中示意性地示出。首先,在步骤211中,将函数拟合至泰勒图。函数可以是以下形式:

$$[0059] \quad c = 0.5c_0 \operatorname{erfc}(u) \quad (\text{等式2})$$

[0060] 其中,

$$[0061] \quad u = 0.5 \frac{y(t \pm t_M)}{\sqrt{t}} \quad (\text{等式3})$$

[0062] 其中, t 是测量时间,并且 t_M 是待根据拟合确定的参数。在 $t \pm t_M$ 术语中的正或负号分别用于指定针对正向泰勒图的前缘和后缘的分析。注意,尽管估计了 y ,但是 y 在本方法中可能多余。

[0063] 接下来,在步骤212中,对泰勒图(或拟合至泰勒图的函数)求微分,例如,使用Savitzky-Golay微分(或差分法),以获得 $\frac{dc}{dt}$ 。

[0064] 接下来,根据下面等式4从 $\frac{dc}{dt}$ 确定 h' :

$$[0065] \quad h'(C) = -4 \frac{dc}{dt} \frac{\sqrt{\pi} t^{3/2} e^{u^2}}{(t+t_M)\sqrt{t_M}} \quad (\text{等式4})$$

[0066] 可针对泰勒图中的每个数据点确定 h' 的值。注意,确定 h' 并不是必要的步骤,而仅在于提供更详尽的计算描述。在一些实施方式中,可将 h' 的表达式替换成下面的等式5和 $D_m(c)$ 。

[0067] 最后,使用以下表达式确定互扩散系数 $D_m(c)$ (213):

$$[0068] \quad D_m(c) = \frac{h'(c)^2 r^2 t_M}{48} \quad (\text{等式 } 5)$$

[0069] 方法2和3的共同特征

[0070] 第二种和第三种示例性方法都共享用于确定图2、图4和图5所示的参考值 ξ_M 的步骤220。

[0071] 以下给出了在半径 r 的毛细管中以平均速度 v 流动的缓冲液中的样品块的泰勒分散关系：

$$[0072] \quad \frac{\partial c}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial x} \left[k(c) \frac{\partial c}{\partial x} \right] \quad (\text{等式 } 6)$$

[0073] 其中, c 是浓度, x 是相对于块的初始边缘分散的距离, k 是由 $\frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)}$ 给出的分散系数。

[0074] 使用玻尔兹曼变换 (221) ,

$$[0075] \quad \xi = \frac{x}{2\sqrt{t}} \quad (\text{等式 } 7)$$

[0076] 可重新整理等式6得到：

$$[0077] \quad -2\xi \frac{dc}{d\xi} = \frac{d}{d\xi} \left[k(c) \frac{dc}{d\xi} \right] \quad (\text{等式 } 8)$$

[0078] 这可求解得到：

$$[0079] \quad k(c) = -\frac{1}{2} \frac{d\xi}{dc} \int_0^c \xi - \xi_m dc = \frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)} \quad (\text{等式 } 9)$$

[0080] 其中, ξ_m 定义了参考点,必须正确确定参考点使互扩散系数在物理上具代表性。该参考点通过下面条件来约束：

$$[0081] \quad \int_{c_R}^{c_L} (\xi - \xi_M) dc = 0 \quad (\text{等式 } 10)$$

[0082] 其中, c_L 和 c_R 是泰勒图的左右浓度限值(即,与最大和最小浓度值对应,取决于是否对正向泰勒图的前缘或后缘执行该方法)。参考点 ξ_M 可以定义界面,并且通常不且可以与 $\xi=0$ 一致。

[0083] 然而,就恒定体积分散(在泰勒分散中通常就是这样)而言,界面可以与 $\xi=0$ (即,与块的初始边缘相对应)一致。通常,在大量分散后,该边缘并未正确定义,而是可根据以下关系来确定 (222) :

$$[0084] \quad \xi_M = \frac{1}{c_L - c_R} \int_{c_R}^{c_L} \xi dc \quad (\text{等式 } 11)$$

[0085] 因此,给定 c 作为 ξ 以及参考点 ξ_M 的函数的浓度分布,可以确定作为 c 的函数的 k 的值。这可通过第二或第三种方法来实现。

[0086] 方法2

[0087] 该方法考虑 c 作为 ξ 的函数的浓度分布,如图6所示。

[0088] 评估函数：

$$[0089] \quad c = 0.5 c_0 \operatorname{erfc}(u) \quad (\text{等式 } 12)$$

[0090] 获得针对泰勒图的每个值 c 的 u 值。使用玻尔兹曼变换(由等式7定义)来确定 ξ 与浓

度 c 之间的关系(231)。经由浓度 c ,可随后确定 u 与 ξ 之间的关系。可根据以下来拟合函数以描述这种关系(232)(例如,通过绘制相对于 ξ 的 u 并用直线拟合):

$$[0091] \quad u = h(\xi - \xi_M) + m \quad (\text{等式13})$$

[0092] 其中, h 和 m 是通过拟合确定的参数。将等式13插入等式12,并且然后在等式9中对 k (c)求解,得到:

$$[0093] \quad k(c) = \frac{1}{h^2} + \frac{m\sqrt{\pi}}{h^2} \operatorname{erfc}(u) \exp(u^2) = \frac{r^2 v^2}{48 D_m(c)} \quad (\text{等式14})$$

[0094] 根据以上等式直接确定 $D_m(c)$ (233)。

[0095] 方法3

[0096] 该方法可利用数值或图形来执行,并且涉及在等式9中的积分 $\int_0^c \xi - \xi_m dc$ 和微分 $\frac{d\xi}{dc}$ 的评估或估计(241),等式9直接来源于转换后的浓度分布 $c(\xi)$ 。技术人员将意识到存在各种技术来根据这些数据(来自曲线图的数字的或图形的)来近似估计微分和积分。可以在执行变换之前或之后,例如使用移动平均数或通过Savitzky-Golay滤波器来执行数据的平滑或滤波。

[0097] 第二维里系数

[0098] 适用于测量蛋白质-蛋白质相互作用的另一紧密相关的参数是第二维里系数 A_2 ,也称为渗透维里系数(B_{22} 或 B_2)。第二维里系数通过以下表达式(等式15)链接到 k_D ,其中, M_W 是蛋白质的分子量, k_f 是摩擦系数,并且 v_2 是微分比容。

$$[0099] \quad k_D = 2M_W A_2 - k_f - 2v_2 \quad (\text{等式15})$$

[0100] 在此,正的和负的 A_2 值分别表示蛋白分子之间的排斥力和吸引力。

[0101] 假设摩擦系数和微分比容是已知的或可以以其他方式估计或确定,则也可使用 k_D 来提取 A_2 参数。

[0102] 团聚

[0103] 互扩散系数 $D_m(c)$ 提供了分析中的种类平均尺寸的度量。由于种类通过毛细管过渡,因此它们在空间上分布在块内。利用这一知识并且通过测量一段时间内收集的每个数据点处的扩散系数,可以根据泰勒图上的扩散系数 $D_m(c)$ 的变化估计团聚的度量(例如,比例或百分比团聚)。

[0104] 装置

[0105] 参考图7,示出了根据实施方式的装置40。装置40包括仪器50、处理器51、输出设备52和输入设备53。可操作仪器50以对样品执行泰勒分散分析,以产生泰勒图数据71。根据实施方式(例如,如上述实施方式),处理器51可被配置为估计用于将模型(例如,高斯、误差函数)拟合至泰勒图数据71的参数。处理器51可向输出设备52提供输出72,该输出设备52可包括显示器或打印机。基于由处理器51拟合至数据71的模型,输出72可包括模型参数估计,和/或经仪器50分析的样品特性的估计。处理器51可被配置为将估计的模型参数(根据实施方式确定的)作为数值搜索的起始点,以最佳拟合至泰勒图数据71(例如,经由基于最小二乘法的回归分析)。可提供输入设备53以用于控制处理器51和/或仪器。输入设备53可包括键盘、鼠标或其他适当的用户界面装置。

[0106] 仪器50可包括连接两容器的毛细管。液体从第一容器驱动(例如,在常压下)至第二容器。第一容器包括操作(或载体)溶液,使得毛细管在初始就充满了操作溶液。然后将第一容器与毛细管断开,并且连接包含样品溶液的第三容器。样品溶液可以是溶解在操作/载体溶液中或不同介质中的医药或生物制药类型。该不同介质可能与操作/载体溶液的不同之处在于具有在不同于操作/载体溶液的浓度下溶解的赋形剂,例如,盐或糖。这可以适合于稳定的活性药物类型的制剂。

[0107] 第一和第二窗口沿着第一和第二容器之间的毛细管的长度间隔开。毛细管可以环状形成,使得例如通过在由区域成像检测器的像素阵列成像的区域内将其彼此相邻布置,可利用单个光学组件对第一和第二窗口进行成像。在其他的实施方式中,可使用单个窗口,或检测器可包括单个元件而非像素阵列。

[0108] 为了将一块样品注入毛细管,可将第三容器连接至毛细管,并且然后在压力下注入适当样品体积后断开连接。当将第三容器与毛细管断开时,将第二容器连接至毛细管。检测器捕捉帧序列,该帧序列包括在检测器处接收到的光强度的度量,作为样品溶液的脉冲或穿过第一和第二窗口中的每一个的流体前沿。从而,检测器输出提供关于吸光度随时间的数据:泰勒图。

[0109] 实例结果

[0110] 此处所描述的方法论适用于从BSA(牛血清白蛋白)获得的正向泰勒图,该BSA在碘化物和硫酸盐缓冲液中于30mg/mL的终浓度下制备。在140mbar下将样品持续注入微孔毛细管(ID 75 μ m)3分钟并且利用相同压力洗脱。使用UV检测在波长280nm下记录泰勒图。

[0111] 图8示出根据实施方式的从碘化物缓冲溶液中的BSA的样品获得的正向泰勒图801的实例,从该正向泰勒图可获得自扩散系数 D_0 和扩散相互作用参数 k_D 。

[0112] 图9示出了根据用于测定 D_0 和 k_D 的传统现有技术方法论的通过对多个样品浓度中的每一个执行DLS获得的在碘化物缓冲液901和硫酸盐缓冲液903中的BSA的扩散系数值。可使用最佳拟合902、904来测定 D_0 和 k_D (根据等式1)。

[0113] 明显地,与本公开使用单个初始样品和单个泰勒图的实施方式相比,根据现有技术方法的样品制备和分析都相当费力。这些评论同样适用于通过现有技术TDA方法对这些参数的测定,现有技术TDA方法也要求制备类似系列的样品浓度以用于注射和分析。自动稀释和自动样品处理可减少部分麻烦,但将导致更复杂、更昂贵的仪器,并且执行这类一系列测量也将花费大量的时间且耗费大量的样品,这在早期药物开发环境下(可用的样品数量可能非常少/贵)可能是禁止的。

[0114] 在下面表1中对结果进行了总结:

[0115] 表1——结果汇总。使用第一、第二和第三示例性方法的自扩散系数和相互作用参数的确定。还示出了与传统DLS方法的比较。

	缓冲液	参数	方法			DLS
			1	2	3	
[0116]	碘化物	D_0	54.55	54.67	56.16	59.3
		$(\mu\text{m}^2/\text{s})$				
	硫酸盐	k_D	0.016	0.016	0.012	0.016
		D_0	54.68	54.70	54.94	58.4
		$(\mu\text{m}^2/\text{s})$				
		k_D	0.009	0.009	0.009	0.009

[0117] 所有方法均与DLS结果和逆Hofmeister效应期望的趋势保持良好的一致性。

[0118] 在由所附权利要求定义的本发明的范围内,多种其他变化是可行的。

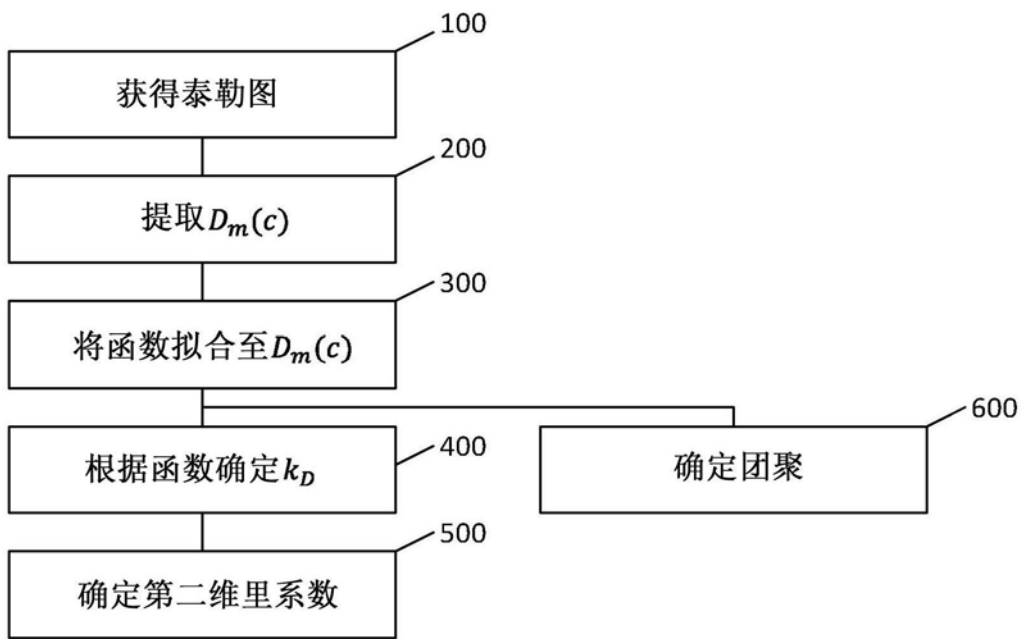


图1

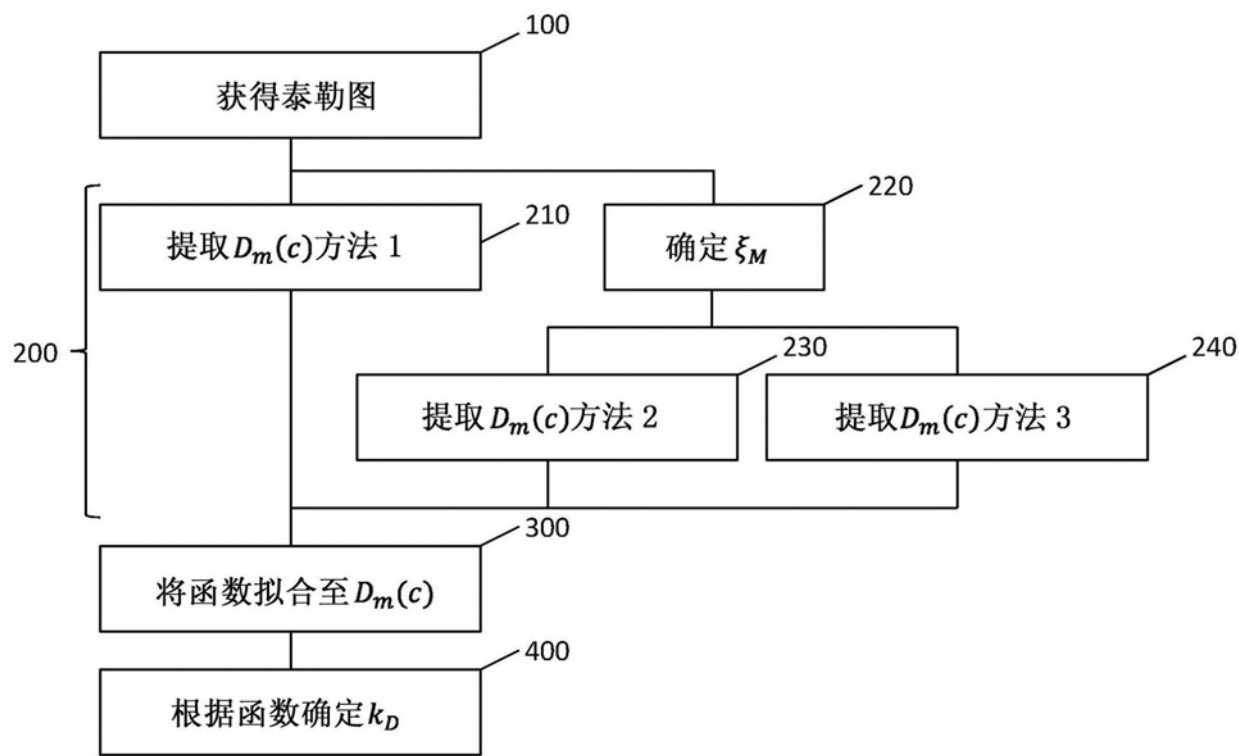


图2

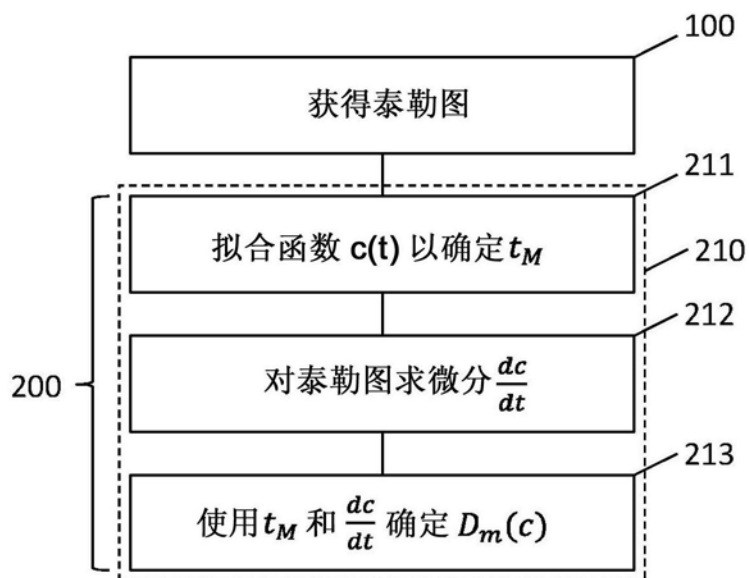


图3

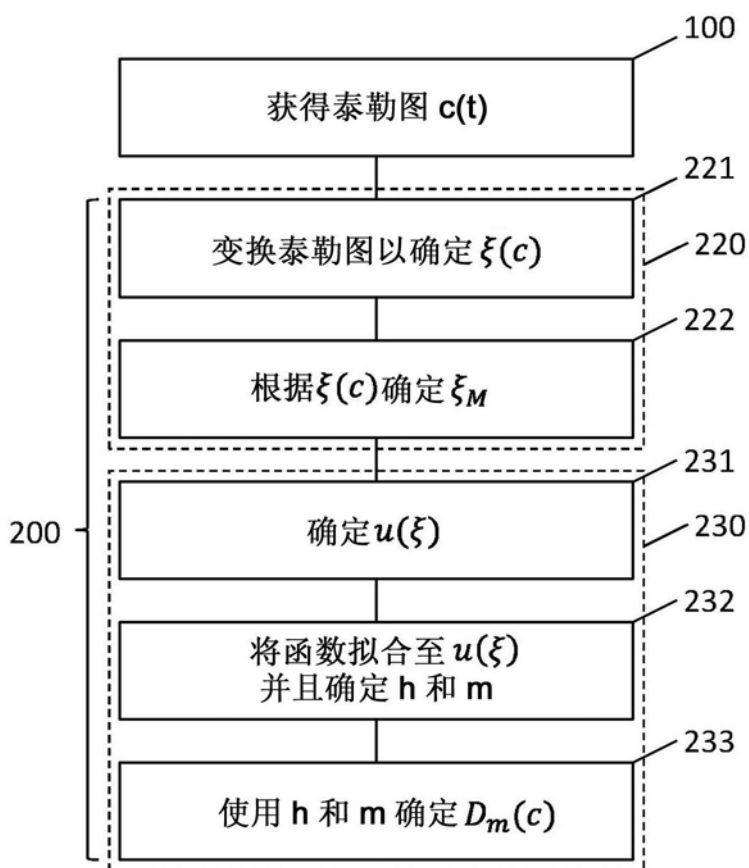


图4

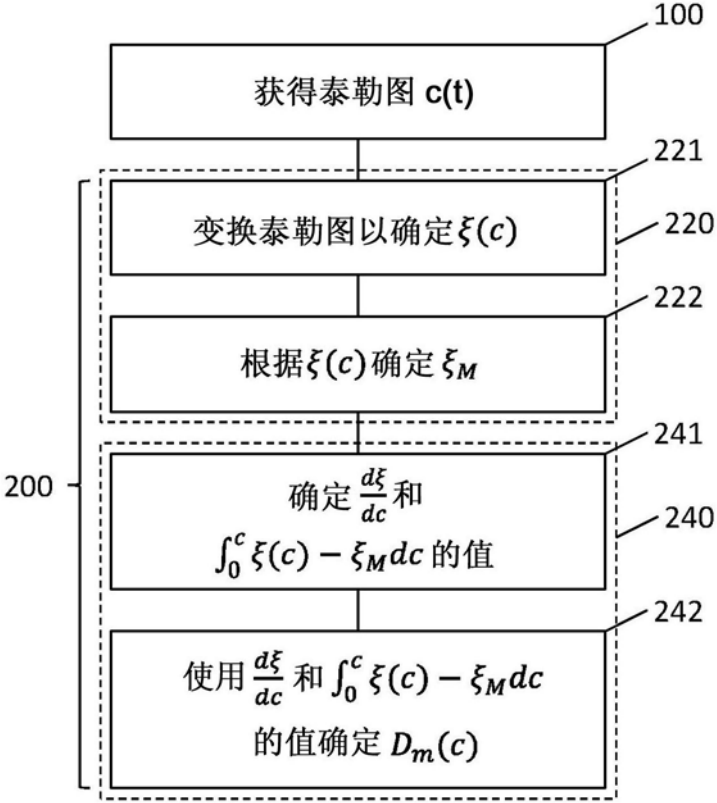


图5

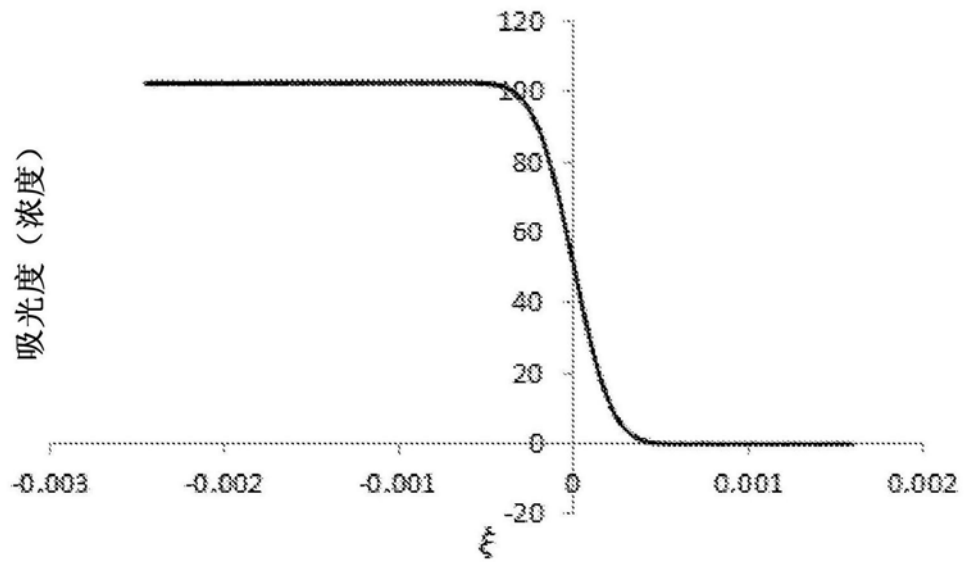


图6

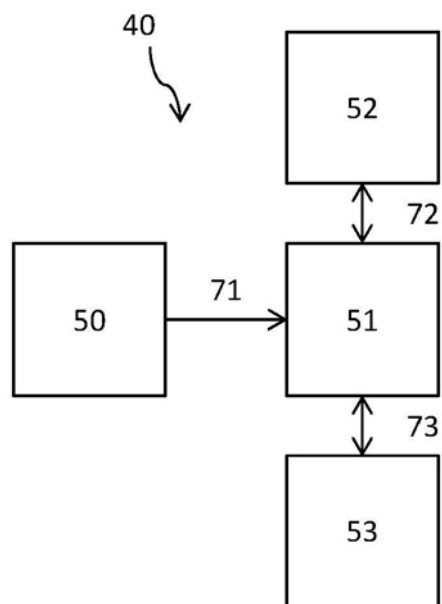


图7

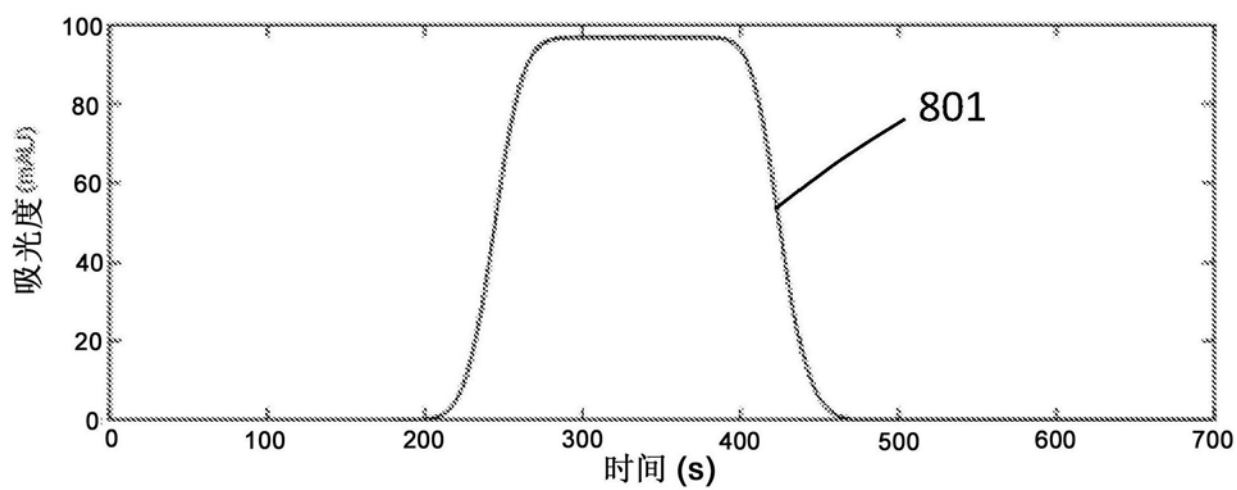


图8

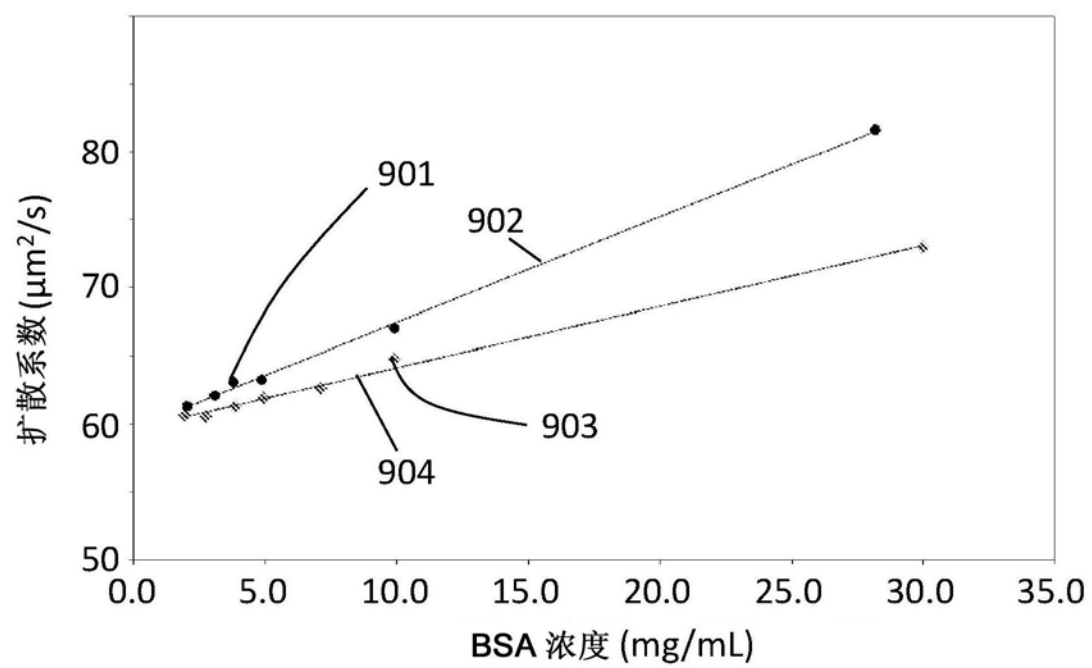


图9