

您的 BSA 的清洁度如何？

内毒素水平对性能的影响

Christopher Detzel, PhD 和 Christopher D. Warner, PhD



牛血清白蛋白 (BSA) 是许多生物技术和生物化学系统的关键组分。BSA 广泛用于各种应用，包括诊断、兽用医药产品、疫苗制造、生物制药生产用的哺乳动物细胞培养、局部和离体医疗器械应用。BSA 对这些系统性能的影响常常被忽视，只有在经过大量测试并排除其他系统组分的影响后，才被认为可能是导致变异性的根本原因。

BSA 在生物制药应用领域有许多不同的作用。用于动物和人类健康产业的诊断检测使用 BSA 作为蛋白质载体来稳定低丰度高价值蛋白质（例如单克隆抗体）。鉴于纯蛋白质组分具有可再现性特性，BSA 被用作分析标准品，并被用作阻断剂来防止与分析物的功能组分发生非特异性相互作用。BSA 还被用作惰性表面涂层来防止诊断设备上发生非特异性相互作用，并广泛用于酶联免疫吸附测定 (ELISA) (1, 2)。例如，固体纳米颗粒表面涂覆 BSA 可防止发生调理作用和肾脏系统清除作用，从而延长固体纳米颗粒的循环半衰期 (3, 4)。最后，BSA 还是用于生物制药化合物生产的确定成分培养基配方中的关键组分。BSA 通过结合和运输关键营养素、生长因子、激素以及结合有毒化合物（例如过量的铁）来支持哺乳动物和细菌生物的生长 (5)。BSA 在这些应用中发挥着作用，稳定的 BSA 产品可确保诊断分析性能和细胞培养具有可再现性。

内毒素、蛋白酶、免疫球蛋白和其他血浆蛋白会污染 BSA 并影响其在下流生物技术应用中的稳定性能。免疫球蛋白和蛋白酶污染会导致诊断性能和灵敏度发生变化，内毒素污染会影响哺乳动物细胞培养、蛋白质生产和基于细胞的体外分析性能。

目标

本白皮书的目的是提供来自多家制造商的 BSA 内毒素污染差异性对比数据，以突出制造一致性和污染物水平的差异。内毒素 (脂多糖, LPS) 是大多数革兰氏阴性细菌的外细胞膜的主要组分。细菌在正常细胞生命周期中会释放不同数量的 LPS。在正常增殖过程中，细菌会在细胞分裂时释放少量 LPS。然而，细菌在死亡或受损后分解可能会向周

表1: 标准级-BSA, 第五组分, pH 7.0

	内毒素污染 (EU/mg)	检测样品数量
PHB 标准级 7.0	0.01 ± 0.02	3
制造商 A	12.7 ± 10.6	4
制造商 B	25.9	1
制造商 C	25.8 ± 26.6	6
制造商 D	0.71	1

表2: 试剂级-BSA, 第五组分, 无脂肪酸

	内毒素污染 (EU/mg)	检测样品数量
PHB 试剂级	0.008 ± 0.002	3
制造商 A	1.0 ± 1.2	3
制造商 B	0.2	1
制造商 C	1.6 ± 1.9	3
制造商 D	0.27	1

围环境释放大量 LPS。最终产品的内毒素污染是医疗器械和注射药物制造商最关心的问题，因为内毒素污染会诱发发热原反应，包括发烧、寒颤和感染性休克 (6)。在考虑 BSA 的任何生物技术应用时，重要的是要在工艺过程中限制内毒素的引入，而不是依赖在最终生产步骤中去除内毒素。

表3：不同 BSA 制造商的质量体系和特征概述

	PHB	制造商 A	制造商 B	制造商 C	制造商 D
制造商	•	•	•	•	•
专用制造设施	•				
闭环制造	•				
可追溯性认证	•			•	
食用级产品	•				
在美国和新西兰制造	•				

内毒素定量方法

来自不同制造商的 BSA 样品被送往 Associates of Cape Cod Inc. 采用动态浊度法进行内毒素检测。进行鲎试剂 (LAL) 试验，即制备不同稀释度的样品，在稀释后的样品中添加 Pyrotell-T LAL 试剂并进行混合。然后在 37°C 条件下培养混合物。内毒素浓度越高的样品会越快浑浊。通过与标准曲线进行比较来量化样品中的内毒素。这项研究中分析物的检测限为 0.001 EU/mg。

表 1 和表 2 分别显示了主要制造商的标准级 BSA 和试剂级 BSA (无脂肪酸 BSA) 的内毒素污染定量检测结果。在分析多个样品时，结果列示为平均值加或减一个标准偏差。BSA 制造商用字母 A-D 表示。同一个制造商在两个表中的标注字母一致。

结果与讨论

内毒素污染可能会严重影响 BSA 在生物制药应用 (尤其是基于细胞的应用) 中的有效性和一致性。分析结果显示，BSA 产品中存在不同程度的内毒素污染，污染程度因制造商和 BSA 等级 (标准级和试剂级) 而异。

第一个值得注意的趋势是标准级和试剂级 BSA 产品之间的差异。在主要 BSA 制造商中，同一制造商的试剂级 BSA 的内毒素污染水平比标准级 BSA 低 10-100 倍。试剂级 BSA 的内毒素污染比标准级 BSA 少并不完全令人惊讶，因为无脂肪酸 BSA 的制造过程会涉及额外的加工步骤。制造试剂级 BSA 的行业标准要求将最终的 BSA 溶液暴露在活性炭中很长一段时间。活性炭可清除与 BSA 结合的脂肪酸，内源性脂肪酸的清除率可能高达 99% (7)。用于结合脂肪酸的活性炭也会结合内毒素 (8)。因此，试剂级 BSA 生产过程中使用活性炭的加工步骤也有助于去除内毒素，从而获得“更清洁”的产品，如表 1 和表 2 中的结果所示。

同样值得注意的是标准级或试剂级 BSA 制造商之间的内毒素污染差异。标准级 BSA 的内毒素水平从极低 0.010 EU/mg (Proliant Health & Biologicals) 到污染物水平高出 2,500 倍 (其他制造商) 不等。同样地，Proliant Health & Biologicals (PHB) 制造的试剂级 BSA 仅含微量的内毒素 (0.008 EU/mg)，而其他制造商的试剂级 BSA

的内毒素水平可能高出 200 倍。内毒素污染在许多不同生物制药应用中都极为有害，因此，识别潜在污染来源并制定策略减少内毒素污染尤为关键。PHB 制造工艺生产的 BSA 几乎不含内毒素，并且清洁度比其他所有制造商生产的 BSA 高出几个数量级。

结论

从支持生物制药生产中的细胞培养，到控制各种诊断检测中的非特异性蛋白质相互作用，BSA 是许多不同生物技术应用中的关键组分。然而 BSA 在生物制品中的作用经常被忽视，BSA 有可能是内毒素的主要来源。内毒素污染可能会损害基于细胞的治疗药物生产的性能，并且随着时间的推移会对分析的再现性和一致性产生负面影响。这项研究的结果表明，PHB 标准级和试剂级 BSA 的内毒素水平比其最接近的竞争对手至少低 25 倍。PHB 独特的血浆收集方法、闭环工艺和健全的质量体系使其能够确保 BSA 生产的一致性，且生产的 BSA 仅含本报告中详述的微量水平污染物。

参考文献

- 1 Jitsukawa T, et al. Increased Coating Efficiency of Antigens and Preservation of Original Antigenic Structure After Coating in ELISA. *J. Immunol. Meth.* 116(2) 1989: 251-257.
- 2 Fan DH, Yuan SW, Shen YM. Surface Modification with BSA Blocking Based On In Situ Synthesized Gold Nanoparticles in Poly(dimethylsiloxane) Microchip. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 75(2) 210:608-611.
- 3 Mariam J, Sivakami S, Dongre PM. Albumin Corona on Nanoparticles: A Strategic Approach in Drug Delivery. *Drug Deliv.* 23(8) 2016: 2668-2676.
- 4 Zhang X D, et al. In Vivo Renal Clearance, Biodistribution, Toxicity of Gold Nanoclusters. *Biomaterials* 33(18) 2012: 4628-4638.
- 5 Francis GL. Albumin and Mammalian Cell Culture: Implications for Biotechnology Applications. *Cytotechnol.* 62(1) 2010: 1-16.
- 6 Magalhaes PO, et al. Methods of Endotoxin Removal from Biological preparations: a review. *J Pharm Pharm Sci*, 2007. 10(3): 388-404.
- 7 Chen RF. Removal of Fatty Acids from Serum Albumin By Charcoal Treatment. *J. Biol. Chem.* 242(2) 1967: 173-181.
- 8 Maitra SK, et al. Properties of Binding of Escherichia coli Endotoxin to Various Matrices. *J. Clin. Microbiol.* 13(1) 1981: 49-53.