

采用二阶导数吸收光谱法比较创新药和生物仿制药单克隆抗体对的构象研究

应用简报

生物仿制药

作者

- Devansh Shah
韦洛尔科技大学，印度
- Neethu Ayyolath
甘露大学，印度奎隆
- Ursula Tems
安捷伦科技公司，澳大利亚
- Ravindra Gudihal
安捷伦科技公司（印度）
印度班加罗尔

前言

单克隆抗体 (mAb) 因其对人类健康的治疗价值而得到了大量关注¹。生物仿制药是特定疾病创新药物 mAb 的复制品，由于创新药物的专利到期，这类仿制药物迅速扩大了市场²。一些用于研究蛋白质构象稳定性³ 以及证明创新药物和生物仿制药之间相似性的方法包括紫外光谱、圆二色性光谱和荧光光谱⁴。本应用简报采用 Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计对一种创新药物（利妥昔单抗）及其生物仿制药进行了分析。随后利用专用的 WinUV 软件对数据进行了解析，并采用二阶导数吸收光谱进行了详细的比较。结果不仅突出了 Cary 60 作为此应用分析解决方案的固有功能，还证明了收集的数据如何提供蛋白质球状结构中芳香族氨基酸的微环境信息，从而证明了 mAb 在不同测试条件下的稳定性。



Agilent Technologies

紫外-可见光谱的优势

紫外-可见光谱是一种成熟可靠的技术，能够深入了解蛋白质的总体结构。它应用广泛，不需要昂贵的试剂或消耗品。重要的是，紫外-可见光谱法也是非破坏性的，因此测量的样品可以回收。在采用液相色谱或质谱等技术进一步分析之前，这一关键属性使紫外-可见光谱法成为一种理想的正交工具。

Cary 60 紫外-可见分光光度计是一种稳定且高效的分析工具。基于闪烁式氘灯的光学设计具有独特功能，可避免样品发生光降解；而且省去了仪器预热时间，有助于提高分析效率。这些特性确保 Cary 60 紫外-可见分光光度计常规应用于各种领域，并能获得准确、精密、可重复的数据。

材料与方法

L-苯丙氨酸、L-色氨酸和 L-酪氨酸来自安捷伦科技公司。利妥昔单抗创新药物和生物仿制药购自当地一家药店。其他所有化学品购自 Sigma-Aldrich。

样品前处理

使用 Tris HCl 缓冲液 (pH 6.0) 配制抗体，浓度为 500 mg/mL。盐酸胍 (GdnHCl) 用于诱导 mAb 变性，其浓度范围为 0-6 M。将适量蛋白储备液 (10 mg/mL) 和含 0-6 M GdnHCl 的 Tris HCl 缓冲液 (pH 6.0) 混合制得样品。L-苯丙氨酸、L-色氨酸和 L-酪氨酸用水配制。

吸光度测量和数据分析

Cary 60 紫外-可见分光光度计可获得高分辨吸收光谱。所有样品在室温下进行分析，石英比色皿规格为 3 mL，光程为 1 cm。在 240-350 nm 的波长范围内，每隔 0.5 nm 采集光谱。

在 Cary WinUV 软件应用中，采用五点数据过滤的 Savitzky Golay 算法计算得到二阶导数光谱。在每个原始数据点之间采用 99 个插入点，所得的导数光谱中应用一种样条函数，将分辨率提高至 0.01 nm，以监测 GdnHCl 诱导的抗体伸展。

结果与讨论

二阶导数吸收光谱有助于分析色氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸残基（分别为 W、Y 和 F）的微环境，这三种残基是反映蛋白质结构的一项指标^{5,6}。当蛋白质从有序变为无序状态时，二阶导数光谱解决芳香族氨基酸谱带的能力可以监测吸光度的特定偏移。图 1 显示了除单克隆抗体之外的游离 L-芳香族氨基酸的扫描光谱和相应的二阶导数光谱。查看每个二阶导数吸收光谱时，这些氨基酸和蛋白质的特点可以清晰地显现出来。二阶导数光谱中 291 nm 处的负峰被选作指标，用于监测生物仿制药和创新药物 mAb 中色氨酸残基微环境的改变。

使用 Cary 60 收集二阶导数吸收光谱后，在化学变性剂 GdnHCl 存在的条件下，通过比较每种药物对变性作用的敏感程度来比较利妥昔单抗生物仿制药和创新药物的结构稳定性。图 2 显示了 0 和 5 M GdnHCl 时创新药物和生物仿制药的二阶导数吸收光谱。当 mAb 样品溶于 GdnHCl 时，检测光谱显示，291 nm 附近的负吸收峰发生了位移（如图 2 中箭头所示）。这表明 mAb 中色氨酸残基的微环境发生了改变。

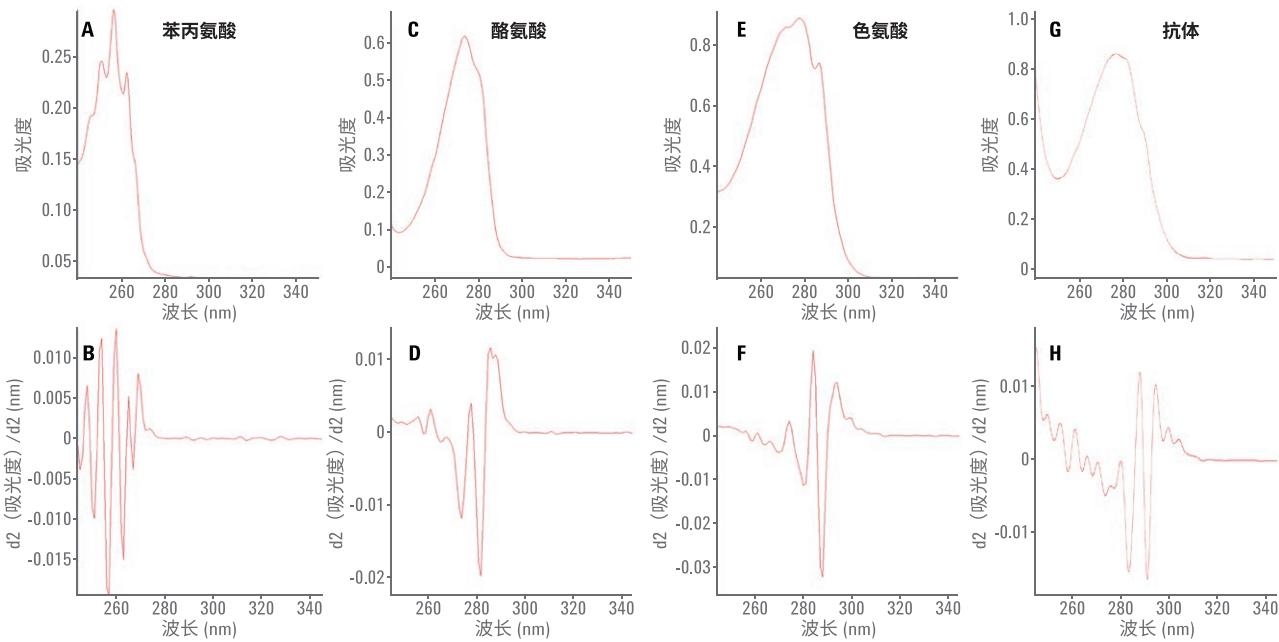


图1. 苯丙氨酸 (A、B)、酪氨酸 (C、D)、色氨酸 (E、F) 和抗体 (G、H) 的吸收光谱和二阶导数光谱

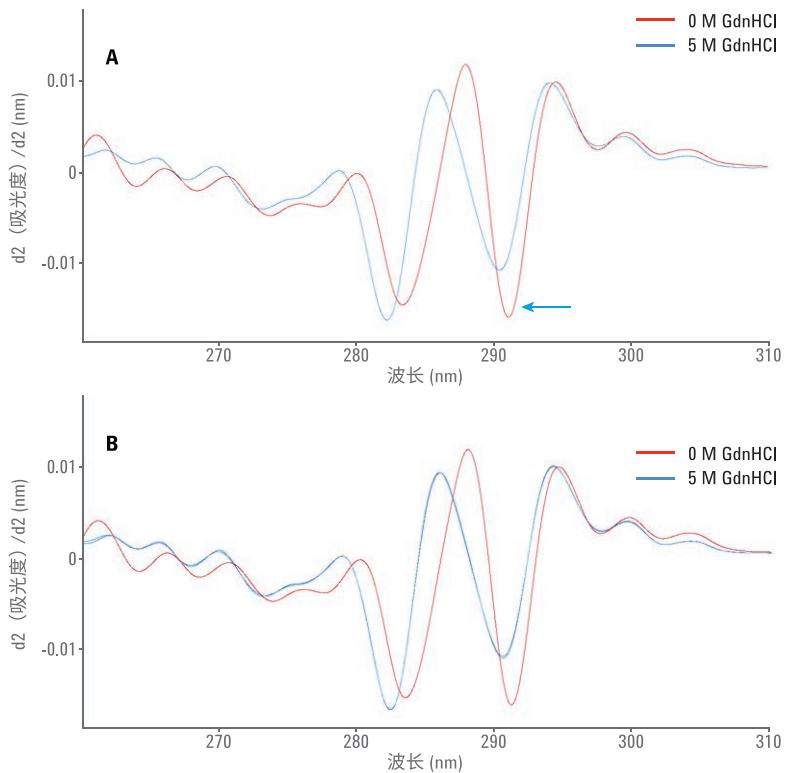


图2. 存在 0 M GdnHCl (红色曲线) 和 5 M GdnHCl (蓝色曲线) 时, 创新药物 (A) 和生物仿制药 (B) 的二阶导数光谱

通过增加 GdnHCl 的浓度对创新药物和生物仿制药的变性作用进行了比较。图 3 显示了溶解 mAb 的 GdnHCl 浓度增加时发生的波长位移。创新药物和生物仿制药在相近的 GdnHCl 浓度下都发生了变性，这表明蛋白质结构中色氨酸残基的微环境是相似的。采用 Cary 60 紫外-可见分光光度计得到的这一结果证实了早期采用反相高效液相色谱法 (RP-HPLC)、尺寸排阻色谱法 (SEC) 和肽谱分析得到的研究结果，即采用安捷伦 HPLC 解决方案时这对 mAb 的初级和高级结构均相似⁷。

通过采用导数光谱法生成 a/b 来分析蛋白质序列中酪氨酸残基的微环境，这样比较蛋白质的结构也是可行的^{8,9}，其中， a 代表酪氨酸产生的负峰吸光度的最大值 ($\sim\lambda_{288}$) 和最小值 ($\sim\lambda_{283}$) 之间的距离， b 代表色氨酸吸收产生的第二大值 ($\sim\lambda_{294}$) 和最小值 ($\sim\lambda_{291}$) 之间的距离（图 4 插图）。图 4 显示了在 GdnHCl 浓度增加的条件下， a/b 随蛋白质结构的改变而改变。低浓度时， a/b 约为 1.05，这与蛋白质球状结构一致⁹。高浓度时， a/b 增加，这表明暴露的酪氨酸残基越来越多。创新药物和生物仿制药具有相似的光谱轮廓，这表明两种 mAb 中酪氨酸的微环境相似。

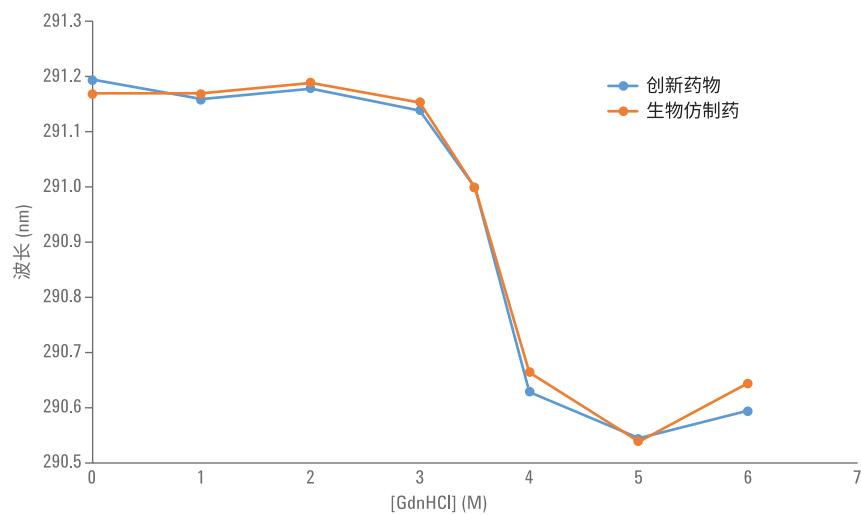


图 3. 创新药物和生物仿制药在 GdnHCl 中的变性曲线

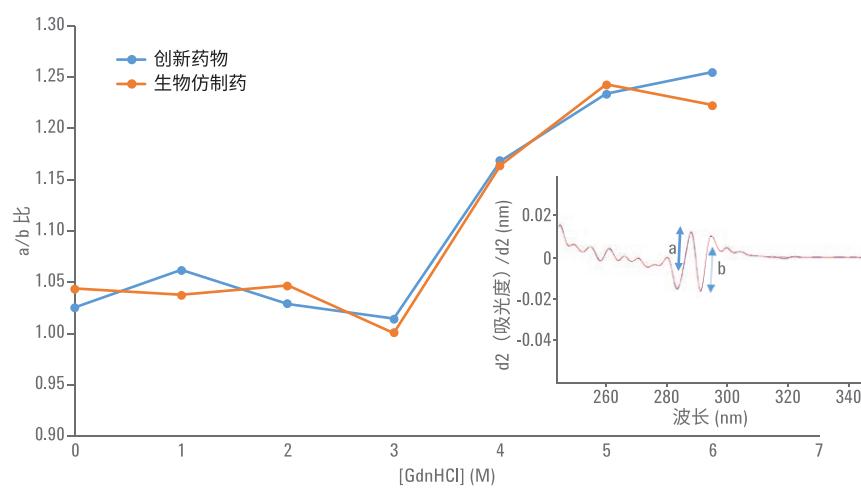


图 4. 在 GdnHCl 不同浓度下，创新药物和生物仿制药的 a/b 。插图显示了 a 和 b 的定义

紫外-可见分光光度法能够获得精密、详细和准确的信息，凸显了这项技术的潜力。另外，作为一种可以减轻其他重要分析仪器工作负荷的替代分析技术，紫外-可见分光光度计这种经济实惠、简单易用的仪器在实验室中的应用潜力不可低估。

结论

- 对于创新药物和生物仿制药 mAb 对蛋白质结构的比较，Agilent Cary 60 紫外-可见分光光度计提供了必要的分辨率和准确度
- 所研究的 mAb 创新药物和生物仿制药对化学变性剂 (GdnHCl) 表现出相似的伸展类型。这一结果表明，这对 mAb 的蛋白质总体结构相似
- 这项研究还表明，二阶导数吸收光谱可用于比较创新药物和生物仿制药 mAb 的结构研究

参考文献

1. *Nature Reviews Cancer* **2012**, *12*, 278-287
2. *Nature Reviews Drug Discovery* **2016**, *15*, 13-14
3. Pace, C. N.; Scholtz, J. M. Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach*; Creighton, T. E., Ed.; Oxford University Press: New York, 1997; pp 299-321
4. *mAbs* **2011**, *3:6*, 568-576
5. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2600-6
6. *Anal.Biochem.* **1994**, *222*, 323-31
7. 安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-4920EN
8. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1871-1875
9. *Anal. Biochem.* **1982**, *126*, 251-257
10. *J. Pharma. Sci.* **2005**, *94*, 2703-2715

查找当地的安捷伦客户中心：
www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：
800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：
LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：
www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2016
2016 年 7 月 1 日, 中国出版
5991-7026CHCN



Agilent Technologies