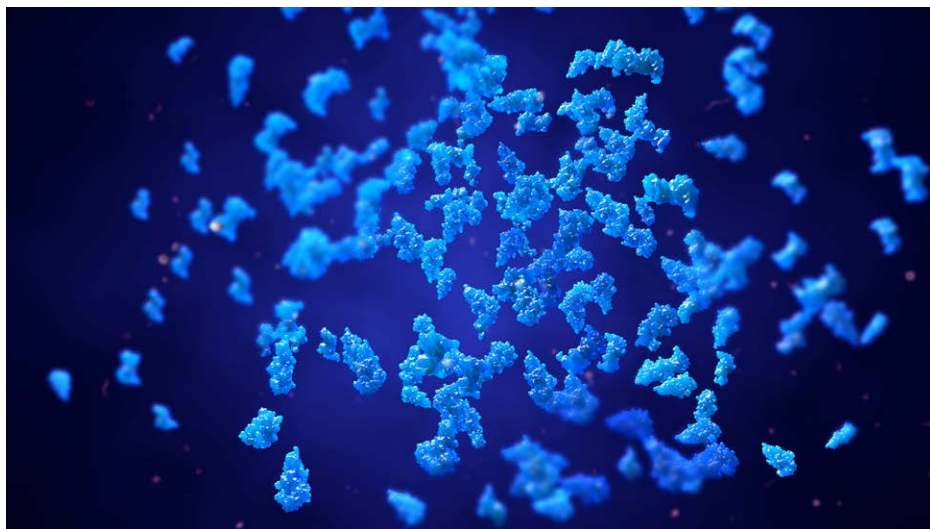


使用 FTIR 对治疗性蛋白创新药和生物仿制药进行聚集体分析

使用 Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪测量浓缩样品中的利妥昔单抗聚集体

作者

Aveline Neo 和 Ravindra Gudihal
安捷伦科技有限公司



摘要

单克隆抗体 (mAb) 等基于生物的治疗药物在制造或储存过程中可能发生蛋白质聚集, 影响其有效性、效价和安全性。因此, 在整个 mAb 制造过程中监测蛋白质聚集非常重要。傅立叶变换红外 (FTIR) 光谱是一种无损分析技术, 可以快速监测单克隆抗体聚集, 甚至可以监测对其他技术而言颇有难度的高浓度样品。在本应用简报中, 使用 Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪测量热诱导的蛋白质聚集。该研究提供了关于制剂缓冲液中高浓度单克隆抗体样品稳定性的相关信息, 还展示了 Cary 630 FTIR 在创新药或生物仿制药产品质量控制和制造工艺优化方面的应用。

前言

聚集是单克隆抗体开发和制造中的一个主要问题，因为聚集体可能导致危及生命的免疫反应。当暴露于低 pH、高温和高浓度等压力条件下时，单克隆抗体会发生聚集。由于治疗性单克隆抗体通常给药浓度较高，因此监测单克隆抗体聚集体这一关键质量控制属性非常重要^[1]。

生物仿制药是创新药（原研）治疗产品的复制品，其质量、安全性和有效性指标与参比产品几乎相同。生物仿制药要得到监管机构的批准，需要实现创新药和生物仿制药产品的理化性质相似性^[2]。

体积排阻色谱 (SEC) 是研究蛋白质聚集体的金标准技术。然而，SEC 可能不适合监测高浓度的 mAb 样品，因为在分析过程中进行稀释可能会改变样品中聚集体的组成。相比之下，FTIR 是制药实验室或生产操作中广泛应用的成熟技术，适用于高浓度蛋白质样品的聚集分析。

本研究使用 Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪监测利妥昔单抗（一种单克隆抗体药物）中的蛋白质聚集。利妥昔单抗创新药和生物仿制药作为模型系统，受到热诱导，使用 FTIR 通过酰胺条带位移监测聚集。



图 1. 台式 Agilent Cary 630 FTIR 红外光谱仪功能全面、新颖直观，为固体、液体和气体分析提供了定量和定性信息

由于 Cary 630 FTIR 稳健性、灵活性、高性能、易用性和超紧凑的设计（图 1），许多制药实验室使用 Cary 630 FTIR 进行 FTIR 分析。典型应用包括成品药、来料和包装材料的鉴定，以及定量测量，例如药物成分的浓度。Cary 630 FTIR 可以根据不同的应用使用优化的样品模块快速重新配置，无需用户校准。

为进一步简化使用，Agilent MicroLab 软件提供逐步的图示引导，直观地引导用户完成整个分析工作流程（图 2）。安捷伦还提供一款先进的 FTIR 光谱软件 MicroLab Expert。与标准软件相比，MicroLab Expert 可实现更高的分析灵活性以及光谱图像处理。分析人员使用 MicroLab Expert 可在数据采集期间查看光谱信息，这对于聚集研究非常有用。



图 2. 用于 Agilent Cary 630 FTIR 的直观 Agilent MicroLab 软件可指导用户完成分析工作流程，减少培训需求，并尽量降低操作员出错的风险

实验部分

仪器

Cary 630 FTIR 光谱仪配备单次反射钻石晶体衰减全反射 (ATR) 模块。通过 MicroLab Expert 软件使用表 1 中的参数进行数据采集。

表 1. Agilent Cary 630 FTIR 的实验参数

参数	值
光谱范围	4000–650 cm^{-1}
背景扫描次数	140
样品扫描次数	140
分辨率	4 cm^{-1}
补零因子	无
切趾函数	三角
相位校正	Mertz
采样技术	ATR

材料

- 利妥昔单抗的创新药和生物仿制药购自新加坡当地的经销商。两种 mAb 样品均使用 Vivaspin 500 超滤浓缩离心管离心柱 (10 kDa MWCO; Sartorius) 进行浓缩

- 新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Merck Millipore) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统
- 制剂缓冲液包含 5.35 mg/mL 无水柠檬酸单钠盐 pH 6.5 (CAS 18996-35-5)，9 mg/mL 氯化钠 (CAS 7647-14-5) 和 0.7 mg/mL 聚山梨酯 80 (CAS 9005-56-6)。所有试剂均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis)

工作流程

使用 Cary 630 FTIR 进行利妥昔单抗创新药和生物仿制药聚集体分析的工作流程如图 3 所示。

首先，使用 Cary 60 紫外-可见分光光度计通过 UV 吸光度测量两个经离心柱浓缩的利妥昔单抗样品的浓度。使用 $1.7 \text{ mLmg}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 的消光系数计算每个样品中的蛋白质浓度。利妥昔单抗创新药和生物仿制药的估算浓度为 50 mg/mL。



图 3. 使用 Agilent Cary 630 FTIR 分析利妥昔单抗创新药和生物仿制药的聚集体分析工作流程

对于聚集体分析，用等体积的水稀释 10 μL 浓缩利妥昔单抗并在高温下孵育 15 分钟，之后使用 Cary 630 FTIR 进行测量。孵育温度分别为 20、25、35、45、55、65、75、85 和 90 $^{\circ}\text{C}$ 。

在聚集动力学实验中，用等体积的水或制剂缓冲液稀释 75 μL 浓缩利妥昔单抗。然后在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育各溶液，于 0.5、1、2、3 和 4 小时后采集各溶液的 10 μL 样品进行 FTIR 测量。

每种实验条件下获得的样品均使用 Cary 630 FTIR 测量三次。

数据分析

使用 Agilent MicroLab Expert (版本 1.1.0.1) 进行数据分析。使用平均光谱 (三次测量) 处理数据。使用 Mathematics (运算) 选项卡下 Spectrum Arithmetic (光谱运算) 的 Subtract Spectra (扣除光谱) 函数，从平均光谱中扣除空白光谱 (例如，水或制剂缓冲液)。使用 2D View (2D 视图) 选项卡的 Merge View (合并视图) 合并扣除空白后的光谱。使用 Mathematics (运算) 选项卡的平滑窗口 9 和 3 阶多项式的 Normalization (归一化)、按峰面积归一化光谱以及 Smoothing (平滑)，进行进一步的处理和数据分析。对于二阶导数光谱，应用了 Mathematics (运算) 选项卡下具有平滑窗口 9 的 Savitzky Golay 二阶导数。

对于聚集体分析，该图遵循一级反应动力学，如以下方程所示：

$$\text{速率} = -d[A]/dt = k[A]$$

$$d[A]/[A] = -kdt$$

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt$$

重新排列以求解 [A]，得到速率定律的一种形式：

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt$$

$$\ln[A] = -kt + \ln[A]_0$$

其中

[A] 表示时间 t 处的浓度

[A]₀ 表示时间 0 处的浓度

k 表示一级速率常数

因此，ln[A] 曲线相对于时间的斜率即为 -k 的值。

一级动力学的半衰期计算如下：

$$t_{1/2} = 0.693/k$$

结果与讨论

温度诱导聚集

采用 FTIR 光谱法检查了单克隆抗体创新药和生物仿制药二级结构的温度依赖性变化。蛋白质表征通常采用的酰胺光谱条带是酰胺 I 和酰胺 II^[3]，如图 4 所示。图 4A 为利妥昔单抗创新药在 25 $^{\circ}\text{C}$ 和 75 $^{\circ}\text{C}$ 下

的 FTIR 光谱。在 25 $^{\circ}\text{C}$ 时，酰胺 I 条带位于 1638 cm^{-1} 处，原因在于分子内 β 折叠的二级结构。通过 X 射线分析可以明显看出，这些单克隆抗体是富含 β 折叠的蛋白质^[4]。在 75 $^{\circ}\text{C}$ 时，酰胺 I 条带移动到 1616 cm^{-1} 处，原因是聚集过程中形成分子间 β 折叠二级结构^[5,6]。利妥昔单抗创新药在 25 和 75 $^{\circ}\text{C}$ 下的二阶导数红外光谱 (图 4B) 更清晰地显示了在利妥昔单抗聚集过程中，酰胺 I 条带从 1638 到 1616 cm^{-1} 的变化。

图 5 显示了随着温度升高，创新药和生物仿制药在 1616 和 1638 cm^{-1} 处的吸光度比变化。通过找到 1616 cm^{-1} 处吸光度大于 1638 cm^{-1} 的交叉点，创新药和生物仿制药的热解链温度 (T_m) 可分别估计为 70.2 和 71.8 $^{\circ}\text{C}$ 。这些温度与通过差示扫描量热法测量的利妥昔单抗 T_m 71.6 $^{\circ}\text{C}$ 一致^[7]。结果表明 Cary 630 FTIR 适用于观察 mAb 的热变性。

制剂缓冲液对聚集动力学的影响

由于热变性研究无法明确缓冲液对热稳定性的影响，因此进行了详细的动力学研究。为研究制剂缓冲液对聚集动力学的影响，实验期间保持 60 $^{\circ}\text{C}$ (低于 T_m) 的恒定温度。图 6 显示了包含或不包含制剂缓冲液的单克隆抗体创新药和生物仿制药溶液在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下，波长 1638 cm^{-1} 处吸光

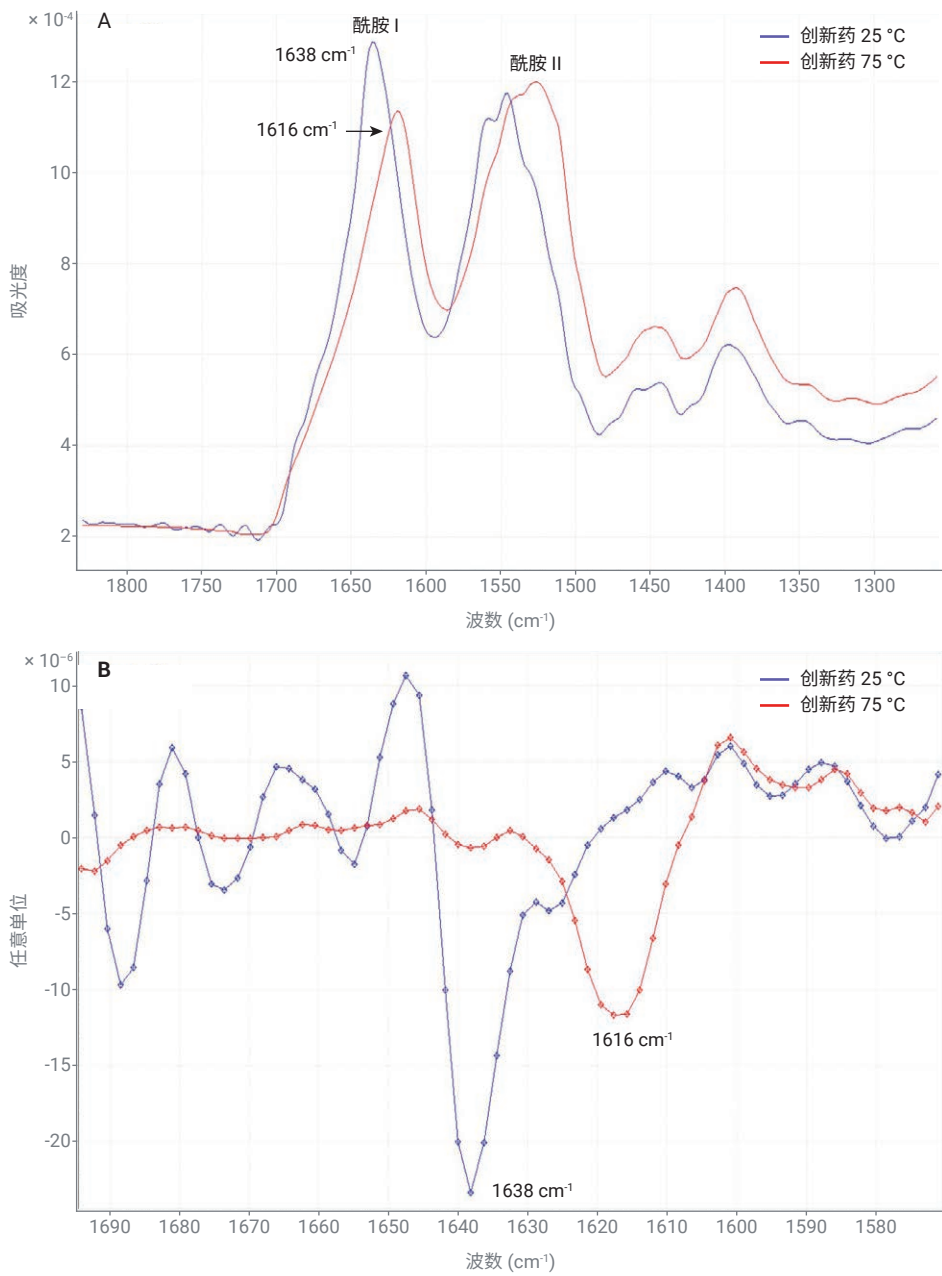


图 4. (A) 利妥昔单抗创新药在 25 和 75 °C 下的 FTIR 光谱。(B) 利妥昔单抗创新药在 25 和 75 °C 下的二阶导数红外光谱

度的自然对数与时间的曲线。假设聚集过程为一级动力学^[8]。根据曲线斜率，估算一级常量 k_1 和 $t_{1/2}$ 。表 2 列出了创新药和生物仿制药的动力学参数。与没有制剂缓冲液相比，两种蛋白质在使用制剂缓冲液

时速率常数更低， $t_{1/2}$ 更高，表示稳定性提高。这一发现表明，制剂缓冲液实现了针对热诱导的保护。创新药和生物仿制药单克隆抗体的 k_1 在非制剂条件下相似。在包含制剂缓冲液的情况下，生物仿制药

比创新药更稳定 (k_1 更低， $t_{1/2}$ 更高)。制剂和赋形剂会极大地影响抗体的稳定性。维持 pH 值的赋形剂（例如，Tris、乙酸盐、组氨酸和柠檬酸盐缓冲液）可以增强稳定性^[9]。

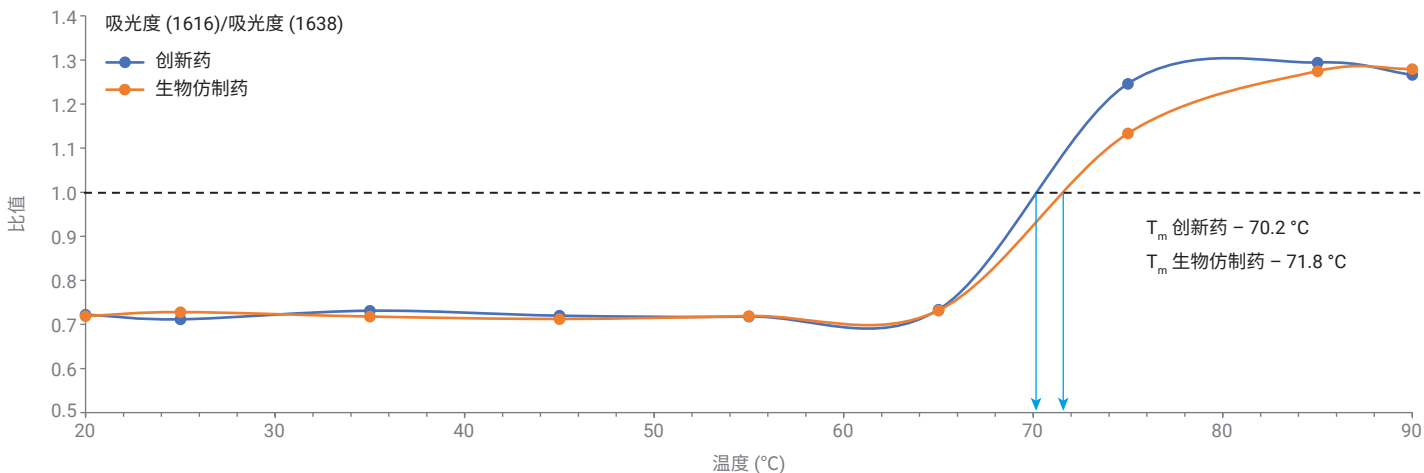


图 5. 随着温度的升高，利妥昔单抗创新药和生物仿制药波长 1616 cm^{-1} 和 1638 cm^{-1} 处的吸光度比变化

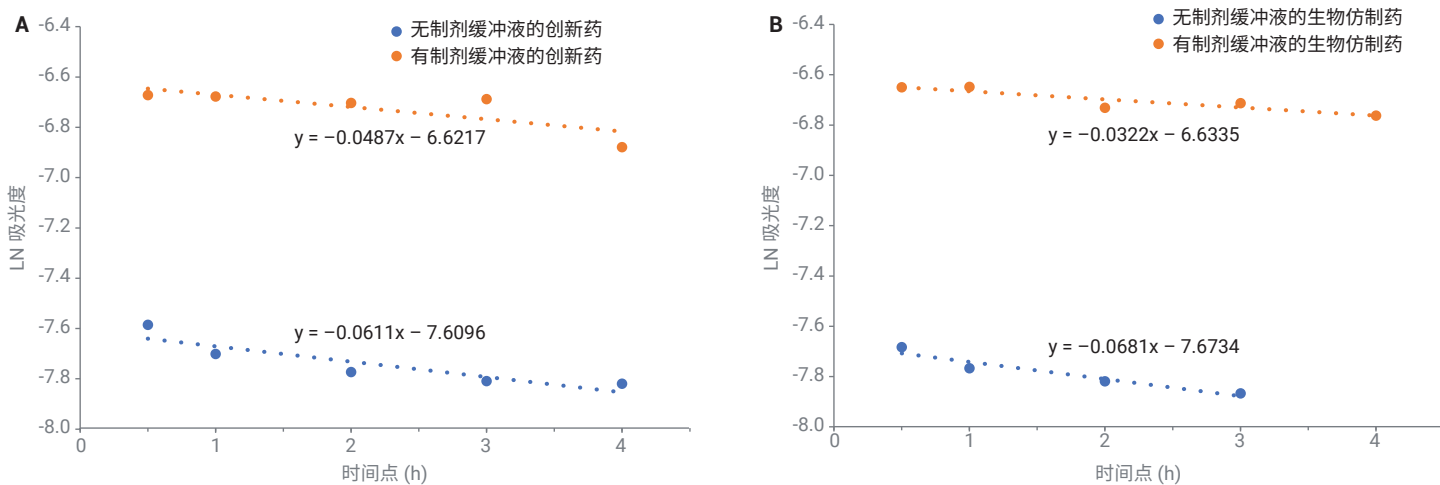


图 6. $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下对于含或不含制剂缓冲液的创新药 (A) 和生物仿制药 (B) 溶液，吸光度 (1638 cm^{-1}) 的自然对数与时间的曲线。由于 4 小时时无制剂缓冲液的生物仿制药测量值差异较大，因此分析中未包含该数据点

表 2. 含和不含制剂缓冲液的创新药和生物仿制药的聚集动力学

	无制剂缓冲液		有制剂缓冲液	
	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
创新药	0.0611	11.34	0.0487	14.34
生物仿制药	0.0681	10.17	0.0322	21.52

结论

Agilent Cary 630 FTIR 光谱仪是一款简单易用的仪器，可用于分析生物治疗药物的蛋白质聚集，且无需执行大量的样品前处理程序。使用该方法可快速测量高浓度样品中的聚集体，在 mAb 的整个制造过程中均可使用该方法。FTIR 确定的利妥昔单抗热变性温度与文献中报道的温度一致，证实了该方法的有效性。

还使用带有 Agilent MicroLab Expert 软件的 Cary 630 FTIR 研究了制剂缓冲液对 mAb 聚集动力学的稳定作用。虽然还需要进一步的研究来了解蛋白质聚集的机制，但这项初步研究表明，Cary 630 FTIR 可以提供蛋白质折叠方式的正交信息。

Cary 630 FTIR 易于使用，无需样品前处理，可广泛应用于生物制药行业，包括用于蛋白质类治疗药物的创新药和生物仿制药聚集体的质量控制。

参考文献

1. Carpenter, J. F. *et al.* Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. *J. Pharm. Sci.* **2009**, 98(4), 201–5
2. Biologics vs Biosimilars: Understanding the Differences. Available from: https://www.pfizer.com/news/articles/biologics_vs_biosimilars_understanding_the_differences
3. Tiernan, H.; Byrne, B.; Kazarian, S. G. ART-FTIR Spectroscopy And Spectroscopic Imaging for the Analysis of Biopharmaceuticals. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2020**, 241, 118636
4. Costantino, H. R. *et al.* Fourier-Transform Infrared Spectroscopic Analysis of the Secondary Structure of Recombinant Humanized Immunoglobulin G. *Pharmacy and Pharmacology Comm.* **1997**, 3(3), 121–128
5. Sathya Devi, V.; Coleman, D. R.; Truntzer, J. Thermal Unfolding Curves of High Concentration Bovine IgG Measured by FTIR Spectroscopy. *Protein J.* **2011**, 30(6), 395–403
6. Baird, G. *et al.* FTIR Spectroscopy Detects Intermolecular β -Sheet Formation Above the High Temperature T_m for Two Monoclonal Antibodies. *Protein J.* **2020**, 39(4), 318–327
7. Flores-Ortiz, L. F. *et al.* Physicochemical Properties of Rituximab. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2014**, 37(10), 1438–1452
8. Byler, D. M. *et al.* Effect of Sucrose on the Thermal Denaturation of a Protein: an FTIR Spectroscopic Study of a Monoclonal Antibody. AIP Conference Proceedings, *American Institute of Physics* **1998**, 430(1), 332–335
9. Ma, H.; Ó'Fágáin, C.; O'Kennedy, R. Antibody Stability: a Key to Performance-Analysis, Influences and Improvement. *Biochimie* **2020**, 177, 213–225

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

DE95285922

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，2022
2022年5月31日，中国出版
5994-4944ZHCN