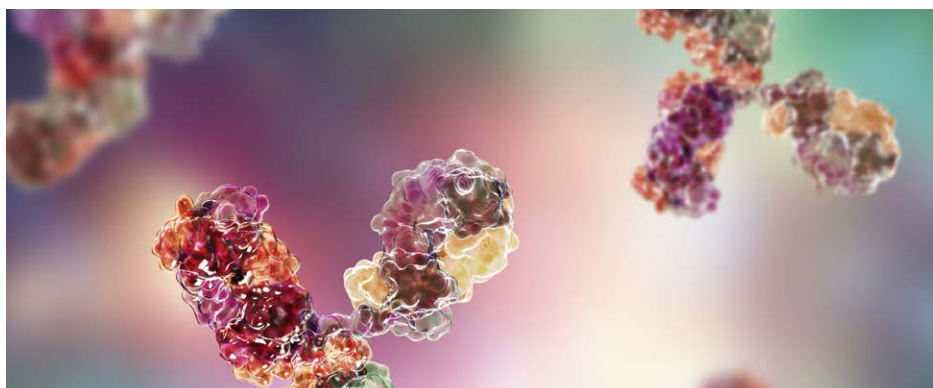


基于高通量荧光检测的 mAb 聚集体分析工作流程

使用荧光检测辅助体积排阻色谱分析可提高分析效率



作者

Brian Liou
安捷伦科技有限公司

前言

现代生物制剂的开发依赖于筛选数百到数千种单克隆抗体 (mAb) 变体，以寻找具有最佳特性（如亲和力、特异性、免疫原性和糖基化）的先导化合物。优化过程中可能出现的意外副作用之一是抗体聚集，因为其易受分子特性以及表达宿主的影响。这是研究人员密切监控的一项关键质量属性^[1]，因此，快速评估 mAb 聚集倾向是现代药物开发的核心要求之一。

本研究考察了基于荧光检测的高通量聚集体分析工作流程。该工作流程采用模块化 Agilent Cary Eclipse 多孔板读数器和市售 PEPBOPS 染料，可对高分子量聚集体进行半定量估算，每个样品只需约 5 秒，与之相比，更常规的测量技术用时长达约 5 分钟^[2]。本研究还评估了使用 PEPBOPS 染料作为荧光探针对抗体聚集的影响。

在本研究中，我们对两种治疗性 mAb（利妥昔单抗和曲妥珠单抗）和广泛使用的抗体标准品 NISTmAb RM 8671 进行强制聚集处理，然后考察了荧光检测与体积排阻色谱相结合的聚集体分析方法。

Cary Eclipse 多孔板读数器有望作为一款有用的快速预筛查工具，配合体积排阻色谱或其他具有更高分辨率的技术提高评估 mAb 聚集倾向的总体效率。通过将两种技术融入同一工作流程，可快速识别样品中超标浓度的高分子量聚集体，将分析资源集中在小范围的样品组，从而节省大量时间并提高分析效率。

实验部分

单克隆抗体 (mAb) 强制聚集

同时制备用于两项分析研究的聚集 mAb 样品。

材料与amp;方法

- 利妥昔单抗 mAb，如 Ristova[®] (Roche AG) 和 Reditux[™] (Dr. Reddy's Laboratories)
- 曲妥珠单抗 mAb (Herceptin[®]-Genentech)
- 所有缓冲盐和流动相组分均为 HPLC 级或更高级别，购自 Sigma Aldrich
- 新鲜配制 50 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 用作稀释剂和用于样品前处理，下文称为 “Tris 缓冲液”
- NISTmAb RM 8671¹
- Vivaspin 500 超滤浓缩离心管，MWCO 10 kDa (Sigma-Aldrich)
- 安捷伦 HPLC 样品瓶 (安捷伦部件号 5182-0714)

mAb 缓冲液交换

按照制造商的说明，使用 Vivaspin 500 超滤浓缩离心管将每个 20 mg 利妥昔单抗样品、20 mg 曲妥珠单抗样品和 4 mg NISTmAb RM 8671 的缓冲液交换为 Tris 缓冲液。

通过比较体积排阻色谱图 (A_{280}) 的总峰面积与配制好的已知浓度 (利妥昔单抗和 NISTmAb RM 8671 = 10 mg/mL，曲妥珠单抗 = 120 mg/mL) 的 mAb 的峰面积，计算各缓冲液交换的 mAb 的浓度。

pH 诱导聚集样品前处理

用 Tris 缓冲液将缓冲液交换的 mAb 稀释至 1 mg/mL。添加 9 μ L (pH 2.4) 或 7.8 μ L (pH 2.6) 的 1 mol/L HCl，使 600 μ L 样品瞬时酸化。5–20 分钟后，用等体积的 1 mol/L NaOH 中和样品，并在 37 °C 下过夜孵育，以形成稳定的聚集体。通过使用 1 mol/L HCl 滴定 5 mL Tris 缓冲液分别确定 pH 达到 2.4 或 2.6 所需的酸的体积。如差示扫描量热法测定结果所示，曲妥珠单抗和 NISTmAb 需要 pH 达到 2.4 才会发生聚集，而利妥昔单抗稳定性较差，pH 2.6 就足以使其发生聚集^[3-5]。“pH 诱导聚集”的样品主要含有可溶解的聚集体，在分析之前无需离心。

振摇诱导聚集样品前处理

移取 900 μ L 已用 Tris 缓冲液稀释至 1 mg/mL 的利妥昔单抗，将安捷伦 HPLC 样品瓶填装至 50%。用台式涡旋振荡仪以 1200 RPM 的转速沿样品瓶的主轴方向往复振摇样品瓶，通过引起湍流增加气-液界面^[6]。“振摇诱导聚集”的样品含不溶性聚集体，在分析之前以 15000 xg 离心 10 分钟使聚集体沉降。

体积排阻色谱 (SEC) 分析 — 仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，

¹ NIST8671 仅供研究使用，不得用于动物或人类摄入、临床试验或治疗用途

配备生物惰性流通池（选件 #028）

- Agilent AdvanceBio SEC 4.6 × 300 mm, 300 Å, 2.7 μm 色谱柱 (Agilent PL1180-5301)
- 安捷伦色谱数据系统, OpenLab CDS 软件 2.4 版

在配备 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统上进行 SEC 分析, 采用表 1 所示的设置。

表 1. 体积排阻色谱设置

参数	设置
柱温	室温 (23 °C)
储存室	室温 (23 °C)
流动相	50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 + 150 mmol/L NaCl (pH 7.4)
流速 (mL/min)	0.8
进样量 (μL)	20
检测	220 nm 和 280 nm 下的 UV 吸光度
参比波长 (nm)	360
采集时间 (min)	25
后运行时间 (min)	10

采用表 2 中的设置在 OpenLab CDS 2.4 中对体积排阻色谱图进行积分, 必要时进行手动积分。

表 2. Openlab CDS 2.4 积分设置

参数	设置
积分仪类型	ChemStation 积分仪
斜率灵敏度	1.0
峰宽	1.0
最小峰面积	1.0
最低峰高	0.5
肩峰模式	垂直切割
最小峰面积 %	0.00
积分开始时间 (min)	5.0
积分停止时间 (min)	12.0
切线撇去模式	标准
拖尾峰撇去高度比	0.00
前伸峰撇去高度比	0.00
撇去峰/谷比	20.00
基线校正模式	高级
峰谷比	500.00

基于荧光检测的聚集体分析 — 仪器、材料和方法

- Agilent Cary Eclipse 多孔板读数器 (G9801AA)
- 白色 96 孔板 (安捷伦部件号 6610022300)
- 荧光染料 3,3'-[[[1,2-二苯乙烯-1,2-二基]双(4,1-亚苯基)]双(氧基)]双丙烷-1-磺酸钠 (PEPBOPS) (安捷伦部件号 5799-0025)
- 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5)
- 人血清白蛋白 20 mg/mL 标准溶液 (安捷伦部件号 5185-5989)
- Bis-ANS (Sigma Aldrich D41620)
- SYPRO Orange 蛋白凝胶染色剂 (Sigma Aldrich S5692), 以 5000x 浓度提供

将 1.3 mg PEPBOPS 粉末复溶于 2 mL Tris 缓冲液中, 得到 1 mmol/L 储备液, 将其在室温下避光保存至少 2 周。用 Tris 缓冲液稀释标准溶液, 制得 75 μg/mL 人血清白蛋白阳性对照。

分析时, 用 Tris 缓冲液稀释 1 mmol/L PEPBOPS 储备液, 得到 100 μmol/L 工作溶液。在比较实验中, 对聚集体敏感的 Bis-ANS 和 SYPRO Orange 染料分别使用 Tris 缓冲液制成 100 μmol/L 储备液和 10x 工作溶液。选择 Bis-ANS 和 SYPRO Orange, 是因为先前已有文献报道过使用这两种染料和微孔板的高通量聚集体分析工作流程^[7,8]。

将 100 μL 工作溶液加入白色 96 孔板的每个孔中, 然后加入 100 μL 聚集的 mAb 样品。每个孔的最终体积为 200 μL, 最终染料浓度为 50 μmol/L (PEPBOPS 和 Bis-ANS) 和 5x (SYPRO Orange)。

为避免光致漂白, 样品在室温下避光孵育 15 min, 然后在 Cary Eclipse 多孔板读数器上进行荧光测量。采用表 3 中列出的设置采集数据。分析工作流程如图 1 所示。

表 3. Cary Eclipse 多孔板读数器设置

	PEPBOPS	Bis-ANS	SYPRO Orange
应用	高级读数		
激发波长 (nm)	350	390	495
发射波长 (nm)	475	500	580
狭缝宽度 (nm)	5		
平均时间 (s)	0.5		
激发滤光片	自动		
发射滤光片	打开		
PMT 电压 (V)	800		
附件	孔板读数器		
板规格	96 孔		

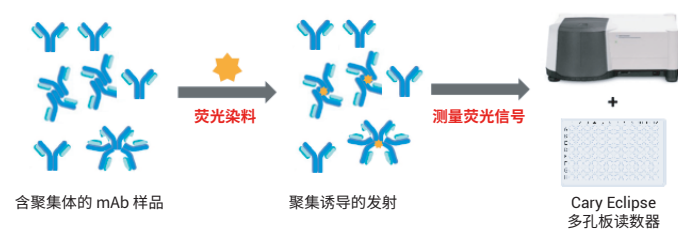


图 1. 基于荧光检测的 mAb 聚集分析工作流程。PEPBOPS 荧光染料与抗体聚集体上暴露的疏水性片段结合，在入射光的激发下发生聚集诱导的发射。由配备多孔板读数器附件的 Cary Eclipse 分析荧光信号

数据分析

计算技术重复样的荧光读数平均值，并用仅含 Tris 缓冲液和荧光染料但不含 mAb 的孔的平均荧光读数进行空白扣除。为获得最佳的分析间重现性，根据阳性对照对已经扣除空白的荧光信号值进行归一化。然后将归一化的荧光信号值相对于 SEC 测得的高分子量聚集体百分比作图，建立线性关系。

为评估测定的准确度，根据以下公式计算不同聚集体百分比范围（1%–3%、3%–5% 和 5%–9%）内，估算值的标准误差：

$$\text{估算值的标准误差} = \sqrt{\frac{\sum (\text{SEC 聚集 \%} - \text{基于荧光信号的聚集体估算值 \%})^2}{N}}$$

其中 N 是每个聚集体范百分比范围内的样品数。

结果与讨论

pH 诱导聚集的 mAb

SEC 分析表明，5–20 min 瞬时酸化提高了利妥昔单抗、曲妥珠单抗和 NISTmAb 中高分子量 (HMW) 聚集体的百分比，但未显著影响低分子量片段的百分比（图 4A–4C）。聚集程度取决于所施加的 pH，与利妥昔单抗相比，更稳定的曲妥珠单抗和 NISTmAb 抗体需要酸性更强的条件才可诱导聚集。

聚集还取决于施加诱导条件的持续时间（图 2D）。未经诱导的利妥昔单抗中有 $1.2 \pm 0.3\%$ 的 HMW 聚集体，诱导 5 min 后增加至 $4.0 \pm 0.5\%$ ，10 min 后达到 $5.2 \pm 0.8\%$ ，并在 20 min 后达到 $6.1 \pm 0.5\%$ 。施加的诱导条件主要产生可溶的聚集体，总峰面积没有明显变化。

通过对聚集敏感型染料（例如 PEPBOPS、Bis-ANS^[7] 和 SYPRO Orange^[8]）进行荧光测量，以快速估算 mAb 样品的聚集程度（图 3A）。尽管确切的机制有所不同，但这些染料通常会与 mAb 聚集体上的疏水性片段结合，导致荧光强度或发射波长发生变化，而这可以通过荧光计进行测量^[9]。在该分析中使用荧光分光光度计的优势在于方法开发更加灵活，可以轻松将方法转移至永久对准且能快速安装的多孔板读数器附件。

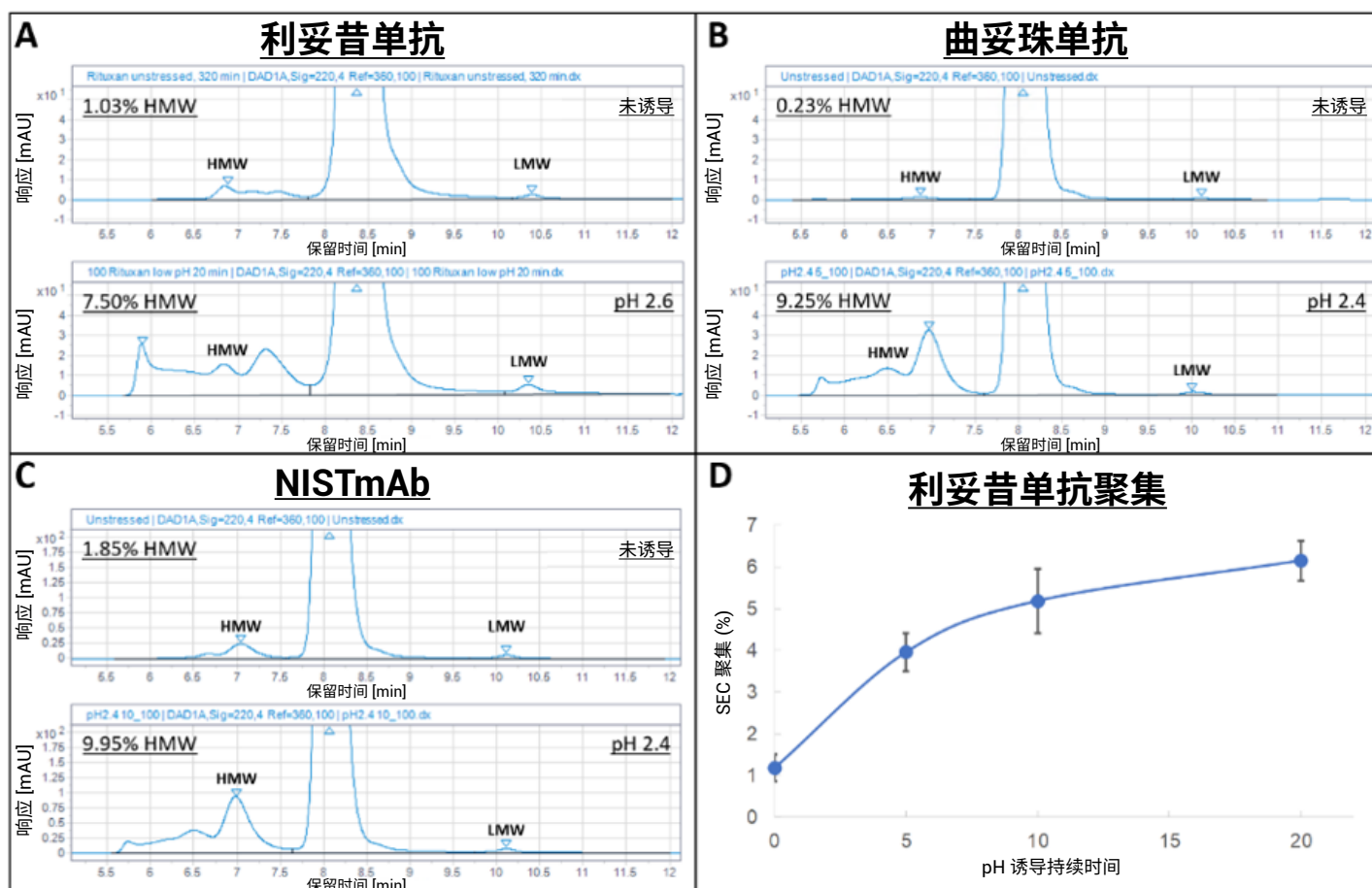


图 2. pH 诱导聚集的利妥昔单抗、曲妥珠单抗和 NISTmAb 的 SEC 分析结果。(A) - (C) 未经诱导的 mAb (上图) 与暴露在 pH 2.4 或 2.6 的瞬时诱导条件下的 mAb 的代表性 SEC-UV 迹线 (下图) 比较。(D) 以 pH 诱导条件处理利妥昔单抗 5、10 和 20 min 后的 HMW 聚集体平均百分比。误差线代表标准偏差 (N = 8)

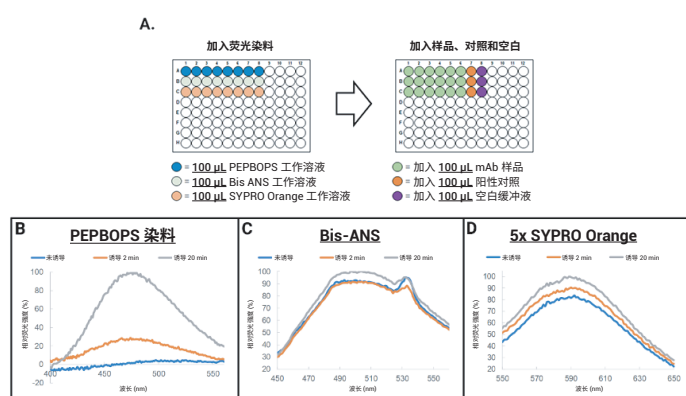


图 3. pH 诱导聚集的利妥昔单抗样品中聚集敏感型染料的荧光光谱。(A) 上样示意图, 图中显示了样品、阳性对照和空白孔。(B) PEPBOPS、(C) Bis-ANS 和 (D) SYPRO Orange 在未诱导、弱诱导 (2 min) 和强诱导 (20 min) 样品存在时的荧光光谱。根据经 20 min 诱导的样品的峰值发射强度对光谱进行归一化

荧光技术通常具有高灵敏度、高特异性和低背景的优势。但是在实际操作中, 荧光染料可能在一定程度上结合单体 mAb, 进而导致显著的背景信号。图 3B-3C 展示了未诱导、弱诱导 (2 min) 和强诱导 (20 min) 的利妥昔单抗样品中 PEPBOPS、Bis-ANS 和 SYPRO Orange 的荧光光谱。与 Bis-ANS 或 SYPRO Orange 相比, PEPBOPS 在未诱导的利妥昔单抗样品中的背景荧光明显更低, 因此这种染料对诱导后样品中的聚集体更敏感。

进一步分析表明, 475 nm 下 PEPBOPS 的荧光信号与 mAb 样品中的 HMW 聚集体百分比之间表现出很强的线性相关性。图 4A-4C 表明, PEPBOPS 的荧光信号与利妥昔单抗、曲妥珠单抗和 NISTmAb 的聚集体百分比在较宽的范围内 (约 1% 至 $\geq 16%$) 呈线性关系。图 4D 显示, 相较于单独结合可溶

聚集体之后可检测到的荧光强度，含不溶性聚集体的样品的 PEPBOPS 荧光强度更大，这表明该染料还可以结合不溶性聚集体并且被检测出来。振摇诱导的样品得到的 SEC 色谱图与 pH 诱导的样品非常类似，但由于形成了不溶性聚集体，总峰面积减小（数据未示出）。

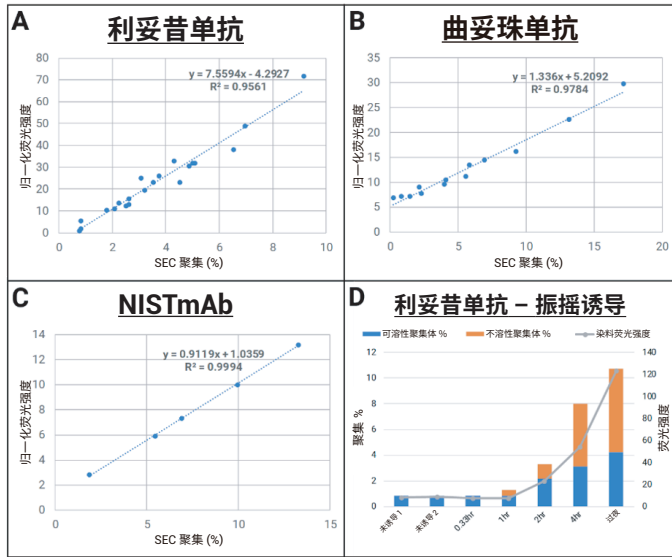


图 4. PEPBOPS 荧光信号与 mAb 样品中的 HMW 聚集体高度相关。在 (A) 利妥昔单抗、(B) 曲妥珠单抗和 (C) NISTmAb 样品中，PEPBOPS 产生线性响应， $R^2 \geq 0.95$ 。(D) 利妥昔单抗样品中的 PEPBOPS 荧光信号来自可溶性和不溶性聚集体的混合物。所示的利妥昔单抗、曲妥珠单抗和 NISTmAb 的数据分别来自 3 次、2 次和 1 次独立实验

接下来，我们评估了该工作流程用于估算生物仿制药 mAb 中的聚集体（这是药物开发中的常见任务）的适用性。在新一组 $N = 4$ 的独立实验中，利用图 5A 所示的回归曲线校准利妥昔单抗（来自 Ristova 和 Reditux）中基于荧光信号的 mAb 聚集体估算值。尽管这两种 mAb 已被证实存在翻译后修饰差异，但是该校准仍然对二者均适用^[10]。图 5A 和 5B 所示为各样品中基于荧光信号的估算值与 HMW 聚集体真实水平的关系图。两条曲线的斜率均接近 1，且截距接近 0，表明这两种 mAb 均可采用该工作流程进行准确分析。图 5C 显示，基于荧光信号的估算值的标准误差在 $\pm 0.54\%$ 至 $\pm 0.83\%$ 范围内（具体取决于样品的聚集程度），这对于半定量估算而言是可接受的^[8]。在类似的实验中，曲妥珠单抗和 NISTmAb 的标准误差分别为 $\pm 0.61\%$ 和 $\pm 0.81\%$ （数据未示出）。

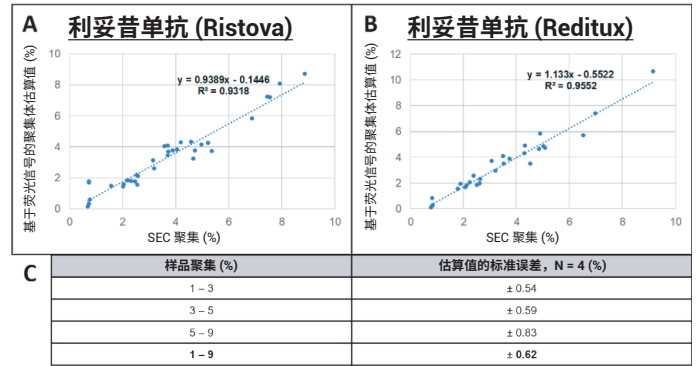


图 5. 生物仿制药 mAb 中基于荧光信号的聚集体估算值的准确度。(A) 利妥昔单抗创新药物 (Ristova) 和 (B) 利妥昔单抗生物仿制药 (Reditux) 中基于荧光信号的聚集体估算值相对 $N = 4$ 次独立实验通过 SEC 测定的聚集体真实水平绘制的关系图。(C) 在不同的聚集体百分比范围内，两种抗体中基于荧光信号得到的聚集体估算值的标准误差

荧光染料的一个常见问题是染料本身可能影响样品聚集，进而导致测量得到伪结果。图 6 显示，PEPBOPS 对各种 mAb 样品在各个聚集范围内聚集特征（图 6A）和总 HMW 聚集百分比（图 6B）的影响都极小，表明该染料不太可能干扰聚集测量。

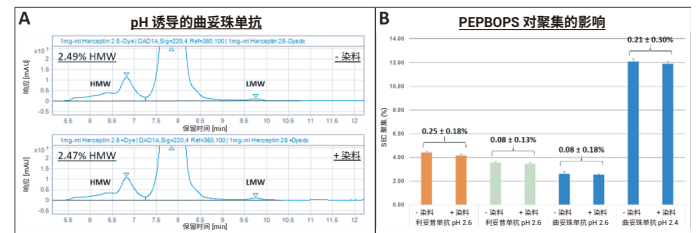


图 6. PEPBOPS 对 mAb 聚集的影响极小。(A) 不使用 PEPBOPS（上图）和使用 PEPBOPS（下图）染色的曲妥珠单抗的代表性色谱图。(B) 四个利妥昔单抗和曲妥珠单抗样品在使用和不使用 PEPBOPS 染色后，样品中 HMW 聚集体的百分比。每对柱状图上方的粗体数字表示两种处理条件下 HMW 聚集体百分比的差异

结论

本研究证明, Cary Eclipse 多孔板读数和 PEPBOPS 染料可组成估算 mAb 聚集体含量的高通量工作流程。该工作流程可对高分子量聚集体进行半定量估算, 每个样品只需约 5 秒。相比之下, 更常规的测量技术通常需要约 5 分钟之久^[2]。

本研究使用两种治疗性 mAb (利妥昔单抗和曲妥珠单抗) 和抗体标准品 NISTmAb RM 8671 对该工作流程进行测试。结果表明, 该工作流程得到的结果与使用体积排阻色谱对相同样品进行正交测量得到的结果之间具有良好的相关性。本研究还表明, PEPBOPS 染料作为荧光探针加入样品中, 并不会影响聚集。

研究证明该工作流程具有以下优势:

- 与采用 Bis-ANS 和 SYPRO Orange 的测定相比, 背景信号显著更低, 因此灵敏度更高
- 在聚集体百分比约 1% 至 $\geq 16\%$ 的范围内, 荧光信号与高分子量聚集体之间具有很强的线性相关性 ($R^2 \geq 0.95$)
- 聚集体测定准确度可达 $\pm 0.62\%$ ($N = 4$)
- PEPBOPS 对样品的聚集特征或聚集体含量无明显影响

在克隆筛选、先导化合物优化或制剂开发实验中, 该工作流程对于快速识别聚集样品非常有用。用作 SEC 的前端流程时, 该工作流程有望大幅缩短筛选时间, 在维持高样品载量的同时提高总体分析效率。配备可选多孔板读数的荧光光谱仪有助于我们灵活地开发分析方法和进行高通量筛查。

www.agilent.com/chem

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, 2020
2020 年 4 月 9 日, 中国出版
5994-1745ZHCN
DE 8755671296

参考文献

1. Eon-Duval, A., Broly, H. & Gleixner, R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach. *Biotechnol. Prog.* 28, 608–622 (2012)
2. 单克隆抗体的高分离度、高通量体积排阻色谱分析。安捷伦出版物 [5994-0828ZHCN](#)
3. Saro, D. et al. Developability assessment of a proposed NIST monoclonal antibody. in *State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study*, 329–355 (ACS Publications, 2015)
4. Lee, K. H. et al. Analytical similarity assessment of rituximab biosimilar CT-P10 to reference medicinal product. *MAbs* 10, 380–396 (2018)
5. López-Morales, C. A. et al. Physicochemical and Biological Characterization of a Biosimilar Trastuzumab. *Biomed Res Int*, (2015)
6. Eppler, A., Weigandt, M., Hanefeld, A. & Bunjes, H. Relevant shaking stress conditions for antibody preformulation development. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74, 139–147 (2010)
7. Li, Y., Mach, H. & Blue, J. T. High throughput formulation screening for global aggregation behaviors of three monoclonal antibodies. *J Pharm Sci* 100, 2120–2135 (2011)
8. He, F. et al. Detection of IgG aggregation by a high throughput method based on extrinsic fluorescence. *J Pharm Sci*, 99, 2598–2608 (2010)
9. Hawe, A., Sutter, M. & Jiskoot, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm. Res.*, 25, 1487–1499 (2008)
10. 使用高分辨率 LC/MS 对两种利妥昔单抗生物仿制药的完整质量数、亚基质量数和游离多聚糖进行比较研究。安捷伦出版物 [5994-1653ZHCN](#)