

SUPR-DSF差式扫描荧光法 筛选曲妥珠单抗的配方

介绍

生物治疗抗体的配方是确保稳定安全产品的生产、储存和运输的基础。配方的开发过程，需要采用高通量方法来可靠、快速地筛选大量配方条件，以确定最佳的制剂和最好的条件。

一种广泛使用的方法是做热变性测试和推导相关参数，如 T_m 和 T_{onset} ，以对配方条件和辅料的稳定效果进行分级筛选。传统的无标记热变性技术受到通量上的限制，比如样品浓度、体积、耗材成本和测量速度等等，这使有成百上千种潜在条件的配方筛选过程成为一个挑战。

在本报告中，我们将展示使用SUPR-DSF仪器，基于热变性这一参数，在96种不同条件下对曲妥珠单抗的配方进行分析和筛选。筛选稳定剂时，获得的结果与差示热扫描量热DSC法获得的结果一致，该配方也已经被商业化用于赫赛汀靶向药。配方的筛选是在一个384孔微孔板中，用时不到1.5小时就获得了全部结果。这种高通量的筛选可以集成到实验室自动化系统，实现每天筛选数千个样品。

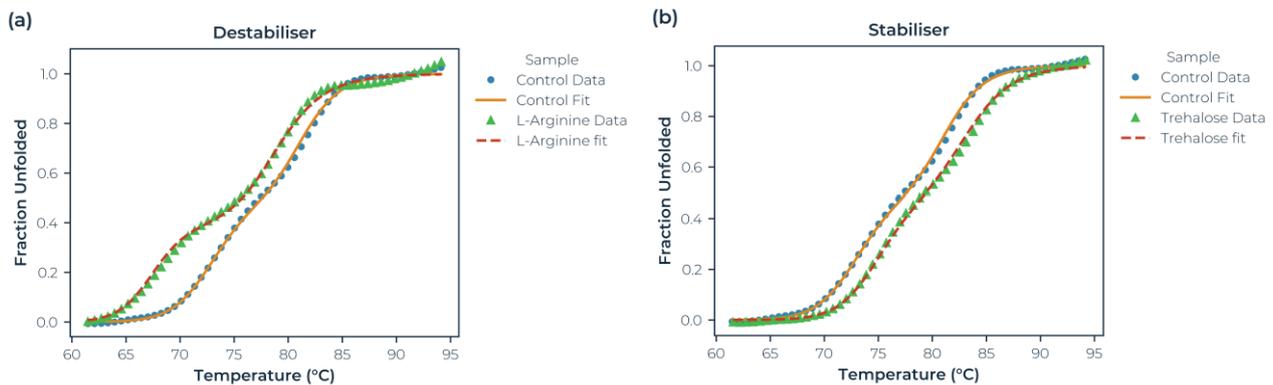


图1 - 曲妥珠单抗变性比例展开图，以及拟合数据。以标准缓冲液作为对照，(a)是去稳定剂，而(b)是稳定剂。为了更清楚的解析和说明，x轴范围已经缩小至解链温度区域。

表1 - 稳定曲妥珠单抗的溶剂条件的拟合参数值。拟合的标准偏差是小于 0.1°C 和 $1.5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。

| 样品 | T_{onset} ($^{\circ}\text{C}$) | T_{m1} ($^{\circ}\text{C}$) | T_{m2} ($^{\circ}\text{C}$) | ΔH_{m1} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) | ΔH_{m2} ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) |
|---------------|--|---|---|---|---|
| 对照品 | 66.2 | 73.2 | 81.2 | 23.0 | 30.3 |
| 甘氨酸 | 67.0 | 73.8 | 83.7 | 24.1 | 41.1 |
| L-脯氨酸 | 66.9 | 73.8 | 81.8 | 23.7 | 34.9 |
| L-组氨酸 | 65.6 | 73.8 | 81.2 | 20.0 | 33.5 |
| β -丙氨酸 | 67.3 | 73.8 | 83.1 | 25.5 | 37.9 |
| 一水甜菜碱 | 68.7 | 75.1 | 84.3 | 26.4 | 26.6 |
| D-(+)-海藻糖二水合物 | 68.2 | 75.1 | 83.1 | 24.3 | 26.9 |
| 木糖醇 | 68.2 | 75.7 | 83.1 | 22.6 | 24.0 |
| D-山梨醇 | 69.5 | 76.3 | 85.0 | 25.9 | 33.0 |
| 磷酸二氢钠 | 69.0 | 75.5 | 86.6 | 26.1 | 34.1 |

结果

测量的变性曲线(图1和图2为示例)显示了两个独立的变性过程。通过标准三态模型[1]对变性数据进行最小二乘法拟合,确定了 T_{m} 值、范特霍夫焓(ΔH)和 T_{onset} 值,并列于表1中。该表也列出了为了提高抗体稳定性所筛选的辅料。

基于三态模型所获得的实验结果与曲妥珠单抗[2]的DSC数据一致,都报告了 70°C 和 82°C 附近的两个 T_{m} 值。考虑到样品和溶剂的变化, T_{m} 值与其它报告的值一致[2]。除了相似的 T_{m} 值之外,SUPR-DSF数据证实组氨酸和海藻糖二水合物既不阻碍也不提高曲妥珠单抗的构象稳定性,这些都是含于药物赫赛汀的曲妥珠单抗的配方成分[3]。这两点有助于证明SUPR-DSF测量的一致性和高通量测试的能力。

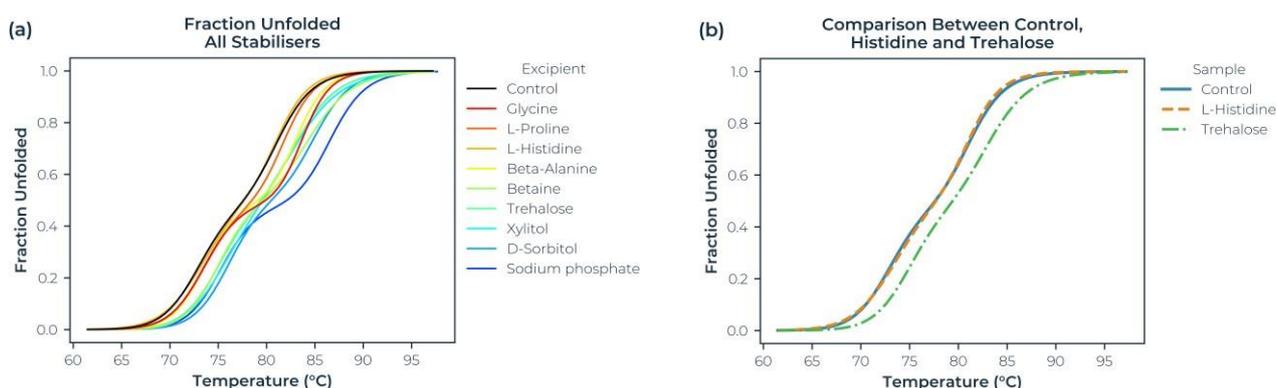


图2-(a)表1中所列样品的展开比例变性曲线。(b)对照品,组氨酸和海藻糖二水合物辅料的展开分数曲线。为了更清楚的解析和说明,x轴范围已经缩小至解链温度区域。

结论

Protein Stable的SUPR-DSF证明了在单次1.5小时测量中，可以获得用来筛选96种制剂的高质量数据，并且能够量化单抗多点变性。该结果与其它低通量方法报告的结果一致，并且可以正确鉴别已经上市的曲妥珠单抗生物治疗制剂中使用的辅料。

此外，基于内源荧光的差示扫描荧光分析法的SUPR-DSF可以在提高通量、便利性、降低耗材成本和样品消耗的同时，获得这些结果。

SUPR-DSF方法不仅样品通量高，数据信息丰富，如果把SUPR-DSF与实验室自动化系统集成，并与其它自动化技术相结合，则每天可以筛选超过1000个条件。

方法设计

微孔板制备

曲妥珠单抗的制备浓度为1mg/mL。在96孔板中，可以预先配制96种不同的溶剂条件。样品可以在已经商用的384孔聚丙烯PCR微孔板中进行制备。将2 μ L的抗体原液加入到18 μ L的配方当中，制得最终抗体浓度为0.1mg/ml的样品。分装后，以1500转的速度摇动平板5分钟，使溶液混合均匀。最后再用透明胶膜封口。

热变性测量

使用SUPR-DSF测量曲妥珠单抗的荧光谱图时，升温的范围从20°C到100°C的，升温斜率为1°C/分钟。通过重心平均值 (BCM) 的计算来量化由蛋白质变性产生的峰位移。

通过最小二乘法拟合三态模型[1]的热变性曲线中，拟合后的参数值列于表1中。通过测量比对照品更高的 T_{m1} 和 T_{m2} 值来鉴别更适用的辅料组分。所有样品的方法和结果可根据要求提供。

参考文献

- [1] – J. Walters, S. L. Milam, A. C. Clark. “Practical Approaches to Protein Folding and Assembly: Spectroscopic Strategies in Thermodynamics and Kinetics”. *Methods in Enzymology*. Vol. 445, p. 1-39. **2009**.
- [2] – K. M. Hutterer, A. Polozova, S. Kuhns, H. J. McBride, X. Cao, & J. Liu. “Assessing Analytical and Functional Similarity of Proposed Amgen Biosimilar ABP 980 to Trastuzumab”. *BioDrugs*, vol. 33(3), p. 321–333. **2019**.
- [3] – Genentech Inc. “Herceptin (Trastuzumab) Package Insert”, U.S. Food and Drug Administration, **1998**.

Protein Stable

21 Mole Business park

Leatherhead,

Surry,

KT22 7BA

UK英国

电话:+44 1372 386 537

传真:+44 1372 386 477

info@photophysics.com

www.proteinstable.com