

与 Uncle 和 Honeybun 一起轻松地进行配方筛选

简介

单克隆抗体 (mAb) 和其他生物制剂会经历各种压力因素，需要在许多不同的环境下保持稳定和一定浓度范围。高浓度制剂会带来额外的复杂性，通常表现为粘度升高和稳定性降低。可开发性评估或配方筛选可以及早发现这些问题，但前提是使用正确的工具。虽然差示扫描量热法、尺寸排阻色谱法以及传统的粘度测定法和流变测定等方法都很强大，但它们需要大量的运行时间、样品和专业知识。另一方面，筛选需要高通量解决方案，且使用少量宝贵的单克隆抗体并提供清晰的结果。理想情况下，相同的分析技术可以跟踪药物从早期发现到制造的整个过程。

Uncle 是一款原创的一体化稳定性平台，具有全光谱荧光、静态光散射 (SLS) 和动态光散射 (DLS) 功能，可对任何配方和任意浓度的 9 μ L 样品中的蛋白质和基因治疗载体进行全面表征 (图 1A)。温度控制 (15–95 $^{\circ}$ C) 和密封的样品架使实验应用具有极大的灵活性。可以从相同的样品体积中评估多个参数，包括荧光、聚集、尺寸、多分散性和热解折叠，只需一次实验，即可让您获得正交和互补的实验结果。Uncle 一次最多可以测量 48 个样品，从而在早期发现、工艺开发或制备中需求高通量表征时能够快速获取大量的参数结果。

粘度在开发流程的每个阶段都是关键参数。在发现和早期开发中，高粘度表明蛋白质分子彼此相互作用或与溶剂和赋形剂相互作用。作为进入后期开发阶段的生物制剂，其粘度和稳定性会影响可制造性，甚至影响安全性和向患者的交付。尽早筛选出对的配方可以使这些问题从药物研究的开始到结束都得到控制。

尽管粘度是一个非常有用的参数，但获得您需要的所有粘度信息却非常困难。以往经典技术需要一次一个样品的在仪器上花费数小时来读取数据，同时这些仪器会消耗大量的样品。这些技术的更新版本需要使用昂贵的组件，不仅造成了新瓶颈，且需要大量的清洁和校准工作。

Honeybun (图 1B) 是一款快速微体积粘度计，它结合了低样品体积要求（默认为 35 μL ，低体积模式为 15 μL ），并且能够并行运行最多 10 个样品。使用 Honeybun 进行检测十分简单。只需将分析物移入 Bun，然后插入 Honeybun，几分钟内即可获得准确和精确的粘度结果。Honeybun 的动态范围 (0.5–150 cP) 涵盖了大多数生物制剂，即使在高浓度下也是如此。

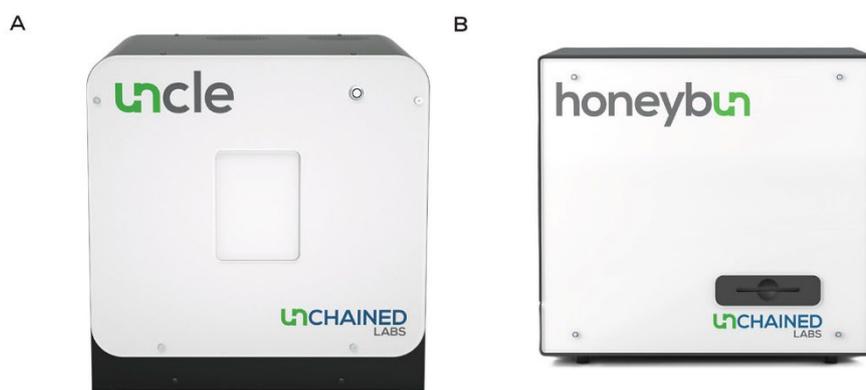


图 1: Uncle (A) 是原创的一体化生物制剂稳定性平台。Honeybun (B) 是一款使用不超过 35 μL 样品即可在几分钟内读取多达 10 个样品的快速微量粘度计和流变仪。

方 法

将原浓度为 26 mg/mL 的单克隆抗体 1 (mAb1)、单克隆抗体 2 (mAb2) 和阿达木单抗稀释至 10 mg/mL，并以 14,000 \times g 离心（以去除沉淀聚集物）。通过 0.1 μm 注射器过滤离心后的上清液。将 400 μL 每种抗体一式三份添加到 10 kDa MWCO 再生纤维素 Unfilter 96 板中，然后使用 Big Tuna 将所有样品更换为含 0.001% 聚山梨醇酯 80 (PS80) 和 0.9% NaCl、80 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 精氨酸组合或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸组合的 10 mM 组氨酸缓冲液 (pH 6)。然后将样品浓缩至 100 mg/mL。对于曲妥珠单抗，将 200 μL 原浓度为 8.5 mg/mL 的制剂在单孔中更换为相同的配方，然后浓缩至 10 mg/mL。所有缓冲液交换和浓缩步骤均使用 Big Tuna 的 0.5–50 mg/mL 蛋白质应用模块的默认参数。所有样品和空白缓冲液一起在 Stunner 上一式四份检测其初始和最终蛋白质浓度、大小和 PDI。使用 Honeybun 测定每种制剂的粘度。将蛋白质在各自的配方缓冲液中稀释至 1、10 或 100 mg/mL，并将每个样品一式三份装入 Uni (由 16 个 9 μL 石英比色皿组成的阵列，用硅胶垫圈密封) 中。

蛋白质解折叠和聚集实验是通过 Uncle 上的“ T_m & T_{agg} with DLS”应用程序进行的。样品在 Uncle 中以 $0.3\text{ }^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 的速率从 $15\text{ }^\circ\text{C}$ 加热至 $95\text{ }^\circ\text{C}$ ，并在 266 和 473 nm 处激发，记录荧光发射信号和 SLS 信号。Uncle Analysis 软件根据 $300\text{--}430\text{ nm}$ 荧光强度曲线的质心平均值 (BCM) 确定解链温度 (T_m)，并根据 266 nm 散射光强度确定聚集温度起始点 (T_{agg})。 T_m s 和 T_{agg} s 显示为三次重复的平均值。通过 DLS 测量热升温前后的平均流体动力学直径，采集参数为 4 次，每次 5 秒时长。

在 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 下，使用 Honeybun 的“默认”模式，从 $35\text{ }\mu\text{L}$ 的 100 mg/mL 样品中一式三份测定蛋白质溶液的粘度。

结果

热稳定性筛选加速了蛋白质和制剂的开发，从而缩短了为患者提供新颖、挽救生命的疗法所需的时间^①。此筛选的关键要素是使用内源荧光来查找 T_m s 和使用 SLS 来显示 T_{agg} s。此案例研究中，在 10 mM 组氨酸 ($\text{pH } 6$) 溶液中添加蔗糖或精氨酸，都改善了 mAb1 构象稳定性，将 T_m (相对于 NaCl 条件) 从 $67\text{ }^\circ\text{C}$ 提高至 $70\text{ }^\circ\text{C}$ (图 2)。然而，蔗糖和精氨酸不具有组合效应，因为两者一起添加具有与单独添加任一赋形剂相似的 T_m 。

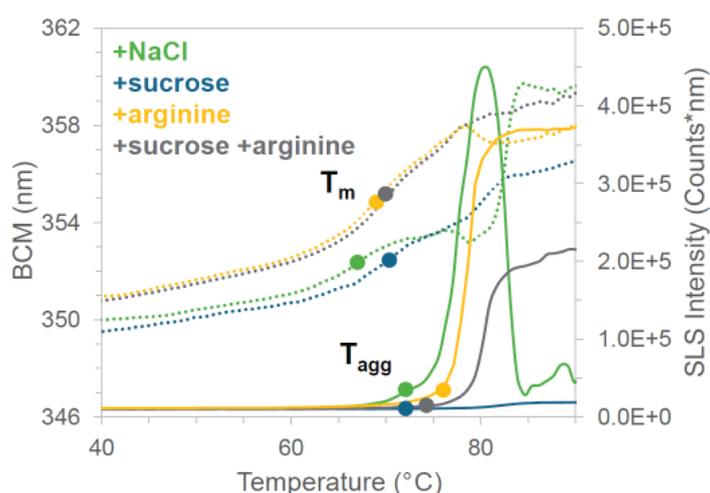


图 2: mAb1 在 10 mM 组氨酸缓冲液 ($\text{pH } 6$) 中的 BCM (虚线, 左 y 轴) 和 SLS (实线, 右 y 轴), 含有 0.001% PS80 和 0.9% NaCl (绿色), 80 mg/mL 蔗糖 (蓝色)、 10 mg/mL 精氨酸 (黄色) 或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸 (灰色)。 T_m s 和 T_{agg} s 是一式三份样品的平均值。

尽管相对于 NaCl，蔗糖提高了 mAb1 的 T_m ，但两者的 T_{agg} 却十分相似都是 72.1 °C。单独的精氨酸配方具有测试赋形剂中最高的 T_{agg} ，在 76 °C。然而，氯化钠和精氨酸配方显示出比单独蔗糖更高的 SLS 信号。因为 SLS 信号与溶液中颗粒的大小和数量成正比，这表明即使蔗糖可能使抗体在稍低的温度下开始聚集，但在精氨酸和氯化钠存在下抗体的聚集程度更大。

DLS 是一种正交光散射技术，可以确定每种赋形剂下的蛋白质颗粒的大小，以确认 SLS 结果，并帮助了解加热后聚集体的尺寸和多分散性。在蔗糖条件下，mAb1 在 DLS 强度分布图中分别在 15 °C 和 95 °C 处出现单峰，平均流体动力学直径分别为 8 和 17 nm (图 3A)。15 °C 时的 DLS 峰比 95 °C 时更窄。添加蔗糖和精氨酸后，mAb1 在 15 °C 下仍然是单分散的，平均尺寸为 11 nm。95 °C 时，颗粒转向更大的尺寸，使得流体动力学尺寸分布在从低于 100 nm 到高于 1,000 nm 的宽范围内。单独使用 NaCl 或精氨酸的 MAb1 表现出大致相同的 DLS 行为 (数据未显示)。基于 SLS 和 DLS 结果，与单独的蔗糖相比，在精氨酸或 NaCl 存在下，mAb1 在热变性期间更容易形成大的聚集体。

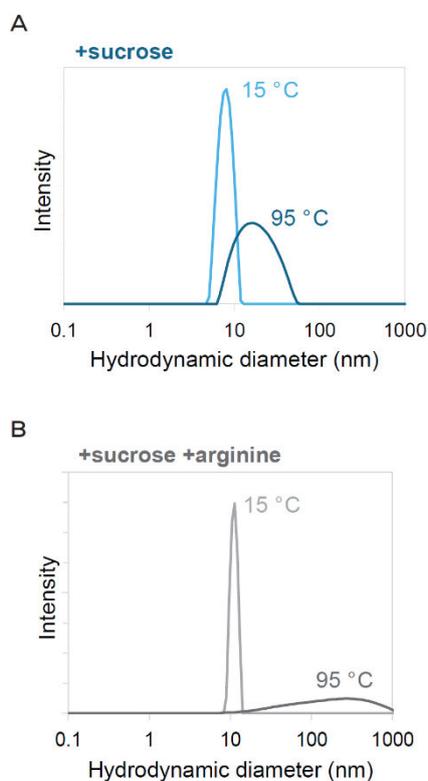


图 3: mAb1 在 10 mM 组氨酸 (pH 6)、0.001% PS80 和 80 mg/mL 蔗糖 (A) 或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸 (B)。

配方的各个方面，从蛋白质的结构到其浓度再到选择的赋形剂，都会影响其稳定性。然而，有时不同的抗体可以具有相似的构象和胶体稳定性特性。在此描述的示例中，mAb1 和曲妥珠单抗在多种配方和浓度下具有相似的 T_{ms} 和 T_{aggS} (图 4)。阿达木单抗往往具有较低的 T_{aggS} ，但 T_{ms} 与 mAb1 和曲妥珠单抗相似，而 mAb2 总体上具有较低的 T_m 和 T_{agg} ，因此其稳定性较差。

改变蛋白质的浓度也会影响其稳定性，就像添加赋形剂一样。测试高浓度需要每体积更多的抗体，这使得使用少量样品体积测试这些影响变得更加重要。在这里使用的一组制剂中，蔗糖对 1 mg/mL 的 mAb1 和 10 mg/mL 的曲妥珠单抗具有最大的稳定作用，而 NaCl 使 mAb1，曲妥珠单抗和 mAb2 不稳定 (图 4A 和 B)。NaCl 对 1 mg/mL 这 3 种 mAb 的 T_m 和 T_{agg} 有显著影响；但在 10mg/mL 样品浓度时，其对 mAb1 和曲妥珠单抗的 T_m 影响较大，而对 mAb2 影响是 T_{agg} 。

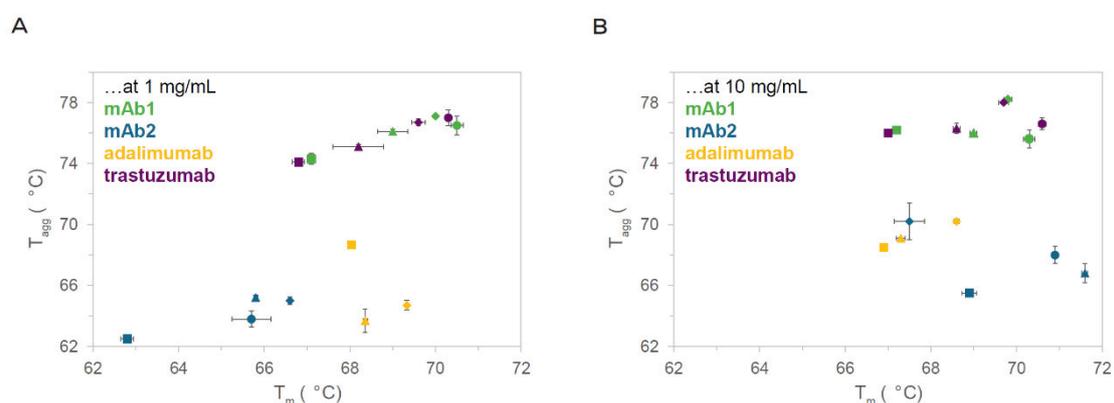


图 4: 10 mM 组氨酸缓冲液 (pH 6) 中 1 (A) 和 10 mg/mL (B) 的 mAb1 (绿色)、mAb2 (蓝色)、阿达木单抗 (黄色) 和曲妥珠单抗 (紫色) 的 T_m 与 T_{agg} 。0.001% PS80 和 0.9% NaCl (方形)，80 mg/mL 蔗糖 (圆形)，10 mg/mL 精氨酸 (三角形) 或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸 (菱形) 的组合。误差线是一式三份的 1 个标准差。

许多单克隆抗体在较高浓度下不太稳定^②。然而，情况并非总是如此。当以 10 mg/mL 制备时，mAb2 比在相同制剂中以 1 mg/mL 制备时具有更好的构象和胶体稳定性，如较高的 T_{ms} 和 T_{agg} 所示 (图 4A & 4B)。阿达木单抗在类似条件下显示出增加的 T_{agg} 。然而，当蛋白质以 100 mg/mL 的浓度制备时，这种浓度依赖性稳定作用并没有持续存在 (表 1)。

Protein	Concentration (mg/mL)	T _{agg} (°C)			
		+ NaCl	+ sucrose	+ arginine	+sucrose + arginine
mAb1	100	65.7	73.7	69.3	71.3
mAb2	100	64.6	66.1	68.3	68.9
adalimumab	100	65.7	n. d.	66.4	68.3

表 1: 10 mM 组氨酸缓冲液 (pH 6, 含 0.001% PS80 和 0.9% NaCl) 中的 100 mg/mL mAb1、mAb2 和阿达木单抗标签、80 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 精氨酸或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸。每种抗体表现最好的赋形剂以绿色突出显示。

阿达木单抗与蔗糖的 T_{agg} 未测定 (n.d.), 因为其在室温下在此条件下发生聚集。

对于较高浓度的抗体, 例如那些为皮下给药而制备的抗体, 变性问题较少, 但它们往往容易在较低的温度下聚集。正确选择辅料可以大大降低这种风险。仅将蔗糖添加到含 0.001% PS80 的 10 mM 组氨酸 (pH6) 的 100 mg/mL mAb1 中, 可增加其 T_{agg}, 特别是相对于 NaCl 而言 (表 1)。添加蔗糖和精氨酸可延迟热变性的 mAb2 和阿达木单抗 (100 mg/mL) 的聚集, 并具有最大的稳定作用。内源荧光和 SLS 是灵活的技术, 适用于大多数蛋白质浓度、缓冲液和赋形剂, 可以快速、轻松地筛选任何应用场景需求的配方。

粘度是高浓度 mAb 制剂的另一个关键问题, 并对递送, 可开发性和可制造性产生影响^{③④}。随着浓度的增加, 许多蛋白质的粘度呈“曲棍球棒”状。指数增长开始的确切浓度因蛋白质而异, 但正确的配方可以降低它。粘度评估很少成为早期高通量筛选的一部分, 因为大多数粘度计速度慢, 需要大量样品, 或者难以使用。Honeybun 是一种易于使用的粘度计和流变仪, 只需 15µL 样品即可并行测量多达 10 个样品, 无需清理。将粘度测量值添加到现有的配方筛选工作中, 用 Honeybun 进行筛选非常顺利, 只需几分钟就能得到结果。此处测试的含蔗糖的 100 mg/mL mAb 制剂的粘度往往高于纯盐制剂 (图 5)。精氨酸可以削弱蛋白质分子之间的疏水相互作用, 这使其成为高浓度单克隆抗体的常见粘度降低用赋

形剂⁵。然而，如果疏水相互作用不能驱动粘度增加，精氨酸可能具有相反的作用。作为两者的一个例子，相对于单独的蔗糖，将精氨酸和蔗糖一起添加到 mAb2 中会降低其粘度，但向 mAb1 中添加精氨酸会增加其粘度。

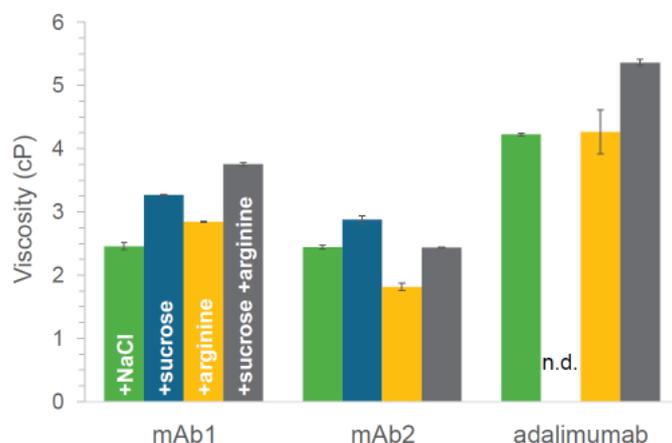


图 5: 10 mM 组氨酸缓冲液 (pH 6, 含 0.001% PS80 和 0.9% NaCl (绿色条)、80 mg/mL 蔗糖 (蓝色条)、10 mg/mL 精氨酸中 100 mg/mL mAb1、mAb2 和阿达木单抗的粘度 (黄色条), 或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸 (灰色条)。误差线是一式三份的 1 个标准差。

平衡配方的所有关键属性并快速完成是配方筛选的终极目标。

考虑到 T_m , T_{agg} 和 DLS 结果 (表 2), 蔗糖作为赋形剂对所有测试蛋白质浓度的 mAb1 和曲妥珠单抗具有最佳的稳定性。通常, 蔗糖和精氨酸的组合对于 mAb2 和阿达木单抗是最佳的, 但也有浓度特异性的最佳表现。当蛋白质为 1 mg/mL 时, 阿达木单抗单独使用 NaCl 表现最佳, 而当制备为 10 mg/mL 时, mAb2 优选单独使用精氨酸。总之, 考虑到此处提供的数据, 蔗糖是 mAb1 和曲妥珠单抗的最佳赋形剂, 而蔗糖和精氨酸的组合对 mAb2 和阿达木单抗最好。

Antibody	Top excipients at...			
	1 mg/mL	10 mg/mL	100 mg/mL	Overall
mAb1	+ sucrose	+ sucrose	+ sucrose	+ sucrose
mAb2	+ sucrose + arginine	+ arginine	+ sucrose + arginine	+ sucrose + arginine
adalimumab	+ NaCl	+ sucrose + arginine	+ sucrose + arginine	+ sucrose + arginine
trastuzumab	+ sucrose	+ sucrose	n. d.	+sucrose

表 2: 基于热稳定性结果 (T_m 、 T_{agg} 和 DLS) 和整体性能 (包括粘度结果), 1、10 和 100 mg/mL 的 mAb1、mAb2、阿达木单抗和曲妥珠单抗表现最佳的赋形剂。

结 论

优化配方并尽快有效地消除稳定性或粘度的潜在问题是任何配方筛选的目标。灵活、高通量、低样本量的工具使实现这一目标变得更加容易。内源荧光, SLS 和 DLS 的结合提供了蛋白质对热变性过程的丰富信息, 无论是变性, 聚集还是两者兼而有之。这使得找到最佳赋形剂或配方并将风险降至最低变得简单。当优化皮下给药时, 测试与这种给药相关的抗体浓度会产生最适用的数据来选择制剂。将 Uncle 的稳定性与 Honeybun 的高通量粘度相结合, 开辟了配方和结构筛选的全新世界。

参考文献

1. Developability assessment during the selection of novel therapeutic antibodies. A Jarasch, et al. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015; 104(6):1885–1898.
2. Antibody Structure, Instability, and Formulation. W Wang, et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007; 96(1):1–26.
3. Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. TJ Kamerzell, et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011; 63(13):1118–1159.
4. Evaluation of the impact of viscosity, injection volume, and injection flow rate on subcutaneous injection tolerance. C Berteau, et al. *Medical Devices (Auckland, N.Z.)*. 2015; 8:473–484.
5. Viscosity Control of Protein Solution by Small Solutes: A Review. T Hong, et al. *Current Protein & Peptide Science*. 2017; 19(8):746–758.



Unchained Labs

4747 Willow Road
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.291.7794
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2024 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Honeybun, the Honeybun logo, Uncle, the Uncle logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A