

遇见 Aunty——蛋白稳定性表征王者

简介

Aunty 是全新一代快速多功能蛋白稳定性分析平台（图 1）。与其他稳定性方法相比，Aunty 克服了速度慢、信息不完整或样品消耗过多等缺点。Aunty 突破了这些问题，以极快的速度提供有效的结果。Aunty 的全光谱荧光功能支持用户根据需求选择固有荧光或染料荧光，从而精确测定样品的熔解温度 (T_m)。静态光散射和动态光散射 (SLS 和 DLS) 并行运行，可以在加热前、加热中或加热后以极高的灵敏度检测聚集体。在 Aunty 中，荧光、SLS 和 DLS 协同工作，全面了解热稳定性。



图 1: Aunty 是一款灵活、自动化友好、专为热稳定性设计的板式平台。

最小化样品消耗和最大化通量是生物制剂表征工作流程的主要目标之一。Aunty 在实验的每一分钟读取所有 96 个样品，每个样品仅需 8 μL 。96 孔石英板的 SBS 格式适合自动化操作，并提供卓越的光学性能。此外，石英玻璃与几乎所有化学物质兼容，加载后密封孔可以防止样品污染。样品浓度从 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 300 mg/mL ，取决于样品，可以在同一板上和同一实验中运行。温度控制 (15–95 $^{\circ}\text{C}$) 与密封样品结合，提供了前所未有的数据分辨率，而不会牺牲灵活性。以 0.1–10 $^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的速度升温，或保持单一温度数小时甚至数天，以加速长期稳定性测试。荧光、SLS 和 DLS 可以一起或单独运行在一个或多个样品上，因此实验可

可以根据您的需求进行定制。实验完成后，叠加图表，比较结果，并使用这些信息得出关于构建体、修饰、偶联、条件或配方稳定性的正确结论。

本应用说明展示了如何使用 Aunty 的全光谱荧光、出色的 SLS、符合 ISO 标准的 DLS 和温度控制来确定蛋白质和病毒载体的关键稳定性测量。

1. 热升温 (T_m 和 T_{agg})

加热蛋白质通常会使它们裂解，重新排列其氨基酸。随着这一过程的发生，其色氨酸和酪氨酸残基的荧光行为也往往会发生变化。跟踪蛋白质固有荧光的变化可以监测蛋白质的构象稳定性，并确定溶解温度 (T_m)。您可以使用这一点来对不同配方、构建体、突变体甚至偶联物的稳定性进行排序。

蛋白质在热应力下容易发生聚集，这一过程通常与蛋白质展开同时进行。尽管并非所有情况下都如此，但展开与聚集往往密切相关。SLS 是一种超灵敏的方法，可以在热升温过程中尽快检测到聚集。同时监测蛋白质的展开和聚集是有效热稳定性筛选的关键，这可以加速可开发性测试，并缩短将新型、拯救生命的疗法推向临床的时间。

Aunty 的板式稳定性筛选功能强大，可全面分析蛋白的展开与聚集。在热升温实验过程中，每分钟可检测 96 个样品，每个样品仅需 8 μ L，检测灵敏度低至 25 μ g/mL。在 PBS 中 1 mg/mL 和 25 μ g/mL 的曲妥珠单抗具有相似的 T_m ，分别为 71.1 和 70.3 $^{\circ}$ C (图 2)。25 μ g/mL 的聚集起始温度 (T_{agg}) 低于 1 mg/mL 的 T_{agg} (76 与 79.1 $^{\circ}$ C)。然而，1 mg/mL 样品的总 SLS 强度更高，这可能反映聚集体数量或粒径增加，表明高浓度样品虽对聚集起始的抵抗力更强，但一旦聚集发生，聚集程度会更严重。

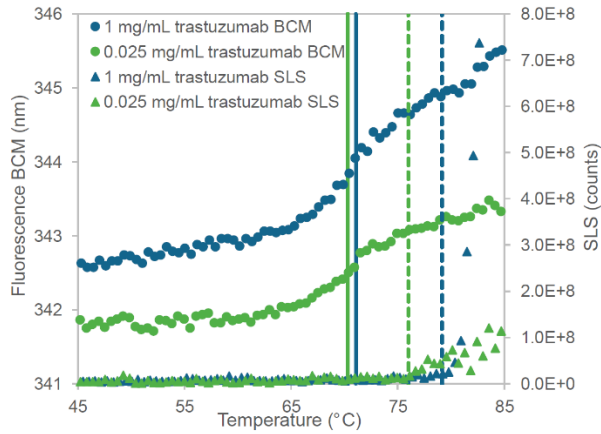


图 2：曲妥珠单抗在 PBS 中分别配制为 1 mg/mL (蓝色) 和 25 μ g/mL (绿色)，使用 Aunty 的 T_m & T_{agg} 应用从 25 $^{\circ}$ C 加热至 95 $^{\circ}$ C，每 30 秒进行一次荧光 (圆圈，左 Y 轴) 和静态光散射 (SLS，三角，右 Y 轴) 测量。熔解温度 (T_m ，实线) 和聚集起始温度 (T_{agg} ，虚线) 为两次重复实验的平均值。

2. 粒径和多分散性

确保您的生物制剂和其他治疗剂的粒径正确始终很重要。小颗粒可能表明污染、降解或杂质，而大颗粒可能是聚集体。一些粒径测量方法无法处理可能遇到的所有颗粒粒径范围。大多数可溶性蛋白质的直径为 1–20 nm，病毒为 20–100 nm，纳米颗粒几乎可以是任何粒径。Aunty 的动态光散射 (DLS) 功能快速、灵敏且可靠，可用于检测蛋白质聚集或验证基因疗法的粒径是否符合预期。最重要的是，它功能足够多，可以覆盖 0.3–1000 nm 的粒径范围。

3 个 NIST 聚苯乙烯珠标准品的平均直径分别为 22、102 和 512 nm。这些都在制造商指定的粒径范围内，分别为 21–25、90–104 和 503–517 nm (图 3)。所有样品的 $PDI \leq 0.1$ ，表明它们是单分散的制备物。

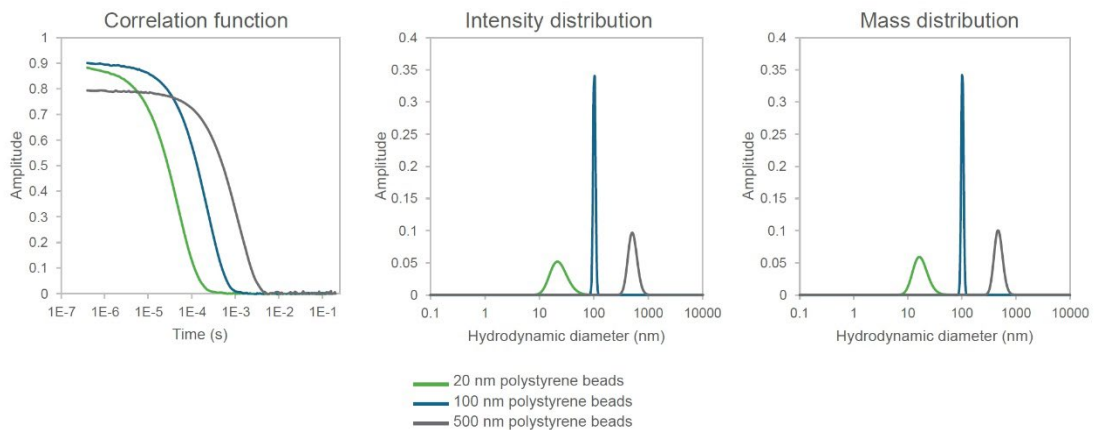


图 3: 20 nm (绿色)、100 nm (蓝色) 和 500 nm (灰色) 聚苯乙烯球的相关函数 (左)、强度分布 (中) 和质量分布 (右), 使用 Aunty 的粒径和多分散性应用在 25 °C 下测量, 每次采集 4 秒, 共 5 次。曲线代表三次重复。

3. 热升温 (包括粒径测量的 T_m 和 T_{agg})

当您在热升温过程中将 Aunty 的荧光和 SLS 与 DLS 结合使用时, Aunty 成为了稳定性平台。准确性和重现性不在话下, Aunty 前所未有的分辨率为您提供了所需的所有信息, 以全面了解稳定性。无论您对蛋白质的了解有多少, Aunty 都可以展示您需要知道的信息, 甚至更多。

NISTmAb 蛋白质是用于评估抗体表征方法性能的参考材料。Aunty 在 12.5 mM L-组氨酸、12.5 mM 组氨酸-HCl、pH 6.0 中测定了 1 mg/mL NISTmAb 的两个 T_m , 分别为 69.7 和 83.5 °C (图 4A)。这些结果与已发表的差示扫描量热法 (DSC) T_m 值 69.2 和 83.1 °C^①。虽然大多数蛋白质在热升温过程中会聚集, 但 NISTmAb 的 SLS 强度没有显著增加, 表明在此条件下没有聚集。通过并行采集 SLS 和 DLS 数据, Aunty 可利用正交技术验证实验结果 (图 4B)。抗体的流体动力学粒径仅增加了约 5 nm, 增加从大约 80 °C 开始。由于蛋白质聚集体通常在 100 nm 的粒径范围内, 报告的粒径增加很可能与 T_{m2} 密切相关, 是由于蛋白质展开而不是聚集。在 96 个样品上准确结合多种检测方法, 使 Aunty 成为极快的最高通量稳定性平台。

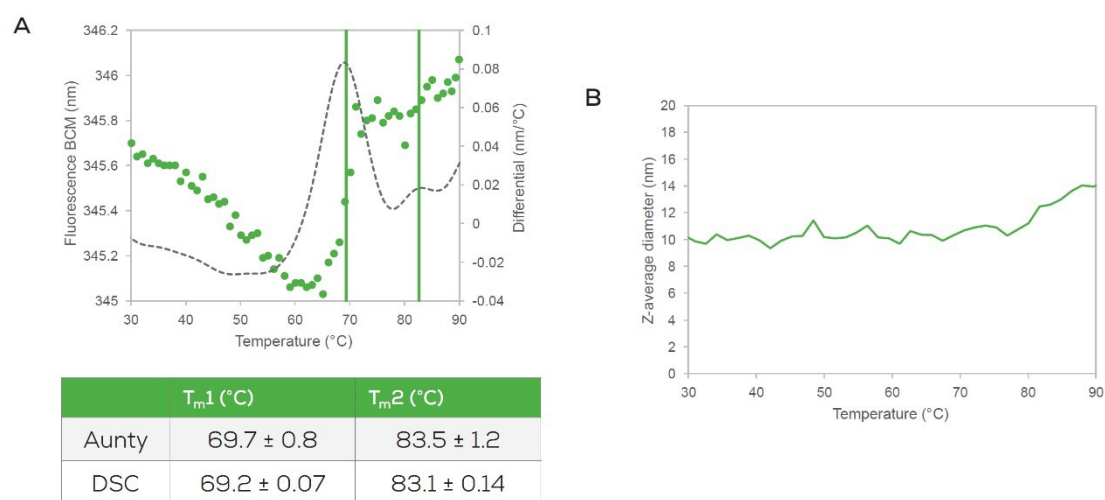


图 4A: NISTmAb 的溶解温度 (T_m) 测定结果; 图 4B: Z 平均直径变化趋势。

NISTmAb 在 12.5 mM L-组氨酸、12.5 mM 组氨酸-HCl (pH 6.0) 中稀释至 1

mg/mL，并使用 Aunty 的“包含粒径测量的 T_m & T_{agg} ”应用（默认设置）进行测试。溶解温度 (T_m ，A 图中的垂直线) 通过荧光 BCM 变化 (左 Y 轴，绿色圆点) 结合一阶微分峰值 (右 Y 轴，虚线) 确定。图标显示 Aunty 测得的平均 T_m 与已发表 DSC T_m 值的对比 (含标准偏差)。升温过程中蛋白质的 Z 平均直径 (B 图) 与荧光数据同步测定。

4. 热升温 (使用报告染料的 T_m 和 T_{agg})

有些蛋白质没有荧光残基，或者处于淬灭其荧光的环境中。在这些情况下，您可以使用报告染料 (如 SYPRO Orange) 来评估稳定性。Aunty 配备 280 nm 和 470 nm 激发 LED 的全光谱荧光系统，可支持多种分子类型的稳定性测试，并兼容多种染料。SLS 和 DLS 与固有荧光或染料荧光检测兼容，因此无论您选择哪种方式，都能获得聚集信息。Aunty 可以让您根据分子定制检测方法，而不是强制它们适应仪器条件。

3 mg/mL 牛 IgG 在 PBS 中的固有荧光 T_m 和 T_{agg} 分别为 71.3 和 70.8 °C (图 5A)。通过添加 20X SYPRO Orange™，我们可以利用染料结合到暴露的疏水斑块时荧光强度的增加来确定 T_m 为 71.5 °C (图 5B)。在这些条件下，牛 IgG 的 T_{agg} 为 69.9 °C。

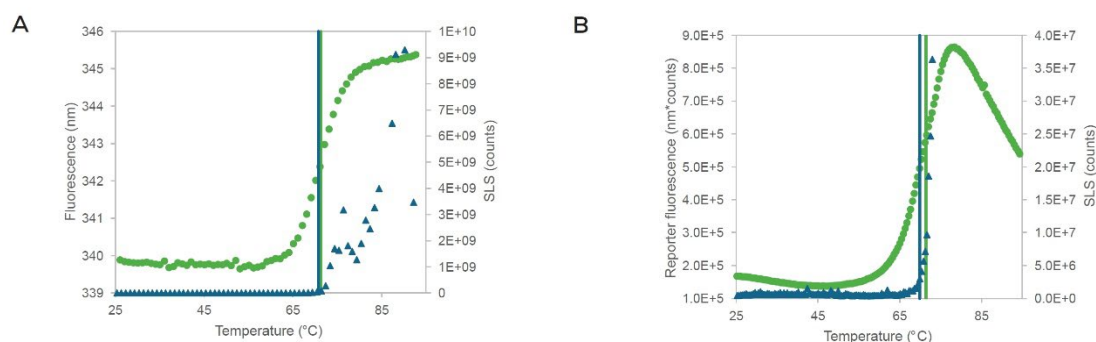


图 5: 牛 IgG 在 PBS 中配制为 3 mg/mL 浓度，分别使用 Aunty 的“ T_m & T_{agg} ”应用，仅开启紫外 LED (A) 或添加 20 倍 SYPRO Orange 后使用“带报告染料的 T_m & T_{agg} ”应用，仅开启蓝色 LED (B) 进行测量。固有荧光或 SYPRO Orange 荧光 (绿色圆点，左 Y 轴) 用于确定 T_m (绿色垂直线)。静态光散射 (SLS，蓝色三角，右 Y 轴) 用于确定 T_{agg} (蓝色垂直线)。

5. 衣壳稳定性

病毒载体在加工过程中经历的压力与其他生物制剂一样多，但它们可能以完全独特的方式失效。蛋白质裂解和聚集当然是病毒载体问题，但核酸有效载荷的基

基因组丢失也是一个问题。功能检测可能需要数天才能检测到这些问题，但 Aunty 的衣壳稳定性应用可以在不到一小时内完成。通过监测 SYBR Gold 荧光的增加，Aunty 可以判断病毒基因组何时从衣壳中弹出[®]。灵敏度低至 5×10^{11} vg/mL，您可以比以往更早获得稳定性见解。

AAV9 在 PBS 中的基因组弹出 T_m 为 60.6°C ，基于 SYBR Gold 荧光的增加，SLS 测得的 T_{agg} 为 76.3°C (图 6)。 T_m 表明载体在衣壳蛋白整体破坏之前丢失了核酸有效载荷，这可能与 T_{agg} 同时发生。Aunty 同时监测荧光和 SLS，并自动计算 T_m 和 T_{agg} 值。

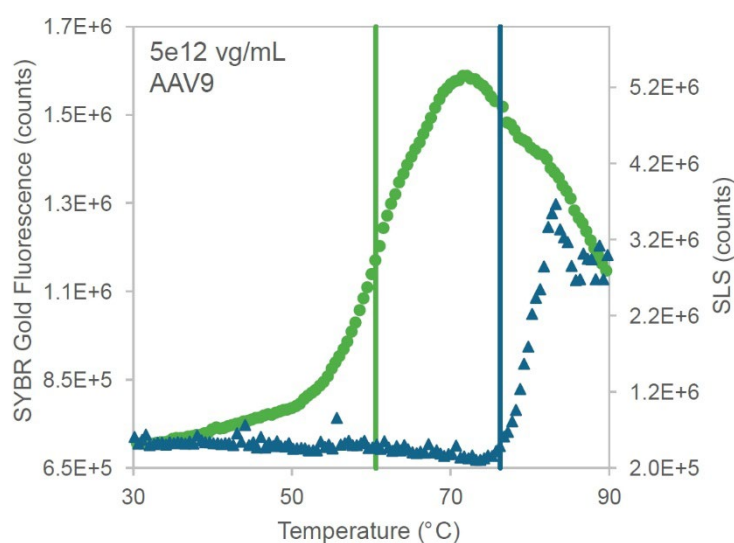


图 6: AAV9 在含 20 倍 SYBR Gold 的 PBS 中稀释至 5×10^{12} vg/mL，使用 Aunty 的“衣壳稳定性”应用（默认设置）从 25°C 加热至 95°C 。加热过程中监测 SYBR Gold 荧光（绿色圆点）和 SLS（蓝色三角）的增强，分别以荧光跃迁点（绿色垂直线）和 SLS 上升起点（蓝色垂直线）作为 T_m 和 T_{agg} 。

6. 胶体稳定性 (k_D 、 B_{22} 、 G_{22})

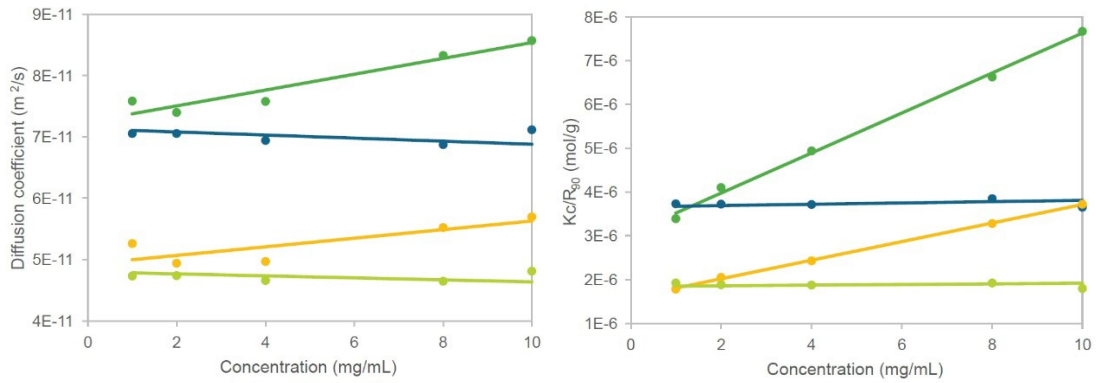
识别减少或防止聚集的因素是生物制剂可开发性和配方筛选的目标之一。缓冲液的选择、添加辅料或对分析物进行突变都会影响治疗剂的胶体稳定性。使用 Aunty 的胶体稳定性应用，利用其卓越的光散射功能，通过测量三个胶体稳定性参数 k_D 、 B_{22} 和 G_{22} ，筛选蛋白质是否“喜欢”给定的配方，或者是否即将发生聚集。

吸引力分子间力使蛋白质随着浓度增加而扩散得更慢；排斥力使它们扩散得更快。相互排斥的蛋白质分子不太可能聚集，因此具有更好的胶体稳定性^②。扩散相互作用参数 k_D 表达了这种关系。正的 k_D 表示排斥性分子间力和低聚集倾向，负的 k_D 值则表示相反。第二维里系数 B_{22} 是溶液中蛋白质自结合的另一种度量^③。它由 SLS 数据确定——静态光散射与浓度的线性回归（称为 Debye 图）。与 k_D 一样， B_{22} 的正值表示排斥，负值表示吸引。主要区别在于它们的测量方式： B_{22} 基于静态光散射， k_D 基于动态光散射。

G_{22} ，即 Kirkwood–Buff 积分，是一种更严格的方法，通过考虑样品中的蛋白质–溶剂和蛋白质–溶质相互作用，特别是在高浓度下，测量蛋白质分子的净自相互作用参数^④。通常， k_D 和 B_{22} 最适合浓度 ≤ 20 mg/mL。高于此浓度， G_{22} 变得更有用。与 B_{22} 和 k_D 不同， G_{22} 的负值表示蛋白质分子之间的净排斥力，而正的 G_{22} 则表示可能的自结合。此外，与 k_D 和 B_{22} 不同， G_{22} 的离散值在稀释系列中的每个浓度下定义。

Aunty 的胶体稳定性应用可自动计算样品的三个关键参数： k_D 、 B_{22} 和 G_{22} 。用户只需准备稀释系列（理想情况下为 5 个浓度，每个浓度三次重复），即可启动实验。您总是会得到 k_D ，但如果您包含缓冲液空白，您还会得到 B_{22} 。如果您告诉 Aunty 分析物的分子量，您也会得到 G_{22} 。这是确定蛋白质在给定配方中的聚集倾向的最快方法，或者确定从低浓度到高浓度（例如从静脉注射重新配制为皮下注射）时是否存在风险。

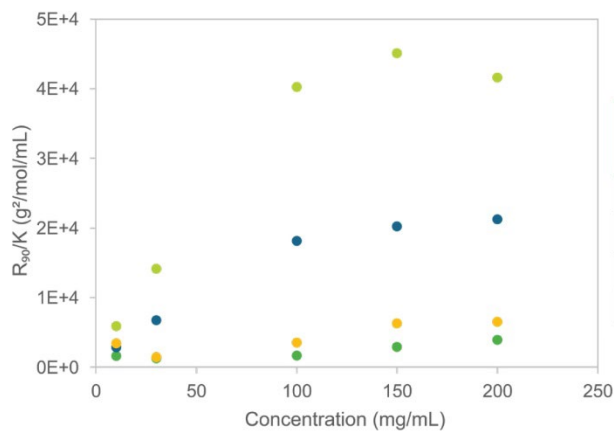
在 10 mM 组氨酸、pH 6 中添加 80 mg/mL 蔗糖的曲妥珠单抗具有相对较大的正 k_D 值，而添加 0.9% NaCl 则使其在 25 和 42 °C 下具有负值（图 7）。虽然所有测试条件下的 B_{22} 均为正，但蔗糖的值比 NaCl 高约 30 倍，表明蔗糖的排斥力更强。这表明曲妥珠单抗在组氨酸与蔗糖中的胶体稳定性优于与 NaCl。



	k_D (mL/g)	B_{22} (mol*mL/g ²)
Trastuzumab with sucrose, 42°C	17.8	2.3e-4
Trastuzumab with NaCl, 42°C	-3.5	7.3e-6
Trastuzumab with sucrose, 25°C	14.2	1.1e-4
Trastuzumab with NaCl, 25°C	-3.3	3.3e-6

图 7：曲妥珠单抗在 10 mM 组氨酸 (pH 6) 中配制为 1、2、4、8、10 mg/mL 的稀释系列，分别添加 80 mg/mL 蔗糖或 0.9% NaCl。样品在 25 °C 或 42 °C 下使用 Aunty 的“胶体稳定性”应用（默认设置）进行三次重复测定。基于扩散系数的线性回归（左图）和 Debye 图（右图）计算 k_D 和 B_{22} 。图中点为三次重复的平均值汇总结果。

虽然在组氨酸缓冲液中向曲妥珠单抗中添加蔗糖可以稳定它，但糖并不总是最好的稳定剂。另一个单抗 mAb1 在较高蛋白质浓度下与 NaCl 的 G_{22} 分析的 R_{90}/K 图趋于平稳，表明在盐存在下净排斥力（图 8）。与蔗糖相比，NaCl 存在下 G_{22} 值有降低趋势，表明在较高浓度（例如超过 50 mg/mL）下，NaCl 在 10 mM 组氨酸、pH 6 中是 mAb1 更稳定的赋形剂。



mAb1	Concentration mg/mL				
	10	30	100	150	200
with sucrose, 42°C	92.2	3.9	-0.5	-0.2	-0.1
with NaCl, 42°C	24.1	-5.2	-4.4	-5.0	-4.7
with sucrose, 25°C	189.7	-1.5	-1.3	-0.6	-0.7
with NaCl, 25°C	6.8	-24.1	-11.8	-12.4	-12.4

图 8: mAb1 在 10 mM 组氨酸 (pH 6) 中配制为 10、30、100、150、200 mg/mL 的稀释系列, 分别添加 80 mg/mL 蔗糖或 0.9% NaCl。样品在 25 °C 或 42 °C 下使用 Aunty 的“胶体稳定性”应用 (默认设置) 进行三次重复测定。通过 R90/K 偏离线性的程度计算 G_{22} 。图中点为三次重复平均值, 表格显示不同条件下的 G_{22} 值。

7. 等温稳定性

长期稳定性测试通常是生物制剂的瓶颈。传统方法笨拙且不便, 您宁愿推迟这种测试——而在开发早期进行长期稳定性测试可以让您有更多空间应对潜在问题。Aunty 通过密封板帮助保持流程的进行, 密封板可以在仪器中保持样品在温度下数小时或数天。使用开箱即用的应用程序, 您可以将样品留在培养箱中, 并在需要时检查其荧光、SLS 和 DLS, 而无需在整个实验期间占用仪器。毕竟, 分析方法应该是稳定性测试中最简单的部分。

精氨酸通常添加到蛋白质配方中以降低粘度。然而, 它具有离液性质——它限制聚集但驱动蛋白质展开⁵。在 62 °C 下保持时, 含有精氨酸的牛 IgG 的荧光变化比不含精氨酸的蛋白质更快 (图 9A)。在这些样品中, SLS 和 z 平均直径的增加在精氨酸存在下较慢 (图 9B)。这些结果表明, 精氨酸促进了蛋白质的展开但抑制了聚集。Aunty 的密封样品设计和多模式检测功能, 可实时监测蛋白质的异常行为, 适用于不同时间尺度的实验。

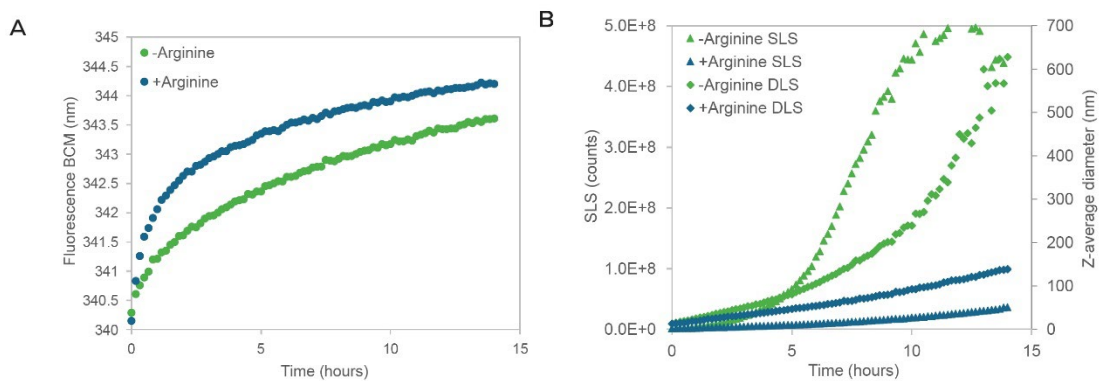


图 9: 牛 IgG 在 PBS 中配制为 1 mg/mL, 分别添加 0 (绿色) 或 500 mM (蓝色) 精氨酸。使用 Aunty 的“等温稳定性”应用 (默认设置) 将样品在 62 °C 下保持 14 小时, 通过荧光监测蛋白质展开 (A), 通过 SLS (三角) 和 DLS (菱形) 监测聚集 (B)。

结 论

Aunty 将全光谱荧光、SLS 和 DLS 与精确的温度控制和全石英 96 孔板结合，成为高通量稳定性表征的王者。突破稳定性筛选，每个孔板只需要 8 μL 样品，并在实验的每一分钟检测密封孔中的 96 个样品。灵活的检测方法跟踪蛋白质的熔解、聚集、胶体稳定性、粒径和多分散性。对于病毒载体，Aunty 还可以跟踪基因组释放。这样，您可以做出正确的决策，以优化生物制剂的构建体、配方、偶联或修饰的稳定性。

参考文献

1. Biophysical Techniques for Characterizing the Higher Order Structure and Interactions of Monoclonal Antibodies. Y Gokarn, et al. In: Schiel JE, Davis DL, Borisov OV, eds. ACS Symposium Series. Vol 1201. Washington, DC: American Chemical Society; 2015:285–327.
2. Weak interactions govern the viscosity of concentrated antibody solutions: High-throughput analysis using the diffusion interaction parameter. BD Connolly, et al. Biophysical Journal. 2012; 103(1):69–78.
3. Colloidal Behavior of Proteins: Effects of the Second Virial Coefficient on Solubility, Crystallization and Aggregation of Proteins in Aqueous Solution. W Wilson, et al. Current Pharmaceutical Biotechnology. 2006; 6(6):427–436.
4. Reexamining protein–protein and protein–solvent interactions from Kirkwood–Buff analysis of light scattering in multi–component solutions. MA Blanco, et al. Journal of Chemical Physics. 2011; 134(22).
5. 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.

6. Recombinant AAV genome size effect on viral vector production, purification, and thermostability. N Ibreljic, et al. Molecular Therapy. Methods & Clinical Development. 2024; 32(1):101188.



Unchained Labs
4747 Willow Road
Pleasanton, CA 94588
Phone: 1.925.587.9800
Toll-free: 1.800.815.6384
Email: info@unchainedlabs.com

© 2025 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo and Aunty 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