

借助 Big Tuna 和 Stunner 加速并简化配方筛选流程

简介

生物制剂的可开发性研究与配方筛选工作既耗费人力，又十分耗时。缓冲液交换是其中的难题之一，传统方法不仅容易出现结果不一致的情况，在处理大量样品时更是难以有效管理。在许多工作流程中，为测定蛋白质浓度、评估样品质量与稳定性，往往需要使用多种工具，这不仅会消耗更多时间，还需要更多样品。而那些对样品体积要求过高的分析工具，更是让缓冲液交换的问题雪上加霜。想要摆脱这一困境，最佳途径是采用多功能、高通量且无需手动操作的技术，以此加速并简化配方及可开发性的筛选流程。

自动化缓冲液交换系统能实现更标准化的样品处理，达成手动方法难以企及的过程控制水平。Big Tuna 是一款免手动操作、样品用量少且高通量的缓冲液交换系统，尤其适用于生物分子（图 1A）。使用 Big Tuna 进行缓冲液交换，可根据需求灵活定制，适应性强。依据实验板类型的不同，一次实验最多能对 96 种或 24 种不同的蛋白质及配方进行缓冲液交换。Unfilter 96 孔板每个孔可处理 100–450 μL 的样品，最多能处理 96 个；Unfilter 24 孔板每个孔可处理 0.45–8 mL 的样品，共计 24 个。每种实验板都配备多种截留分子量（MWCO）的膜过滤器及材料，无论面对何种实验需求，都能轻松找到合适的选择。

Big Tuna 采用基于压力的超滤/渗滤（UF/DF）技术，在去除缓冲液的同时，能轻柔地混合样品，有效避免蛋白质在膜表面聚集。相比死端过滤方法，这种方式能让液体流动更均匀、速度更快。Big Tuna 实现了缓冲液交换过程的自动化，

大大减少了人工操作时间，提高了工作通量。此外，交换完成后，它还能对样品进行缓冲液的添加或去除操作，将样品浓度调整到目标值。

紫外/可见吸收光谱法是测定溶液中蛋白质浓度，以及评估缓冲液交换等实验过程回收率的经典方法。动态光散射（DLS）则是无损检测蛋白质是否发生聚集的重要手段。Stunner 将紫外/可见吸收光谱法与动态光散射技术巧妙结合，仅需 2 μL 样品，就能在一台仪器上同时测定蛋白质的浓度、大小和多分散性（图 1B），让样品定量分析和质量检测提升到新高度。与 Big Tuna 一样，Stunner 也采用 96 孔板设计，这使得自动化和高通量筛选变得轻松简单。每个样品的检测仅需约一分钟，且无需进行样品稀释、使用标准品或添加染色剂。

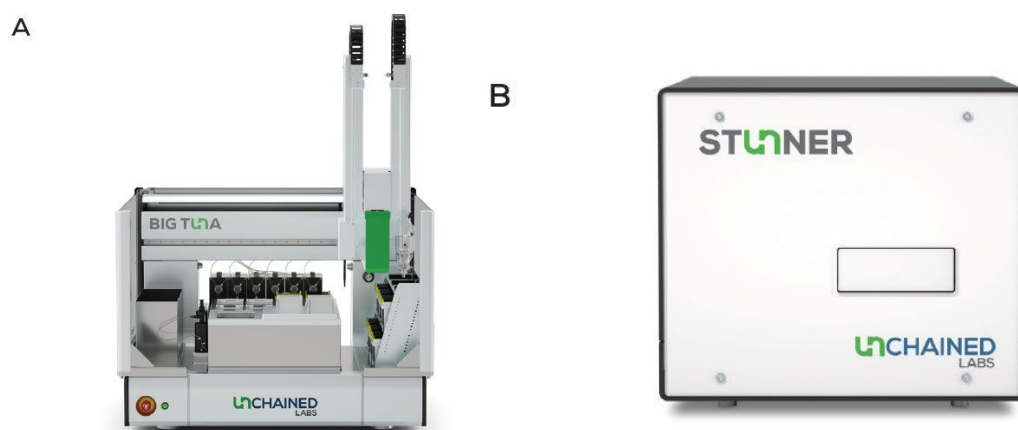


图 1：Big Tuna (A) 可实现对多达 96 个独特样品的缓冲液交换自动化操作。Stunner (B) 是一款能整合紫外/可见（UV/Vis）和动态光散射（DLS）数据的板式系统，并且只需要 2 μL 的样品。

动态光散射与紫外/可见吸收光谱法相结合，是开展稳定性研究的理想起点。通过对蛋白质进行系列稀释后进行动态光散射检测，可以得到扩散相互作用系数 (k_D)。在进行动态光散射检测时，还能同步收集静态光散射（SLS）数据，进而得到第二维里系数 (B_{22})。这些参数对于判断蛋白质的聚集倾向十分关键，较大的正值意味着随着蛋白质浓度升高，该蛋白质在配方中发生聚集的可能性较低。 B_{22}

和 k_D 可在早期研发阶段的典型浓度 (约 10mg/mL) 下进行测定, 它们能有效预测蛋白质在从研发到生产的过程中, 可能表现出的行为特性。如此一来, 便能在潜在问题恶化之前及时察觉。Stunner 能在同一样品检测中同时获取这两个参数, 让测量过程变得快速又便捷。

在本应用说明中, 我们借助 Big Tuna, 在含有 0.001% 聚山梨酯 80 (PS80) 的 10mM 组氨酸 (pH6.0) 缓冲液中, 对 4 种单克隆抗体 (mAbs) 和 4 种常见的辅料组合进行筛选。Big Tuna 负责监测缓冲液交换过程, 确保溶液不会干涸, 所有样品都能达到预期的最终浓度和交换目标。之后, 利用 Stunner 测定每种配方的回收率、样品粒径大小、多分散性指数、 B_{22} 和 k_D 。

方 法

将浓度为 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, 随后在 14,000g 的离心力下进行离心操作。离心后的上清液需通过 0.1 μ m 的过滤器过滤。取 400 μ L 经过处理的每种抗体, 加入到截留分子量为 10 kDa 的再生纤维素 Unfilter 96 孔板中, 运用 Big Tuna, 在三个复孔内, 将其缓冲液置换为含有 0.001% 聚山梨酯 80 (PS80) 的 10 mM 组氨酸缓冲液 (pH6), 并分别添加 0.9% 氯化钠、80 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 精氨酸, 或者 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸的组合 (见图 2)。完成缓冲液交换后, 将样品浓缩至 100 mg/mL。另外, 取初始浓度为 8.5 mg/mL 的 200 μ L 曲妥珠单抗, 在单孔中进行同样的缓冲液交换操作, 之后浓缩至 10 mg/mL。所有缓冲液交换和浓缩步骤均采用蛋白质溶液浓度在 0.5–50 mg/mL 区间的默认参数。使用 Stunner 并以缓冲液作为空白对照, 对样品的初始和最终蛋白质浓度、大小以及多分散指数 (PDI) 进行四次重复检测。

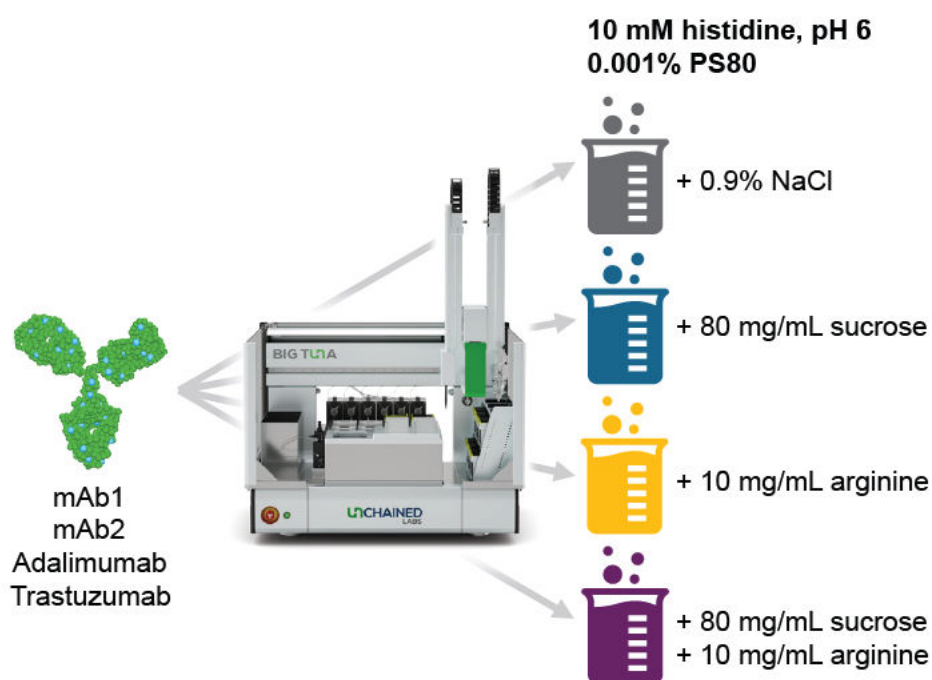


图 2：4 种单克隆抗体（mAb1、mAb2、阿达木单抗和曲妥珠单抗）被交换至 10 mM 组氨酸缓冲液（pH 6，含 0.001% PS80）以及 0.9% NaCl、80 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 精氨酸或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸的组合中。

稀释制备得到所有 4 种抗体在 4 种配方中的 2–10 mg/mL 稀释系列样品。利用 Stunner 上的 B₂₂ & k₀ 应用程序, 对每个浓度的 2 μ L 样品进行四次重复检测。检测时采用默认的动态光散射采集设置, 针对 mAb1、mAb2、阿达木单抗和曲妥珠单抗, 分别设置 E1% 值为 14.7、14.4、16.4 和 15。

结 果

手动进行缓冲液交换和浓缩操作, 不仅耗费大量人力时间, 回收率往往也不理想。即便在本次仅涉及 4 种抗体和 4 种辅料的小规模筛选实验中, 这一问题依然存在。在本次筛选评估的 16 种配方里, Big Tuna 的缓冲液交换技术使得其中 15 种配方的回收率超过了 90% (图 3A)。不同样本的回收率并没有呈现出明显规律, 但所有样本均达到了预定的交换率和浓度目标。不过, 回收率只是衡量实验

效果的一个方面。在单克隆抗体制备的每一个环节，质量与数量同等重要。

动态光散射是一种快速判断特定实验过程或缓冲液是否会引发单克隆抗体聚集的有效方法。正常情况下，未发生聚集的单克隆抗体，其流体动力学直径在 10–12 nm 之间，多分散指数 (PDI) 不超过 0.1。Stunner 将动态光散射与紫外/可见定量技术相结合，能够快速评估任何配方中蛋白质的整体质量。实验发现，在含氯化钠和单独含精氨酸配方中的所有测试单克隆抗体，其直径和 PDI 都与单分散蛋白质的特征相符 (图 3B)。然而，在含蔗糖配方中的阿达木单抗，直径达到 71 nm，PDI 为 0.14，均超出了单分散单克隆抗体的正常范围。三次缓冲液交换实验均得到类似结果，这表明阿达木单抗在组氨酸与蔗糖的混合配方中发生了聚集现象。其他含蔗糖配方中的单克隆抗体，虽然 PDI 超过 0.1，但流体动力学直径仍处于未聚集蛋白质的预期范围。

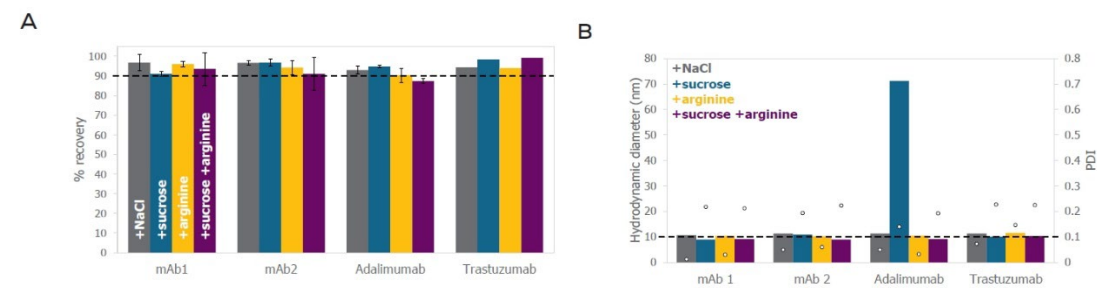


图 3：基于 Stunner 的初始和最终浓度测量 (3 个复孔)，每种单抗和配方组合的平均回收率 (A)，虚线表示 90%回收率接受标准。16 种单抗配方的流体力学直径 (柱状图，y 轴在左侧) 和 PDI (点图，y 轴在右侧) (B)，虚线表示 10 nm 直径和 0.1 PDI。

误差棒为 1 个标准差。

动态光散射还可用于样本的分布分析，借此观察溶液中不同的颗粒群体情况。通过这些强度分布数据，能够深入探究样本的 z 均粒径较大或 PDI 较高的原因。以 mAb1 为例，在含氯化钠和蔗糖的配方中，10 nm 处的峰对应未聚集的抗体，而

蔗糖配方中 0.8 nm 处的小峰，极有可能是由蔗糖本身导致的（图 4）^①。其他含蔗糖配方中的单克隆抗体，也呈现出类似的强度分布特征。总体而言，Big Tuna 进行的大部分缓冲液交换操作，都能成功制备出浓度符合要求且无明显聚集现象的单克隆抗体溶液。只要单克隆抗体与最终配方相容，Big Tuna 采用的正压超滤/渗滤和轻柔的轨道混合方式都能稳定运行。

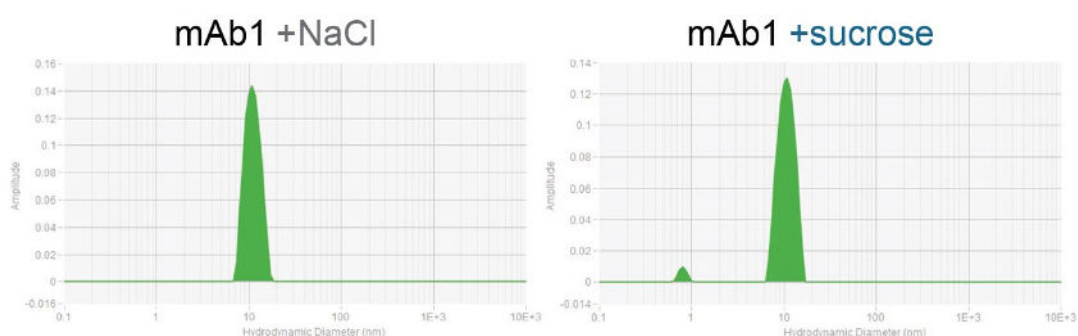


图 4：在 pH 值为 6 的 10 mM 组氨酸溶液中、含 0.001% 聚山梨酯 80 (PS80) 且分别添加 0.9% NaCl (左图) 或 80 mg/mL 蔗糖 (右图) 时，单克隆抗体 1 (mAb1) 的动态光散射 (DLS) 光强粒度分布情况。

当把相同配方中不同蛋白质浓度下的动态光散射数据整合分析时，会发现一些重要信息！这些数据可以反映出随着蛋白质浓度升高，其在配方中发生聚集的可能性大小。这对于从早期研究发现阶段的较低蛋白质浓度，过渡到生产和递送阶段更常见的较高浓度的研究，具有重要意义。有些蛋白质在低浓度下性质稳定，但在高浓度时容易聚集。因此，在早期的配方前筛选阶段进行此类测试，能够提前发现问题并加以解决，避免问题在后续环节恶化。

随着蛋白质浓度增加，分子间的吸引力会使蛋白质分子扩散速度变慢，而排斥力则会加快其扩散速度。相互吸引的蛋白质分子更容易聚集，反之则不易聚集^②。配方中的盐、糖和缓冲液等成分，对蛋白质分子间的相互作用有着显著影响。浓度与扩散之间的关系可以用 k_D 来表示， k_D 为正值时，表明分子间存在排斥力，

蛋白质聚集倾向较低；负值则表示情况相反。动态光散射能够测量分子扩散情况，而 Stunner 将动态光散射与基于紫外吸收的浓度测量技术相结合，为测定 k_D 提供了一种极为简便的方法。

蛋白质的 B_{22} （自相互作用系数）是衡量其在溶液中自缔合作用的热力学指标^③，通过光散射与浓度的线性回归（即德拜图）来确定。与 k_D 类似， B_{22} 的正值代表分子间存在排斥作用，负值则表示存在吸引作用。二者的主要区别在于测量方法， B_{22} 基于静态光散射， k_D 基于动态光散射。值得一提的是，Stunner 能够在同一实验中同时测定这两个参数。

在含有 0.001% PS80 和蔗糖的 10 mM 组氨酸（pH6）缓冲液中，mAb1 的浓度与扩散系数呈现正相关，在德拜图中也表现出正斜率（图 5）。而在其他测试配方中，斜率大多为负或接近零。这表明在含有蔗糖但不含氯化钠和精氨酸的配方中，mAb1 最不容易发生聚集，稳定性最佳。

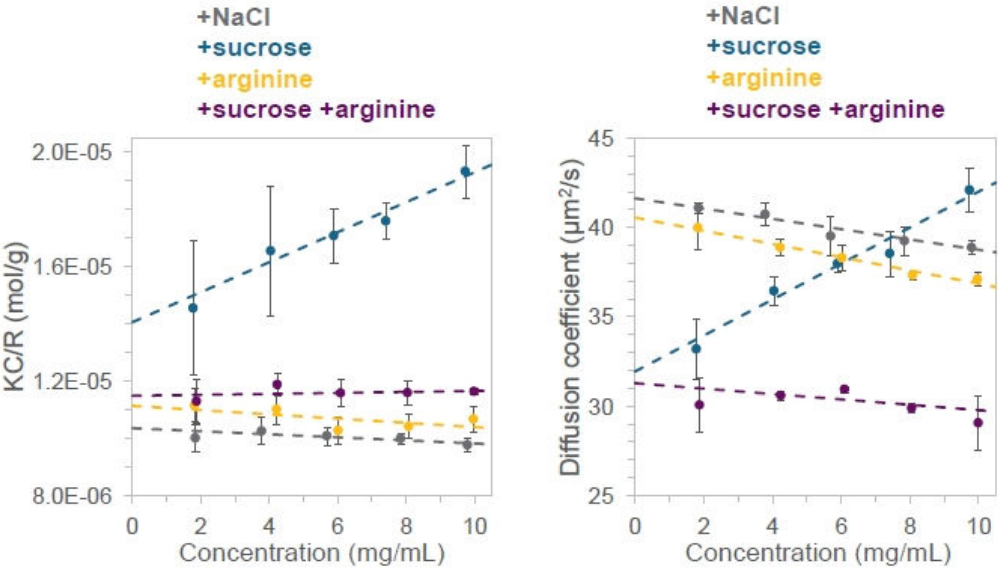


图 5：在 pH 值为 6 的 10 mM 组氨酸溶液中、含 0.001% 聚山梨酯 80 (PS80)且分别添加 0.9% NaCl、80 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 精氨酸，或 80 mg/mL 蔗糖与 10

mg/mL 精氨酸的情况下，单克隆抗体 1 (mAb1) 的德拜图 (左图) 以及扩散系数与浓度的关系图 (右图)。测量重复进行四次，并进行线性回归分析 (虚线所示)。误差棒表示 1 个标准差。

对其他单克隆抗体制剂的稀释系列进行筛选后发现，不同辅料组合对实验结果有着不同影响。mAb2 在蔗糖与精氨酸的组合配方中， B_{22} 和 k_D 值最高；曲妥珠单抗则在单独使用蔗糖的配方中达到最高值 (表 1)。阿达木单抗在所有测试配方中的 k_D 和 B_{22} 均为负值，这意味着在本次测试的辅料中，没有一种能够在较高蛋白质浓度下稳定阿达木单抗。基于胶体稳定性对蛋白质配方进行高效筛选，是降低研发风险、挑选出最佳候选配方的关键所在。

mAb	Excipients	B_{22} (mL x mol / g ²)	k_D (mL/g ²)
mAb1	+NaCl	-2.7e-5	-6.9
	+ sucrose	2.6e-4	32
	+arginine	-3.7e-5	-9.1
	+ sucrose + arginine	8.0e-6	-4.8
mAb2	+NaCl	-2.6e-5	-12
	+ sucrose	-3.3e-5	-18
	+arginine	9.0e-5	4.5
	+ sucrose + arginine	1.2e-4	6.4
Adalimumab	+NaCl	-2.9e-5	-14
	+ sucrose	n.d.	n.d.
	+arginine	-9.5e-6	-13.8
	+ sucrose + arginine	-2.3e-5	-8.6
Trastuzumab	+NaCl	2.3e-6	-5
	+ sucrose	3.0e-4	22
	+arginine	2.8e-5	-10.7
	+ sucrose + arginine	2.5e-5	-13

表 1：mAb1、mAb2、阿达木单抗和曲妥珠单抗在 10 mM 组氨酸 (pH 6，含 0.001% PS80) 以及 0.9% NaCl、80 mg/mL 蔗糖、10 mg/mL 精氨酸或 80 mg/mL 蔗糖和 10 mg/mL 精氨酸中的第二维里系数 (B_{22}) 和扩散相互作用参数

(k_D)。每种抗体的最大的，且为正数的 B_{22} 和 k_D 以绿色突出显示。

结 论

快速完成高通量配方筛选，有助于更快地确定具有最佳可开发性的生物制剂，并明确哪些缓冲液与辅料组合能最有效地稳定它们。使用 Big Tuna 进行自动化免手动缓冲液交换，科研人员能够从繁琐的样本制备工作中解放出来，将更多精力投入到更关键的研究工作中。Stunner 具备测定蛋白质浓度、评估缓冲液交换或其他实验过程回收率、检测聚集体以及分析聚集倾向等多种功能。将这些技术整合到同一工作流程中，大大简化了配方和候选药物的筛选过程。

参考文献

1. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. M Kaszuba, et al. Journal of Nanoparticle Research. 2008; 10(5):823–829.
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.



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, Stunner, Big Tuna 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