

文章编号: 1006-3080(2025)01-0042-08

DOI: 10.14135/j.cnki.1006-3080.20240226004

不同单克隆抗体聚集与断裂行为的多维分析

陆治锦¹, 文玺凯^{1,2}, 刘鲁杰¹, 王宜冰^{1,3}, 沈春雷², 伍维², 沈智勇², 赵黎明¹

(1. 华东理工大学生物工程学院, 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 上海臻格生物技术有限公司, 上海 201413; 3. 上海市细胞代谢光遗传学技术前沿科学研究基地, 上海 200237)

摘要:采用尺寸排阻色谱法和分析型超速离心法对 ZG154 和 ZG187 抗体的分子大小变异体进行正交分析, 系统解析了造成聚集和断裂的因素。结果表明, 40 °C 时 ZG154 样品在天冬酰胺 329 位点发生脱酰胺修饰的比例增加了 30.7%, 通过增加分子间相互作用, 相关修饰加速了聚集, 并导致断裂的发生; 40 °C 时 ZG187 样品在蛋氨酸 430 位点发生氧化修饰的比例增加了 36.9%, 相关修饰降低了蛋白的稳定性, 导致了断裂的发生。研究结果为上述药物研发和生产过程中的聚集与断裂问题提供了检测和分析方法。

关键词:单克隆抗体; 聚集; 断裂; 脱酰胺; 氧化

中图分类号:Q511

文献标志码:A

聚集和断裂被认为是评估蛋白类药物纯度和完整性的关键质量属性^[1-2], 它们会减弱蛋白质的生物活性, 并影响药代动力学、药效学特性和免疫原性^[3-5]。聚集和断裂是抗体药物中常见的现象, 许多因素会影响其聚集和断裂。因此, 对抗体药物的聚集和断裂行为进行检测和分析, 在抗体药物的开发、生产和储存过程中具有重要意义。

翻译后修饰 (Post-Translational Modifications, PTMs) 在蛋白质加工和成熟中起着关键作用, 它们可以改变蛋白质的物理和化学性质, 并影响蛋白质的空间构象、疏水性和稳定性^[6]。一些非理想的 PTMs, 如氧化和脱酰胺修饰, 在抗体药物的发酵、纯化、制备和储存过程中很容易发生, 其对产品的质量和功能产生很多负面影响^[7-8]。甲硫氨酸 (Met) 和色氨酸 (Trp) 残基的氧化会导致抗体药物结构完整性、构象稳定性、安全性的变化^[9]。研究表明, 单克隆抗体 (Monoclonal antibodies, mAbs) 的 Fc 区和互补决定区 (Complementarity Determining Region, CDR) 中 Met 或 Trp 残基的氧化会导致分子空间占用增加和稳定性下降, 从而引起聚集和断裂的发生^[10-11]。天冬

酰胺 (Asn) 的脱酰胺是生物制药生产和储存中最常见、最难控制的 PTMs 之一, 它会改变蛋白质的亲水性和表面电荷分布, 造成折叠结构的变化和疏水残基的暴露, 从而影响抗体的聚集行为^[12-13]。此外, CDR 的脱酰胺可能引起抗体-抗原相互作用, 导致免疫原性问题^[14]。

尺寸排阻色谱法 (Size Exclusion Chromatography, SEC) 为生物制药工业检测药物中聚体和碎片的常用方法, 其原理是根据分子大小和形状分离样品。尽管 SEC 广泛应用于抗体药物分子大小变异体的定量分析, 但它仍然存在部分局限性。首先, SEC 在分析过程中存在蛋白质和色谱柱之间的非特异性相互作用^[15]; 其次, SEC 分析过程中不可避免地涉及样品的稀释, 这可能会使弱可逆相互作用形成的聚体解离而形成单体^[16]; 最后, 较大的聚体也可能在色谱过程中被过滤掉^[17]。

目前美国食品药品监督管理局 (FDA) 要求使用正交方法来分析抗体药物的分子大小变异体, 用以弥补当前 SEC 的局限性, 从而对抗体药物进行更全面的分析^[18]。分析型超速离心法 (Analytical

收稿日期: 2024-02-26

基金项目: 上海细胞代谢光遗传学前沿科学中心(上海市教委)资助

作者简介: 陆治锦(1998—), 男, 河北秦皇岛人, 硕士生, 主要研究方向为生物分离工程。E-mail: 695175323@qq.com

通信联系人: 赵黎明, E-mail: zhaoliming@ecust.edu.cn

引用本文: 陆治锦, 文玺凯, 刘鲁杰, 等. 不同单克隆抗体聚集与断裂行为的多维分析[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2025, 51(1): 42-49.

Citation: LU Zhijin, WEN Xikai, LIU Lujie, et al. Multi-Tiered Analysis of Aggregation and Fragmentation Behavior of Different Monoclonal Antibodies[J]. Journal of East China University of Science and Technology, 2025, 51(1): 42-49.

ultracentrifugation, AUC)是分析溶液中大分子的一种通用方法,它广泛用于抗体药物聚集的表征分析^[19]、制剂筛选^[20]、批次一致性分析^[21]、可逆相互作用分析^[22]以及小分子和治疗蛋白筛选^[23]等。沉降速率(Sedimentation Velocity, SV)模式在高离心力场下测量样品的不同SV来确定样品的组成,基于样品中不同组分的分子质量和形状差异,可以形成一个独特的边界,并以特有的速度沉降,它可以在不受溶剂或基质干扰的条件下测定蛋白质的分子量、纯度、聚集状态和分子相互作用,以获得最接近自然条件的样品组成^[24-25]。总之,AUC中SV分析模式(AUC-SV)在表征抗体药物方面比SEC具有显著优势。

本文旨在通过SEC、AUC的联用,对两种处于研发阶段的新型mAbs(ZG154和ZG187)在加速稳定性实验(40℃)中产生的聚集与断裂现象进行正交检测分析,并且利用液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)、圆二色光谱(Circular Dichroism, CD)、动态光散射和示差扫描荧光技术等从多个方面探究造成ZG154和ZG187产生分子大小变异体的原因。

1 实验部分

1.1 实验原料

本研究使用的ZG154和ZG187抗体属于IgG1类,由上海臻格生物技术有限公司提供,样品通过标准色谱过程进行纯化,在40℃的培养箱中避光放置。氯化钠(NaCl)、二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、国药集团化学试剂有限公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘代乙酰胺(IAM)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、盐酸胍、尿素,美国Sigma-aldrich公司;胰蛋白酶(Trypsin),普洛麦格生物技术有限公司;乙腈(ACN)、超纯水和甲酸(FA),美国赛默飞世尔科技公司。所有试剂均为分析纯,未经纯化直接使用。

1.2 实验方法

1.2.1 SEC测定分子大小变异体纯度 采用Agilent 1260型液相色谱仪(美国安捷伦科技公司)进行分析:样品用流动相稀释至2 mg/mL后进样,进样体积为30 μL ,使用TSK gel G3000SWXL凝胶色谱柱(7.8 mm \times 300 mm \times 5 μm);流动相为50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, pH 7.0;流速为0.5 mL/min,等度洗脱,洗脱时间为35 min,柱温箱温度为25℃,紫外检测波长为280 nm。

1.2.2 AUC测定分子大小变异体纯度 对样品ZG154和ZG187(质量浓度2 mg/mL)进行SV分析。在20℃下平衡2 h后,使用An-60 Ti型转子在Optima AUC

型离心机(美国贝克曼库尔特有限公司)中以40 000 r/min和20℃条件下分析。吸收光学系统在280 nm的波长条件下以120 s的间隔扫描260次。数据分析使用软件SEDFIT 15.01b,分布模型使用Continuous c(s),分析置信水平(F-ratio)为0.68。ZG154的溶剂密度设定为1.0097 g/mL,溶剂黏度为1.069 mPa·s;ZG187的溶剂密度为1.0287 g/mL,溶液黏度为1.256 mPa·s;SEC流动相密度为1.0166 g/mL,黏度为1.067 mPa·s。

1.2.3 蛋白质PTMs测定方法 取样品500 μg ,加入变性缓冲液(8 mol/L盐酸胍,250 mmol/L Tris, pH 7.5 \pm 0.2)188 μL 、500 mmol/L DTT 8 μL ,加超纯水使体积至250 μL ,混匀,37℃水浴30 min。待水浴完成后在样品中加入500 mmol/L IAM 25 μL 进行烷基化,混匀,室温避光反应30 min。随后使用NAP-5柱对样品进行脱盐处理。取NAP-5柱收集液100 μL 加入Trypsin酶(0.5 mg/mL)8 μL ,吹打混匀,37℃水浴4 h。水浴完成后加入1 μL FA终止反应后上样分析。采用Q-Exactive型液质联用仪(美国赛默飞世尔科技公司)进行样品分析,使用电喷雾离子源(ESI)、静电场轨道离子阱质量分析器(Orbitrap),ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 色谱柱(186003687;1.7 μm ,2.1 \times 150 mm),流动相A为FA/ H_2O (FA体积分数为0.1%),流动相B为FA/ACN(FA体积分数0.1%)。采用梯度洗脱模式,90 min内流动相B从2%到40%,流速为0.3 mL/min,柱温为60℃。在正离子模式下分析样品,并使用BioPharma Finder 4.1进行数据分析。

1.2.4 蛋白质二级与三级结构测定方法 采用ChirascanTM VX型圆二色光谱仪(英国应用光物理有限公司)在室温下对样品的圆二色性进行测定:将样品稀释到0.2 mg/mL后加入到0.5 mm比色皿中进行二级结构测定,将样品稀释到5 mg/mL后加入到1.0 mm比色皿中进行三级结构检测;远紫外光谱测量范围为190~260 nm,近紫外光谱测量范围为250~340 nm,步进为1 nm,设置单个数据点采样时间为1.0 s。溶剂圆二色光谱(CD)信号和样品CD信号重复测定3次取平均值,减去溶剂CD信号后得到最终结果。

1.2.5 蛋白质熔融温度检测方法 采用Prometheus NT.Plex DSF型蛋白稳定性分析仪(德国诺坦普科技有限公司)对样品熔解温度(T_m)进行测定:使用毛细管吸取样品至完全充盈,且毛细管中部区域无明显气泡,调节荧光激发强度使样品的最高峰值在15 000处;起始温度为20℃,终止温度为95℃,加热速率为1.0℃/min;通过分析荧光相对于温度的一阶导数来确定蛋白质的 T_m 。

1.2.6 蛋白质扩散相互作用系数检测方法 使用制剂缓冲液将样品分别稀释到 5、4、3、2、1 mg/mL, 在 11000 r/min 下离心 5 min, 离心后将样品加入 384 孔板中, 每个微孔中加入样品 40 μ L。使用 Plate Reader III 型高通量动态光散射仪(美国怀雅特技术公司)对样品扩散系数进行测定, 25 $^{\circ}$ C 时在每秒产生约 1×10^6 次计数的激光功率下测量 10 s。每个样品平行测定 3 次, 并取平均值, 根据公式(1), 计算出样品的扩散相互作用系数。

$$D_M = D_0(1 + k_D\rho) \quad (1)$$

式中: D_0 是自扩散系数, k_D 是扩散相互作用系数 (mL/mg), ρ 是样品质量浓度 (mg/mL)。

2 结果与讨论

2.1 SEC 分析样品聚集与断裂行为

40 $^{\circ}$ C 时样品聚体和碎片含量变化如图 1 所示。由图 1(a) 可得, ZG154 样品中高分子量物质 (HMW) 随放置时间的延长明显增加, 由峰面积计算可得, ZG154 样品在初始时刻 (ZG154-T0)、40 $^{\circ}$ C 放置一个月后 (ZG154-40 $^{\circ}$ C-1M) 和 40 $^{\circ}$ C 放置两个月后 (ZG154-40 $^{\circ}$ C-2M) 的聚体含量分别为 0.4% (质量分数, 下同)、1.1% 和 2.2%, 低分子量物质 (LMW) 含量分别为 0.1%、3.4% 和 5.2%。值得注意的是, ZG154 样品的聚集与断裂行为在 40 $^{\circ}$ C 放置下同时发生。由图 1(b) 可得, 在 40 $^{\circ}$ C 放置一个月后 ZG187 样品 (ZG187-40 $^{\circ}$ C-1M) 的 HMW 含量变化可忽略不计 (ZG187-T0 样品为 1.3%, ZG187-40 $^{\circ}$ C-1M 样品为 1.4%)。然而, 在相同的持续时间内, LMW 含量却从 0.2% 增加到 2.1%, 表明 ZG187 分子在 40 $^{\circ}$ C 放置下只发生断裂行为。上述结果发现了两种 mAbs 对 40 $^{\circ}$ C 环境的反应存在差异。因此, AUC-SV 的后续分析对

于更全面了解蛋白的聚集和断裂行为至关重要。

2.2 AUC-SV 分析样品的聚集与断裂行为

相较于 SEC, AUC-SV 更有助于对样品的原生状态进行表征, 测试结果如图 2 所示。由图可得, ZG154 样品在 40 $^{\circ}$ C 放置时不仅聚体含量明显增加, 同时聚体沉降系数逐渐降低, 特别是在 40 $^{\circ}$ C 放置过程中二聚体沉降系数从 9.969 S 下降到 9.140 S, 最终达到 8.675 S (图 2(a)、(b)、(c)), 这可能是由于 ZG154 分子的聚集行为发生了变化, 形成聚体的结构不同导致的^[26]。ZG187 样品在 40 $^{\circ}$ C 下放置一个月后, ZG187 样品的聚体含量几乎没有变化, 而 ZG187-40 $^{\circ}$ C-1M 样品的 AUC-SV 分析未检测到任何片段 (图 2(e))。将 ZG187 样品在 SEC 流动相中测试, 如图 2(f) 和 2(g) 所示, 发现 ZG187 样品在 SEC 流动相中的沉降系数分布显著变宽, 同时 ZG187-40 $^{\circ}$ C-1M 样品中出现了相关碎片峰 (图 2(g))。这一现象是由于 SEC 流动相的高盐浓度会导致蛋白的构象发生变化^[15], 从而影响 ZG187 分子的沉降行为和碎片之间的非共价相互作用。此外, 通过 AUC-SV 测量的 ZG154 和 ZG187 的聚体含量都超过了 SEC 法测定的结果, 该现象是由于 SEC 分析中使用的流动相会在色谱过程中引起样品稀释而导致聚体的解离^[18]。

2.3 蛋白翻译后修饰变化

蛋白质的 PTMs 变化通常是导致其发生聚集和断裂行为的重要因素, 为了更深入地探究 ZG154 和 ZG187 抗体在 40 $^{\circ}$ C 放置过程中表现出不同聚集和断裂行为的原因, 对其 PTMs 进行了分析。如表 1 所示, 在 40 $^{\circ}$ C 放置 1 个月后, ZG154 分子重链 (Heavy Chain, HC) 上 Asn 329 位点发生脱酰胺修饰的比例仅增加了 17.6%, 发生相对较少的脱酰胺修饰可能不足以说明其对 ZG154 样品聚集与断裂行为的影响, 因此对 ZG154 样品进行了为期 2 个月的加速稳定性实

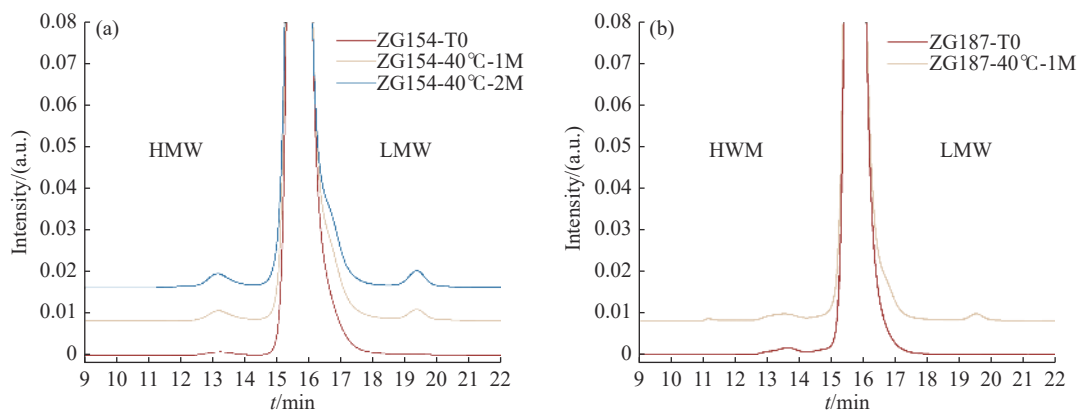


图 1 SEC 检测 ZG154 样品 (a) 和 ZG187 样品 (b) 聚体和碎片含量变化

Fig. 1 Changes in aggregation and fragmentation content of samples ZG154 (a) and ZG187 (b) detected by SEC

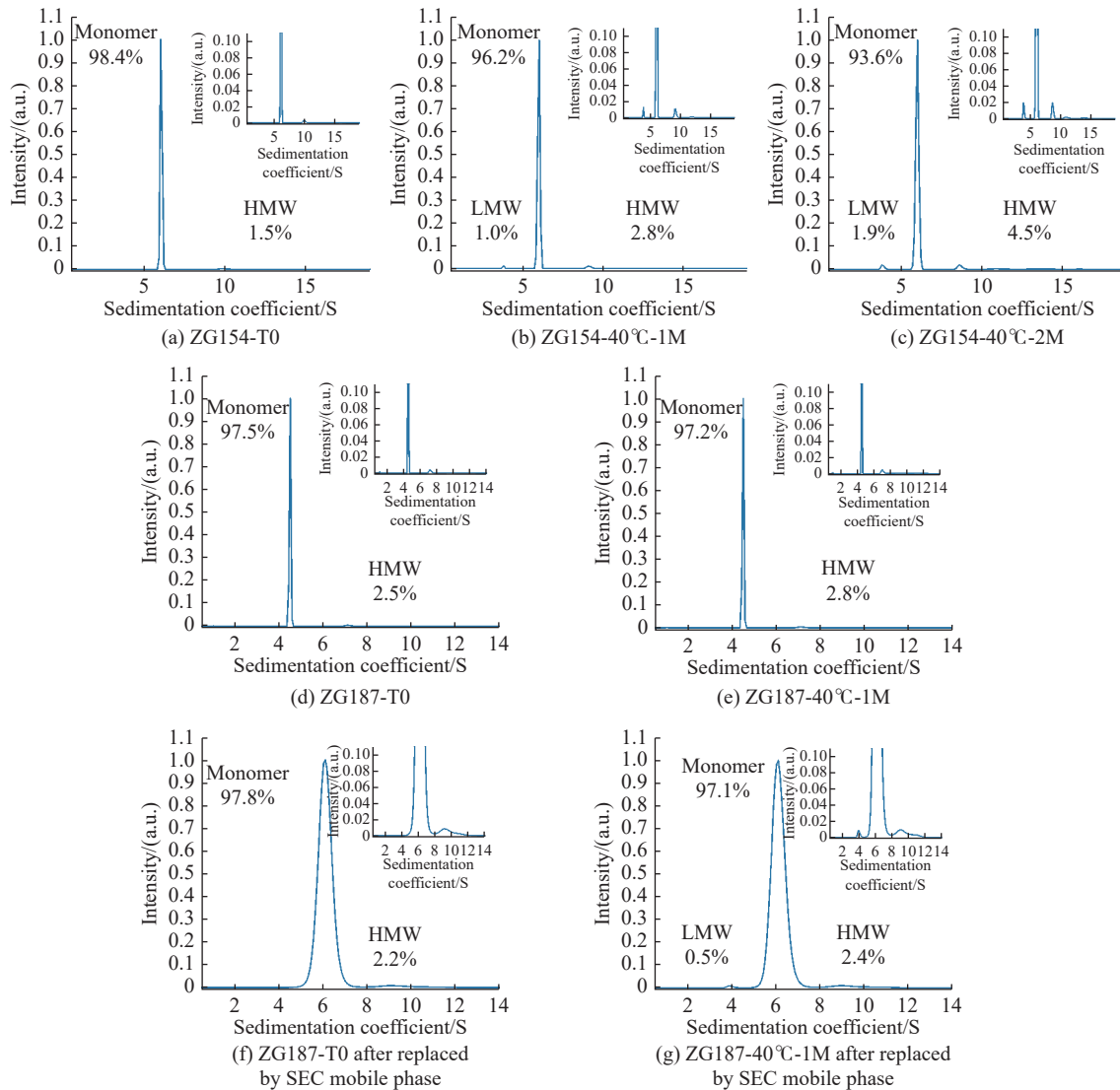


图2 AUC-SV 检测样品聚体和碎片含量分布

Fig. 2 AUC-SV detection of aggregation and fragmentation content distribution in samples

验。结果表明,在 40 °C 放置 2 个月后,HC 上 Asn 329 位点发生脱酰胺修饰的比例增加了 30.7%。此外,在 40 °C 放置过程中 HC 上 Asn 388 和 Asn 393 位点发生脱酰胺的比例也有所增加,轻链(Light chain, LC)上天冬氨酸(Asp) 155 位点以及 HC 上 Asp 109 和 284 位点也发生少量的异构化修饰。脱酰胺会引起蛋白质的疏水性变化,许多发生脱酰胺的抗体药物更容易产生聚集行为^[13,27]。同时 ZG154 分子的脱酰胺是在接近中性的条件下发生(样品缓冲液 pH 值为 6.8),该反应首先形成中间体琥珀酰亚胺,随后迅速水解为 Asp 和异天冬氨酸(iso-Asp)^[28],琥珀酰亚胺亲水性低于 Asn 和 Asp,从而容易引发蛋白质聚集。此外,琥珀酰亚胺的存在也会导致蛋白质断裂^[29]。然而对于 ZG187 样品的 PTMs 变化(表 2),在 40 °C 放置一个月后,ZG187 分子 HC 上 Met 430 位点发生氧化修饰的比例增加了 36.9%,Met 430 位点

氧化修饰比例的大量增加足以满足接下来探究其对 ZG187 样品断裂行为的影响。此外,HC 上 Met 81 位点也发生了少量氧化修饰。Met 氧化通常会导 mAbs 的构象稳定性发生变化,许多研究均表明 Met 氧化对 mAbs 聚集与断裂有显著影响,造成抗体分子间形成共价结合以及邻近修饰位点的抗体断裂,但其对不同 mAbs 的影响具有特异性^[12,30]。

2.4 不同修饰对蛋白二级与三级结构的影响

蛋白质的二级与三级结构的变化通常会导致蛋白质的疏水区域暴露,造成蛋白质聚集行为的发生。CD 通过蛋白质对左右圆偏振光的吸收差来分析溶液中蛋白质的二级与三级结构。有研究表明,Asn 脱酰胺的主要产物 iso-Asp,可能导致蛋白质局部结构更灵活,从而暴露埋藏在蛋白质中的疏水残基,致使蛋白质的三级结构发生轻微变化^[27]。而氧化修饰通常会影响 mAbs 的 CH₂ 结构域的构象,从而改

表 1 ZG154 分子翻译后修饰位点信息

Table 1 ZG154 post translational modifications site information

Protein	Modification	Peptide	w(Peptide)/%		
			ZG154-T0	ZG154-40 °C-1M	ZG154-40 °C-2M
LC	D155+Isomerization	A154-K160	0	1.4	2.6
HC	W47+Oxidation	E1-R59	0	1.5	2.3
HC	D109+Isomerization	L99-K125	0	2.2	3.7
HC	M256+Oxidation	D253-R259	0.6	1.2	1.7
HC	D284+Isomerization	F279-K292	0	2.1	4.6
HC	N301+A2G0	E297-R305	2.0	2.3	2.2
HC	N301+A2G0F	E297-R305	81.5	81.0	81.0
HC	N301+A2G1F	E297-R305	16.5	16.7	16.8
HC	N319+Deamidation	V306-K321	0	0.9	2.1
HC	N319+Deamidation Succinimide N	V306-K321	3.0	2.5	2.3
HC	N329+Deamidation	V327-K330	1.2	18.8	31.9
HC	N388+Deamidation	G375-K396	0	3.2	5.9
HC	N393+Deamidation	G375-K396	0	7.2	12.8

N—Asn; D—Asp; M—Met; W—Trp

变 mAbs 的二级与三级结构,但其取决于蛋白质的糖基化状态^[31]。相较于因发生脱酰胺或氧化修饰导致二级与三级结构的变化的抗体药物,在本研究中 40 °C 条件下放置前后的 ZG154 和 ZG187 样品的 CD 图谱没有发生明显变化(图 3),说明 ZG154 分子 Asn 329 位点的脱酰胺修饰和 ZG187 分子 Met 430 位点发生的氧化修饰没有导致分子二级和三级结构的变化。ZG154 和 ZG187 分子的 N-糖基化修饰在 40 °C 放置过程中也基本没有发生变化,其对蛋白质构象的稳定维持起着重要的作用,表明 ZG154 和 ZG187 分子在 40 °C 放置中发生的聚集与断裂行为不是由于蛋白二级和三级结构变化引起的。

2.5 不同修饰对蛋白稳定性的影响

T_m 是衡量蛋白质热稳定性的一个重要指标, mAbs 的不同结构域对应不同的 T_m , 一般 T_m 值越高, 蛋白质稳定性越好。脱酰胺和氧化修饰可能通过破坏蛋白质折叠稳定性来加速蛋白质聚集和断裂^[14,27]。结果表明, 在 40 °C 放置后, ZG154 分子的各个结构域 T_m 值基本没有发生变化(图 4(a)), 然而 ZG187 分子的 T_{m1} 却显著下降(ZG187-T0 样品 T_{m1} 为 66.3 °C, ZG187-40 °C-1M 样品 T_{m1} 为 58.6 °C), T_{m2} 未发生明显变化。这些结果表明 ZG154 分子在 40 °C 放置时发生的聚集和断裂行为不取决于结构域稳定性的变化, 进一步证明其断裂行为的发生与琥珀酰亚胺的形成有关。相反, ZG187 分子在 Met 430 位点发生的

表 2 ZG187 分子翻译后修饰位点信息

Table 2 ZG187 post translational modifications site information

Protein	Modification	Peptide	w(Peptide)/%	
			ZG187-T0	ZG187-40 °C-1M
HC	M34+Oxidation	A24-R38	1.4	3.1
HC	N55+Deamidation	A53-K59	0	5.0
HC	M81+Oxidation	D73-R87	0	8.6
HC	D282+Deamidation Succinimide D	F277-K290	0.8	1.4
HC	N299+A1G0F	E295-R303	14.5	14.1
HC	N299+A2G0F	E295-R303	74.7	75.1
HC	N299+A2G1F	E295-R303	10.8	10.8
HC	N327+ Deamidation Succinimide N	C323-K328	0	3.2
HC	M430+Oxidation	W419-K441	1.1	38.0

M—Met; N—Asn; D—Asp

氧化修饰会显著降低 ZG187 分子单个结构域的稳定性, 造成 ZG187 分子断裂行为的发生。

2.6 不同修饰对蛋白分子间相互作用的影响

k_D 是描述溶液中溶质分子之间相互作用力的一个度量, 蛋白质的聚集行为通常是由于蛋白质分子间相互吸引的作用所引起的。如图 5 所示, 根据式 (1) 计算出 ZG154-T0、ZG154-40 °C-1M 和 ZG154-40 °C-2M 样品的 k_D 值分别为 -1.34×10^{-2} 、 $-1.51 \times$

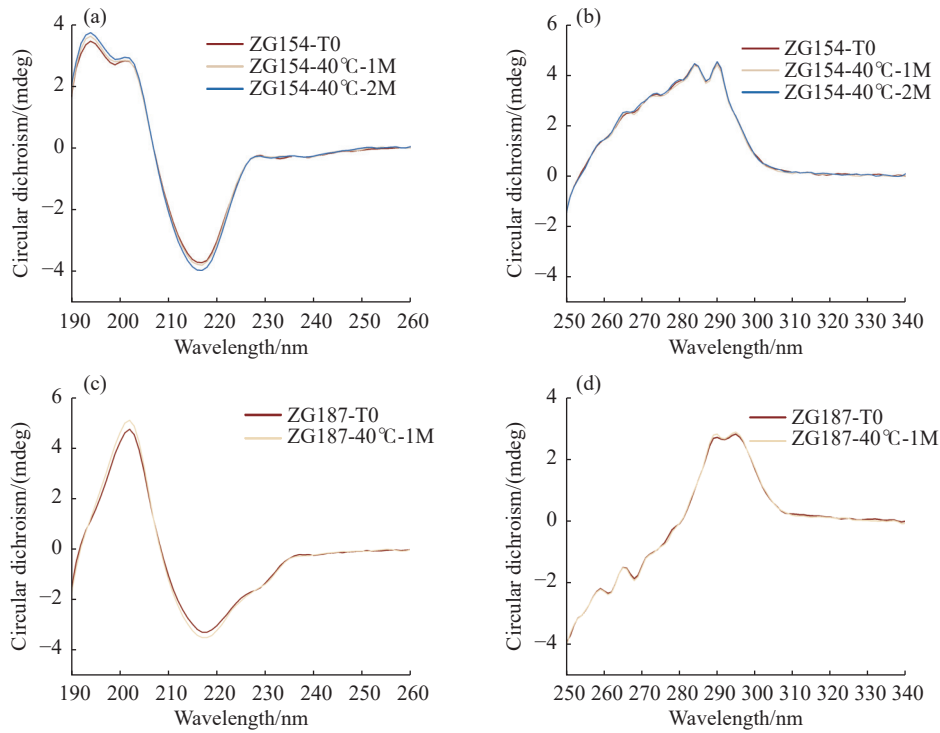


图 3 样品圆二色性光谱图: ZG154 样品远紫外区光谱 (a); ZG154 样品近紫外区光谱 (b); ZG187 样品远紫外区光谱 (c); ZG187 样品近紫外区光谱 (d)

Fig. 3 Sample circular dichroism spectrum: ZG154 sample far ultraviolet spectrum (a); ZG154 sample near ultraviolet spectrum (b); ZG187 sample far ultraviolet spectrum (c); ZG187 sample near ultraviolet spectrum (d)

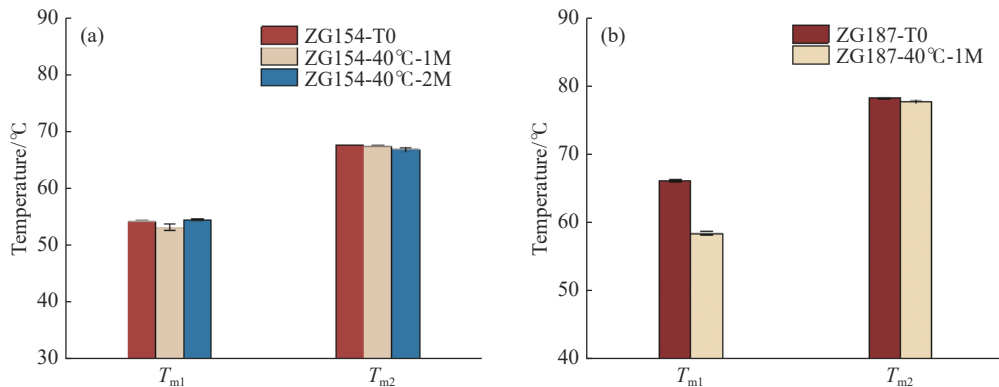


图 4 ZG154 样品 (a) 和 ZG187 样品 (b) 在 40 °C 放置过程中 T_m 值变化

Fig. 4 Changes in T_m values of ZG154 sample (a) and ZG187 sample (b) during storage at 40 °C

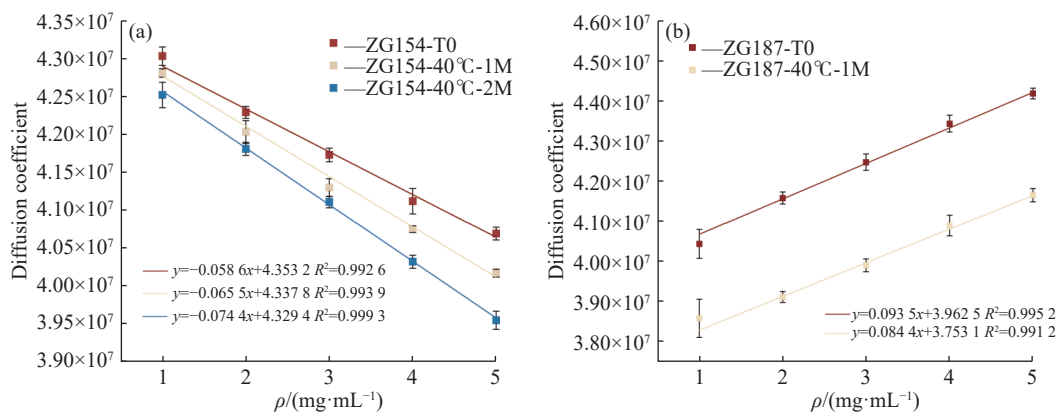


图 5 ZG154 样品 (a) 和 ZG187 样品 (b) 在 40 °C 放置过程中扩散系数变化

Fig. 5 Changes in diffusion coefficients of ZG154 sample (a) and ZG187 sample (b) during storage at 40 °C

10^{-2} mL/mg 和 -1.72×10^{-2} mL/mg; ZG187-T0 和 ZG187-40 °C-1M 样品的 k_D 值分别为 2.36×10^{-2} mL/mg 和 2.25×10^{-2} mL/mg。ZG154 样品的 k_D 值为负, 表明 ZG154 分子间存在相互吸引作用, 其在 40 °C 下放置发生的聚集行为与分子间相互吸引作用有关, 同时 Asn 329 位点的脱酰胺修饰通过化学残基的变化来改变蛋白质疏水性, 从而增加了蛋白分子间相互吸引作用, 加速了 ZG154 分子的聚集, 并且致使聚体结构变化, 造成 ZG154 样品在 40 °C 放置过程中二聚体沉降系数变小。然而, ZG187 分子的 k_D 值为正值, 并且在 Met 430 位点发生氧化修饰后, ZG187 分子的 k_D 仍显示出高度正值, 说明在 40 °C 放置过程中, ZG187 分子间总是表现出相互排斥的作用, 因此 ZG187 分子没有发生聚集行为。

3 结 论

ZG154 分子 HC 上 Asn 329 位点发生脱酰胺修饰的比例增加了 30.7%, 脱酰胺修饰增加了 ZG154 分子间相互吸引作用, 加速了分子聚集, 并因琥珀酰亚胺的产生而导致断裂的发生。而 ZG187 分子 HC 上 Met 430 位点发生氧化修饰的比例增加了 36.9%, 氧化修饰导致 ZG187 分子单个结构域稳定性下降, 使其发生了断裂行为, 但 ZG187 分子间始终呈现相互排斥作用, 因而未发生聚集行为。该研究为 ZG154 和 ZG187 抗体的进一步分子优化设计和制剂筛选提供了理论依据。

参考文献:

- [1] SCHUSTER J, MAHLER HC, JOERG S, *et al.* Analytical challenges assessing protein aggregation and fragmentation under physiologic conditions[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 110(9): 3103-3110.
- [2] NOWAK C, CHEUNG J K, DELLATORE S M, *et al.* Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide[J]. *MAbs*, 2017, 9(8): 1217-1230.
- [3] CHITI F, KELLY J W. Small molecule protein binding to correct cellular folding or stabilize the native state against misfolding and aggregation[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2022, 72: 267-278.
- [4] ROBERTS C J. Protein aggregation and its impact on product quality[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30: 211-217.
- [5] MOUSSA E M, PANCHAL J P, MOORTHY B S, *et al.* Immunogenicity of therapeutic protein aggregates[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(2): 417-430.
- [6] YAN B, VALLIERE-DOUGLASS J, BRADY L, *et al.* Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1164(1/2): 153-161.
- [7] VATSA S. In silico prediction of post-translational modifications in therapeutic antibodies[J]. *MAbs*, 2022, 14(1): 1-15.
- [8] VÁZQUEZ-REY M, LANG D A. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(7): 1494-1508.
- [9] GUPTA S, JISKOOT W, SCHÖNEICH C, *et al.* Oxidation and deamidation of monoclonal antibody products: Potential impact on stability, biological activity, and efficacy[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 111(4): 903-918.
- [10] LIU Y, LI H, YAN Z, *et al.* Discovery and reduction of tryptophan oxidation-induced IgG1 fragmentation in a polysorbate 80-dependent manner[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2022, 173: 45-53.
- [11] DASHIVETS T, STRACKE J, DENGL S, *et al.* Oxidation in the complementarity-determining regions differentially influences the properties of therapeutic antibodies[J]. *MAbs*, 2016, 8(8): 1525-1535.
- [12] ALAM M E, SLANEY T R, WU L, *et al.* Unique impacts of methionine oxidation, tryptophan oxidation, and asparagine deamidation on antibody stability and aggregation[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 109(1): 656-669.
- [13] ALAM M E, BARNETT G V, SLANEY T R, *et al.* Deamidation can compromise antibody colloidal stability and enhance aggregation in a pH-Dependent manner[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16(5): 1939-1949.
- [14] VLASAK J, BUSSAT M C, WANG S, *et al.* Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody[J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 392(2): 145-154.
- [15] VENTOURI I K, MALHEIRO D B A, VOETEN R L C, *et al.* Probing protein denaturation during size-exclusion chromatography using native mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(6): 4292-4300.
- [16] KAMBERI M, CHUNG P, DEVAS R, *et al.* Analysis of non-covalent aggregation of synthetic hPTH (1-34) by size-exclusion chromatography and the importance of suppression of non-specific interactions for a precise quantitation[J]. *Journal of Chromatography B*, 2004, 810(1): 151-155.
- [17] ENGELSMAN J D, GARIDEL P, SMULDERS R, *et al.* Strategies for the assessment of protein aggregates in pharmaceutical biotech product development[J]. *Pharmaceutical Research*, 2011, 28(4): 920-933.
- [18] BERKOWITZ S A, ENGEN J R, MAZZEO J R, *et al.* Analytical tools for characterizing biopharmaceuticals and the implications for biosimilars[J]. *Nature reviews Drug discovery*, 2012, 11(7): 527-540.
- [19] BERKOWITZ S A. Role of analytical ultracentrifugation in assessing the aggregation of protein biopharmaceuticals[J]. *The AAPS Journal*, 2006, 8(3): E590-E605.
- [20] KRAYUKHINA E, NODA M, ISHII K, *et al.* Analytical ultracentrifugation with fluorescence detection system reveals differences in complex formation between recom-

- binant human TNF and different biological TNF antagonists in various environments[J]. *MABs*, 2017, 9(4): 664-679.
- [21] LIU J, ERIS T, LI C, *et al.* Assessing analytical similarity of proposed amgen biosimilar ABP 501 to adalimumab[J]. *BioDrugs*, 2016, 30(4): 321-338.
- [22] PHILO J S, SYDOR W, ARAKAWA T. The glucagon-like peptide 2 analog teduglutide reversibly associates to form pentamers[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 109(1): 775-784.
- [23] ARAKAWA T, KUROSAWA Y, STORMS M, *et al.* Biophysical characterization of a model antibody drug conjugate[J]. *Drug Discoveries & Therapeutics*, 2016, 10(4): 211-217.
- [24] ZHAO H, BRAUTIGAM C A, GHIRLANDO R, *et al.* Overview of current methods in sedimentation velocity and sedimentation equilibrium analytical ultracentrifugation[J]. *Current Protocols in Protein Science*, 2013, 71(1): 1-49.
- [25] GANDHI A V, POTHECARY M R, BAIN D L, *et al.* Some lessons learned from a comparison between sedimentation velocity analytical ultracentrifugation and size exclusion chromatography to characterize and quantify protein aggregates[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 106(8): 2178-2186.
- [26] LERCH T F, SHARPE P, MAYCLIN S J, *et al.* Infliximab crystal structures reveal insights into self-association[J]. *MABs*, 2017, 9(5): 874-883.
- [27] BANDI S, SINGH S M, SHAH D D, *et al.* 2D NMR analysis of the effect of asparagine deamidation versus methionine oxidation on the structure, stability, aggregation, and function of a therapeutic protein[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16(11): 4621-4635.
- [28] JIN Y, YI Y, YEUNG B. Mass spectrometric analysis of protein deamidation: A focus on top-down and middle-down mass spectrometry[J]. *Methods*, 2022, 200: 58-66.
- [29] VLASAK J, IONESCU R. Fragmentation of monoclonal antibodies[J]. *MABs*, 2011, 3(3): 253-263.
- [30] SHAH D D, SINGH S M, MALLELA K M G. Effect of chemical oxidation on the higher order structure, stability, aggregation, and biological function of interferon alpha-2a: Role of local structural changes detected by 2D NMR[J]. *Pharmaceutical Research*, 2018, 35(12): 232.
- [31] ZHANG A, HU P, MACGREGOR P, *et al.* Understanding the conformational impact of chemical modifications on monoclonal antibodies with diverse sequence variation using hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry and structural modeling[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(7): 3468-3475.

Multi-Tiered Analysis of Aggregation and Fragmentation Behavior of Different Monoclonal Antibodies

LU Zhijin¹, WEN Xikai^{1,2}, LIU Lujie¹, WANG Yibing^{1,3}, SHEN Chunlei², WU Wei², SHEN Zhiyong², ZHAO Liming¹
(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Zhenge Biotech Co. Ltd, Shanghai 201413, China; 3. Shanghai Frontiers Science Center of Optogenetic Techniques for Cell Metabolism, Shanghai 200237, China)

Abstract: This paper used size exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation techniques to perform orthogonal analysis of the molecular size variants of ZG154 and ZG187 antibodies. Moreover, liquid chromatography-mass spectrometry, circular dichroism spectroscopy, dynamic light scattering and differential scanning fluorescence techniques were used to systematically analyze the factors causing aggregation and fragmentation. The results showed a 30.7% increase in the deamidation modification at the 329 site of asparagine in the ZG154 sample when stored at 40 °C. The related modifications did not alter the secondary and tertiary structures, as well as the stability of the protein, but accelerated aggregation by increasing intermolecular interactions and led to fragmentation due to the production of succinimide. Moreover, there was a 36.9% increase in the oxidative modification at the lysine 430 site in the ZG187 sample when stored at 40 °C, which reduced the stability of the protein and led to fragmentation. However, it did not change the secondary and tertiary structures of the protein, and the molecules always exhibited mutually exclusive interactions, thus not leading to aggregation. Furthermore, the changes in the sedimentation coefficient of ZG154 dimer and the non-covalent interactions between ZG187 molecular fragments were revealed through analytical ultracentrifugation sedimentation velocity analysis. These results describe suitable detection methods which can be combined to resolve the aggregation and fragmentation problems in the development and production of the above-mentioned drugs.

Key words: monoclonal antibodies; aggregation; fragmentation; deamidation; oxidation

(责任编辑: 王晓丽)