

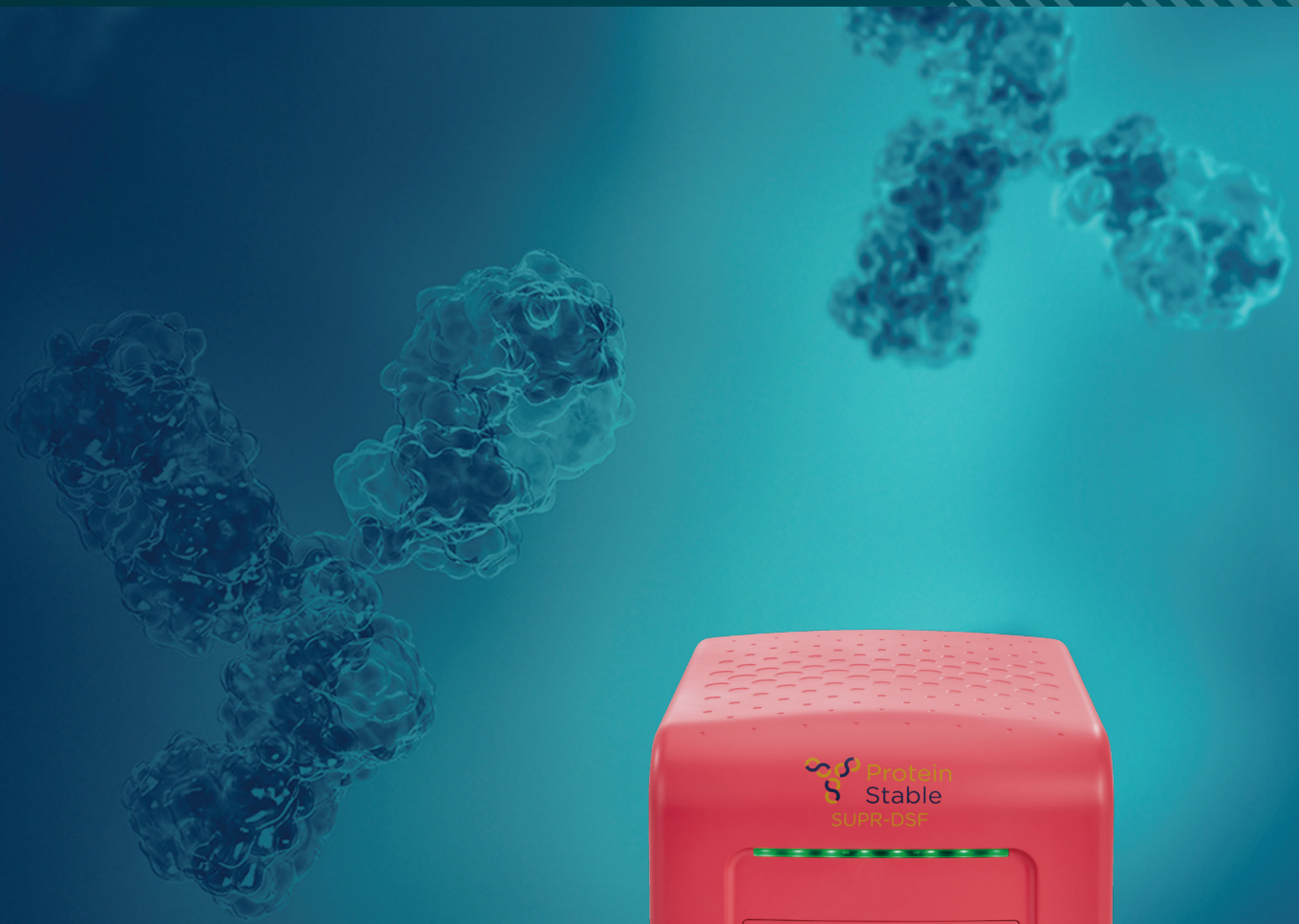


**Malvern
Panalytical**
a spectris company



全新一代差示扫描荧光仪SUPR-DSF

高通量生物药物稳定性分析利器



蛋白质稳定性

蛋白质稳定性是生物技术药物重要的关键质量属性之一，它决定了生物技术药物的药效、生产可行性、安全性及货架寿命。蛋白质高级结构稳定性确保了蛋白质在其货架寿命内保持活性和安全。

稳定性研究被用来确认蛋白质在不同条件下高级结构 (High Order Structure, HOS) 的稳定性，如温度、pH值、辅料成分及储存时间等，以确定适宜的存储和运输条件。同时，监管机构如FDA和EMA在授权生物技术药物使用批准之前也要求广泛的稳定性数据。因此，理解和确保治疗性蛋白质药物的高级结构稳定性是生物制药企业开发安全有效药物的必要条件，研究人员需要在研发和生产的多个阶段对蛋白质高级结构稳定性进行分析和评估。

蛋白质稳定性的常见分析方法

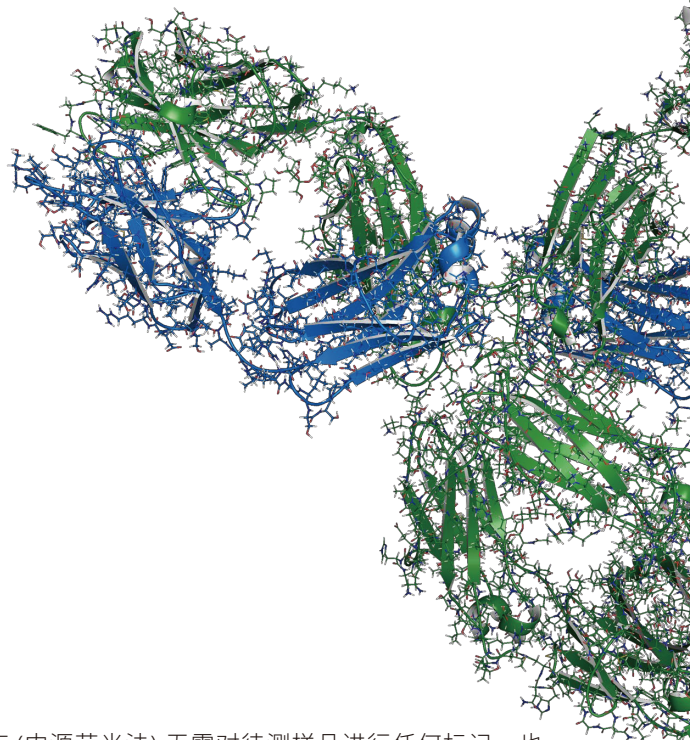
蛋白质的稳定性分析通常会使用以下方法进行研究：

- 生化方法
- 圆二色谱 (CD)
- 差示扫描量热法 (DSC)
- 定量PCR (qPCR) 技术 (外源荧光DSF)
- 动态光 (DLS) 与静态光 (SLS)

马尔文帕纳科凭借其MicroCal差示扫描量热法 (DSC) 技术为蛋白质稳定性分析提供了“金标准”的解决方案。然而，由于对储存于微孔板 (如96或384孔板) 上的大量样品的快速分析需求，使得DSC在药物筛选和早期开发中的应用受到一定的限制。因此，DSF (内源荧光法) 已成为一种流行且具有成本效益的解决方案。

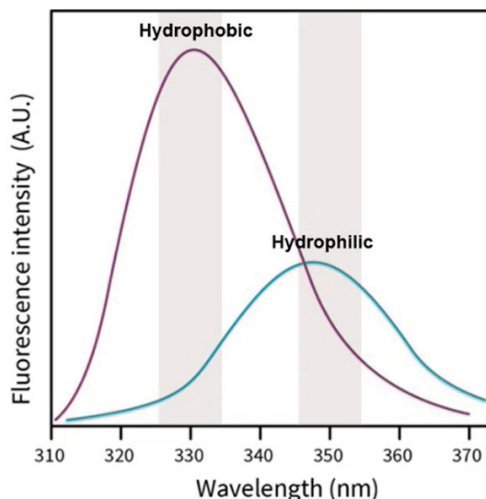
DSF (内源荧光法) 无需对待测样品进行任何标记，也无需使用任何荧光探针，即可快速测量整块样品微孔板，并提供高通量数据以帮助样品候选物和配方成分的筛选。

马尔文帕纳科的PEAQ DSC技术则在后续的研究中更详细地验证DSF的初筛结果。对很多生物技术药物而言，使用DSC技术验证DSF结果是业界推荐的最佳实践之一。



DSF 技术原理

什么是差示扫描荧光仪? (内源荧光法)



以色氨酸为例，在蛋白质疏水的内核微环境中，其内源荧光最大发射波长在330 nm左右，而在亲水的极性微环境中，色氨酸的内源荧光最大发射波长则出现在350 nm左右。蛋白质热变性或者化学变性通常会导致色氨酸残基周围微环境的极性发生变化，使通常被包埋于蛋白质疏水内核的色氨酸逐渐暴露于亲水的环境中，从而导致内源荧光最大发射波长发生红移(Red Shift)，即向更大的波长区域移动。



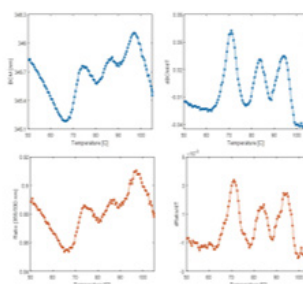
这种监测色氨酸内源荧光变化的方法无需荧光探针或者标签，避免了传统外源荧光DSF中背景荧光以及非特异吸附等假阳性结果。

当蛋白质由于热变性或者化学变性剂(如盐酸胍、尿素)作用而发生去折叠时，测量内源荧光随温度或者变性剂的变化来就可以研究蛋白质的展开过程。这些变化的数据可以用于生成熔解曲线，并获取表现热转变温度 T_m 值、 T_{onset} 、范霍夫焓变(ΔH)、吉布斯自由能(ΔG)、化学变性 C_m 值等用于蛋白质稳定性的评估和预测。

差示扫描荧光法(DSF)是一种经济高效且易于使用的生物物理技术，它通过检测当温度升高或变性剂存在时荧光发射光谱的相应变化来确定蛋白质的变性转变温度(热转变温度 T_m 值或化学变性 C_m 值)。

研究发现，蛋白质分子中芳香环氨基酸在处于不同极性的微环境时(如疏水或亲水环境中)，其被激发的内源荧光的最大发射光谱会发生位移。蛋白质中内源荧光主要来自含芳香环氨基酸如色氨酸(Trp)，苯丙氨酸(Phe)和酪氨酸(Tyr)，其中以色氨酸内源荧光最强。

Analysis of fluorescence spectra of NISTmAb



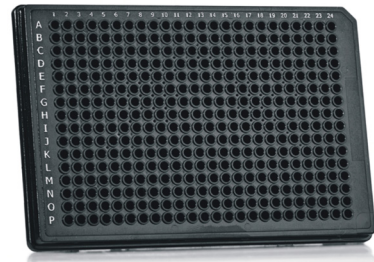
- Barycentric mean (BCM) shows less noise than the 355/330 fluorescence intensity ratio
- Lower protein concentrations would be hard to analyse with the ratio method

传统DSF经常使用350/330比值法来进行数据分析，而马尔文帕纳科的SUPR-DSF提供了多种分析方法，除了比值法外，SUPR-DSF还提供了BCM(Barycentric mean, 质心均值法)，可以得到比350/330比值法更好的信噪比，同时更有利于低浓度蛋白样品的分析。



SUPR-DSF 系统的主要特点

- 采用标准的384微孔板，无需特殊的耗材和毛细管
- 高通量筛选，80分钟内可完成单块384微孔板的测试
- 利用内源荧光，无需染料或标签，兼容常用生物体系
- UV LED激发配合全光谱检测
- 仅需要10-30 μl 样品，样品浓度0.05 ~ 250 mg/mL
- 获得关键参数： T_{onset} 、 T_m 、 ΔH 、 ΔG 、 C_m 及亲和力等
- 提供卓越的数据质量和可重复性



标准的384微孔板



SUPR-DSF系统

注：照片不符合实际比例，请以实物为准

SUPR-DSF系统的应用

SUPR-DSF 系统广泛应用于生命科学基础研究和药物研发等多个领域：

- 加速突变体的筛选
- 配方和预配方的筛选和优化
- 蛋白结晶条件筛选
- 批间一致性评估
- 生物相似性评估
- 加速应力和强制降解研究
- 结合诱导的构象变化分析
- 翻译后修饰评估
- 恒温和化学稳定性分析

SUPR-DSF 系统的技术规格

性能参数	SUPR-DSF
样品容量	标准384微孔板
样品体积	10 μL - 30 μL
温度范围	10°C - 105°C
测试时间	80 分钟/384微孔板
发射波长	310 nm - 420 nm
尺寸 (W x H x D)	420 mm x 520 mm x 350 mm
重量	35 kg

典型应用案例

加速突变体的筛选

使用SUPR-DSF对16个样品进行比较和筛选，其中包括1个野生型蛋白(WT)和15个单点突变体。在1.5小时内，DSF仪器生成了48个样本(每组3次重复)的高质量熔解曲线(相同时间内最多可生成384孔的数据)。用模型对数据进行拟合，可获取熔解温度 T_m 值并对稳定性进行排序和筛选。

如图1所示，与WT(蓝色)相比，其中3个突变体(9、13和14)的熔解曲线左移，说明其蛋白稳定性降低；余下12个突变体的稳定性均有所提高。其中，突变体1、8和12的稳定性提升最大。

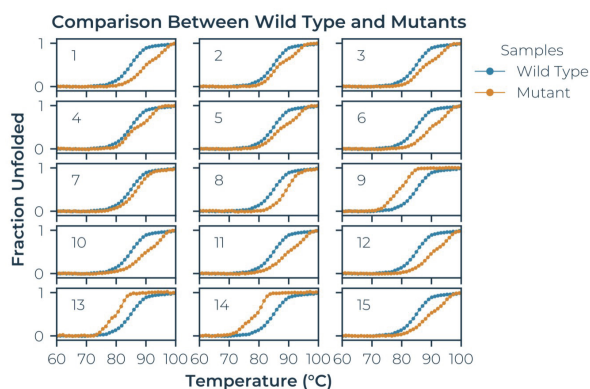


图1 15个突变体(橙色)与野生型(蓝色)的熔解曲线对比

图2展示了几个代表性样本的熔解曲线，可以发现一些蛋白质发生了单一热转变过程(WT蛋白与突变体7和8)，而另一些蛋白质(突变体1和14)则清楚地显示出两段热转变过程，即熔解曲线上有两个拐点。通过SUPR-DSF提供的数据，可以帮助研究者筛选出有前景的候选物进行深入研究。

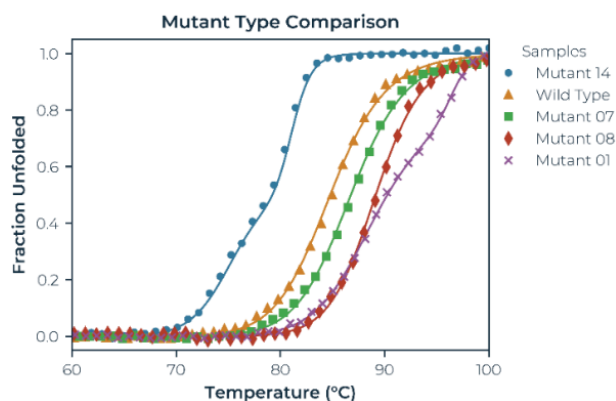


图2 几个代表性样本的熔解曲线

精确解析单抗的Fab区域

使用SUPR-DSF获得NISTmAb(NIST单抗标准品)的差示扫描荧光数据，并将结果与差示扫描量热法(DSC)所获得的数据进行比较。SUPR-DSF可以解析NISTmAb所有的三个结构域: CH2(69°C), CH3(83°C), 和Fab区域(94°C)。SUPR-DSF的最高扫描温度为105°C，可以精确测量异常稳定的Fab区域熔解温度，而其他DSF平台的扫描最高温度一般仅为95°C，容易丢失单抗Fab区域去折叠变性的关键信息(图5(a))。

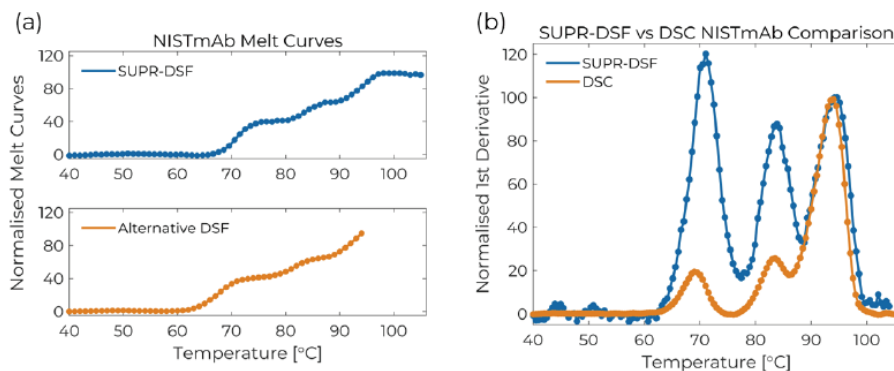


图5 (a) SUPR-DSF与其他DSF平台的NISTmAb熔解曲线；(b) SUPR-DSF归一化数据与DSC结果的比较。

将SUPR-DSF归一化后的数据与DSC结果进行比较。如图5(b)所示，三个峰相互匹配，证明了两项技术良好的一致性，使用SUPR-DSF可以轻松获得高质量的蛋白质稳定性信息。

典型应用案例

加速曲妥珠单抗的辅料和配方筛选

生物治疗药物如抗体等的配方是保证药效、生产可行性和安全性的基础，也决定了储存和运输的条件。制药企业亟需高通量的方法来快速可靠地筛选大量的条件组合，以确定最佳配方。

使用SUPR-DSF，研究者对治疗性抗体曲妥珠单抗在96种不同条件下的稳定性进行了筛选和分析，并在1.5小时内完成了测试。测试结果与差示扫描量热法 (DSC) 的结果非常一致。如果集成实验室自动化设备，每天可以完成数千个样品的筛选。

DSF熔解曲线显示出两个独立的转变区域，通过最小二乘法对数据进行拟合，可以确定 T_{onset} 值、 T_m 值和范特霍夫

夫焓变 (ΔH)。图3 (a,b) 分别展示了破坏/增强稳定性的辅料的熔解曲线及拟合图。图4 (a) 列出了能够提高抗体稳定性的所有辅料 (与对照样品相比)。

SUPR-DSF正确鉴别了已上市的曲妥珠单抗中使用的辅料组氨酸和海藻糖的稳定性作用，如图4 (b)所示，SUPR-DSF数据具有出色的可靠性和一致性，同时提供惊人的高通量。

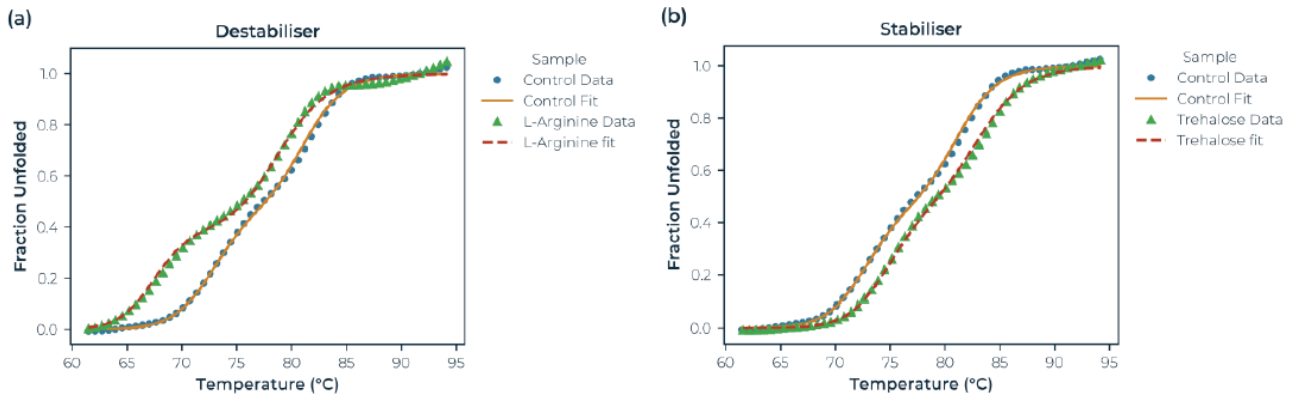


图3 曲妥珠单抗的变性展开图和拟合数据。以标准缓冲液作为对照，(a) 代表一种破坏稳定性的辅料，而(b)代表一种增强稳定性的辅料。

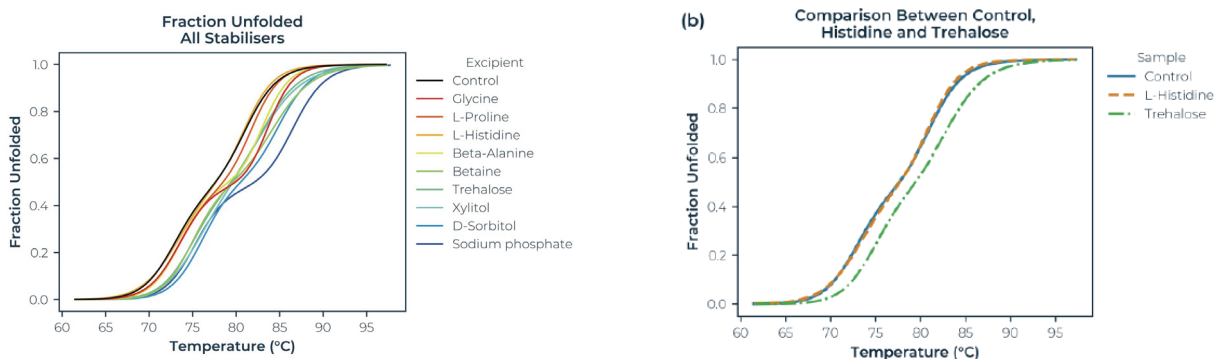


图4 (a) 增强曲妥珠单抗稳定性辅料的熔解曲线；(b) 组氨酸和海藻糖辅料的熔解曲线

利用高通量差示扫描荧光法获得结合参数

结合分析研究是药物研发的一个关键领域，相互作用的特征和 K_D 值(解离平衡常数，表征分子间结合的亲和力)对候选物的选择是至关重要的，研究者需要采用多种原理互补的方法来筛选和确定文库中的数千种至数万种小分子化合物。

通过SUPR-DSF进行分子相互作用分析，不受表面效应、物质迁移 (mass transport) 或缓冲液折光率问题等因素的影响，可在分析物结合浓度范围内提供高通量、无需标记的测量。

通过检测蛋白质-配体复合物的稳定性变化，可用于确认结合的特异性；通过热变性时荧光发射光谱的变化和配体浓度的函数关系可以计算 K_D 值。即使对于非常弱的结合分子，结合所诱导的稳定性变化也能被SUPR-DSF检测到。

使用标准384微孔板，能够在一天内筛选数千个样品的稳定性，从而确认结合状态。

使用SUPR-DSF研究配体 (TFMSA) 与人碳酸酐酶I的结合作用，碳酸酐酶随TFMSA浓度变化的熔解曲线如图6所示。

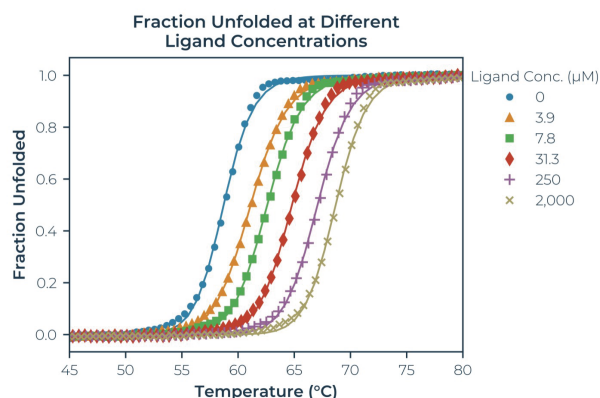


图6 随着TFMSA浓度的增加，人碳酸酐酶I的熔解曲线变化

图7显示了人碳酸酐酶I的 T_m 值与TFMSA浓度的关系，拟合所获得的 K_D 值有两个，分别为 $2.1\mu\text{M}$ 和 $174.2\mu\text{M}$ ，与文献中的数值一致，证明SUPR-DSF可以用作配体结合研究的预筛选或确认工具，并且具有卓越的灵敏度。

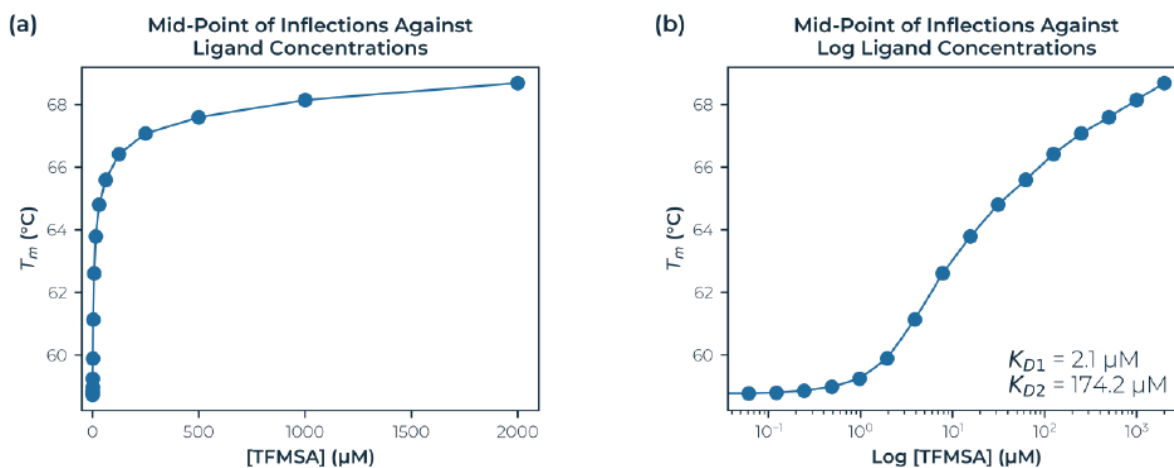
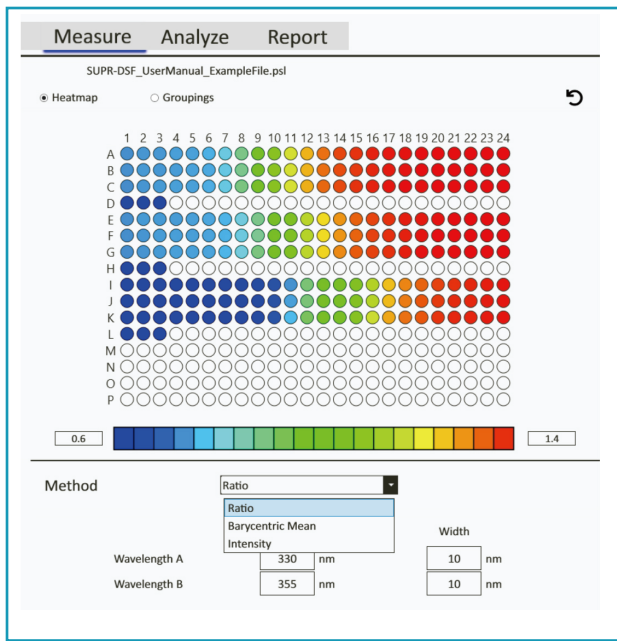


图7 TFMSA浓度对人碳酸酐酶I的 T_m 值的影响。(a) x轴为TFMSA的浓度。(b) x轴为TFMSA浓度的对数。

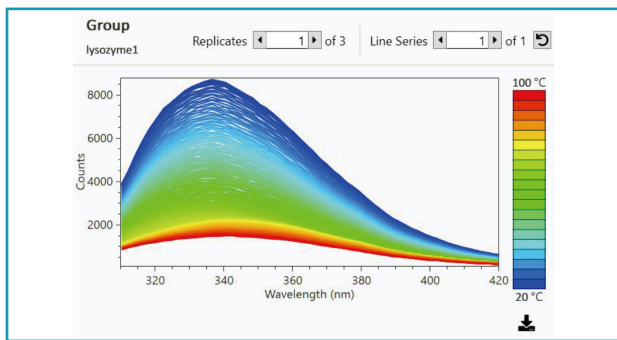
智能软件

SUPR-DSF软件提供简洁、智能、高效的实验设计与数据分析功能，既可以让初学者快速上手，又可为经验丰富的用户提供进阶选项。

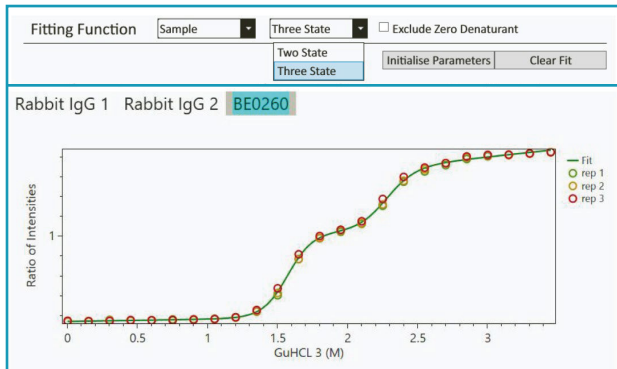
图a 实验设计和样品排布界面



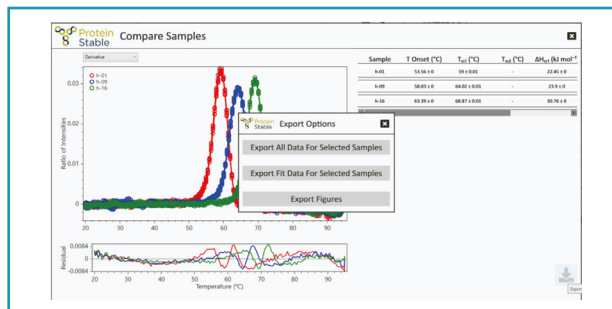
图b 全光谱荧光扫描界面



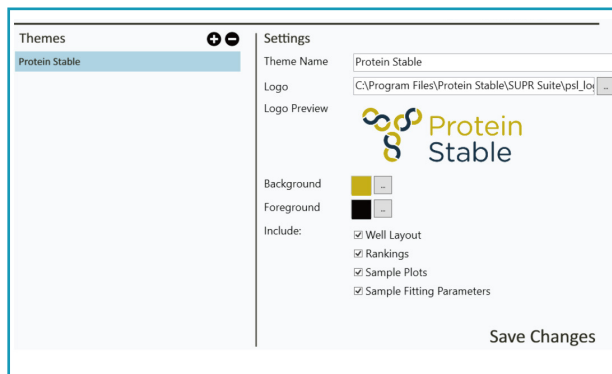
图c 模型选择与拟合界面



图d 数据比较与导出界面



图e 实验报告导出界面



关于Malvern Panalytical

马尔文帕纳科的使命是对材料及生物进行化学、物理或结构分析，打造出更胜一筹的客户导向型创新解决方案和服务，从而提高效率和产生客观的经济效益。让各个行业和组织的科学家和工程师可以解决一系列难题，如最大程度的提高生产率、开发更高质量的产品，并缩短产品上市时间。

关于Protein Stable

旨在将以客户为中心的颠覆性技术引入蛋白质筛选和表征市场，重点是高通量、低样品量的蛋白质表征方法，在不影响数据质量的条件下提高生产力。

了解详情，联系当地销售



马尔文帕纳科中国
T: 4006306902
E: info@malvern.com.cn
W: www.malvernpanalytical.com.cn