

GE医疗中国

转化医学专刊

—— 药物开发篇



GE梦想启动未来

目录

整体方案

小分子药物开发的创新解决方案.....	2
大分子药物开发的创新解决方案.....	3

综述进展

应用Biacore™和MicroCal™系统开展基于化合物和片段的药物发现与药物开发.....	5
非标记技术生物药物研发中的应用---利用Biacore™系统及MicroCal™系统作非标记的相互作用分析.....	16
高内涵筛选—药物开发中的新契机.....	26
人类胚胎干细胞群药物筛选作用将改变药物开发进程和临床前试验进程.....	28
可用于DMPK研究的干血点微量采样技术.....	30

小分子应用专题

利用无标记相互作用分析表征先导化合物：在类风湿性关节炎治疗中阻断T细胞的活化.....	33
采用Biacore™ 4000进行片段库的筛选和鉴定.....	38
1+1>2？利用ITC研究低亲和力的配体片段 FBDD.....	44
以ITC技术导航激酶抑制剂的抑制机理研究技术.....	53
在IN Cell Analyzer 2200上利用高内涵分析研究药物对高尔基复合体的效果.....	57
采用IN Cell Analyzer 2200成像和量化基于细胞的GPCR激活测定.....	63
采用心肌细胞进行多重标记活细胞毒性试验的高内涵分析.....	67
Whatman™指示型FTA™ DMPK卡.....	73

大分子应用专题

使用Biacore™非标记检测技术提升工艺开发和质量控制.....	78
用Biacore 4000突破解决筛选和表征重组抗体片段的瓶颈问题.....	81
采用微量热差示扫描量热技术对治疗性抗体的工艺开发进行更有效的指导.....	85
微量热ITC和DSC技术在生物制剂研发中的应用.....	88
结晶实验中使用AKTExpress™进行人源化WO-2 Fab 的多步骤纯化.....	92
从大肠杆菌获得重组胰岛素原的高通量筛选与工艺开发.....	94
Biacore™系统开展免疫原性检测.....	101



整体方案

- 小分子药物开发的创新解决方案
- 大分子药物开发的创新解决方案

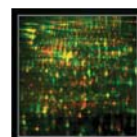
See what others don't

小分子药物开发的创新解决方案



靶点鉴定和确认 — DIGE系统

- ▶ 发现疾病发生的关键因子，进行生物标志物分析
- ▶ 提供疾病及药物研究的蛋白质组学方法
- ▶ 发现真实的蛋白质表达差异



结合动力学 — Biacore SPR系统

- ▶ 靶点鉴定和确认：结合特性（亲和力和特异性）
- ▶ Hit鉴定：结合特性，如亲和力、二次结合和化学计量信息、位点特异性、选择性
- ▶ 先导化合物发现：结合特性，如亲和力排序（功效和潜力）、特异性
- ▶ 先导化合物优化：相互作用的数据；完整的动力学谱图
- ▶ 选择性：比较结合分析、早期药代动力学（血浆蛋白和脂质体结合）
- ▶ 临床前开发：生物药物的免疫原性，如抗药性抗体的检测



结合热力学 — MicroCal ITC/DSC系统

- ▶ 靶点鉴定和确认：蛋白稳定性和结合强度（亲和力）
- ▶ 先导化合物发现：结合特性，如亲和力；结合的机理，如每个反应的结合驱动力（功效和潜力）
- ▶ 先导化合物优化：相互作用的数据；完整的热力学谱图，如亲和力、结合位点的数量、焓值 (ΔH) 和熵值 (ΔS)，比较结合和构效关系研究的选择性



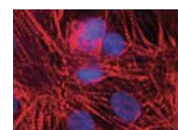
高内涵细胞水平分析：IN Cell 细胞分析系统

- ▶ 靶点鉴定和确认：RNAi筛选寻找新的潜在靶点
- ▶ Hit鉴定：功能筛选和二次筛选
- ▶ 先导化合物发现：在功能背景下试验功效
- ▶ 先导化合物优化：在功能背景下试验功效和安全（毒性）



人源细胞模型：Cytiva细胞模型

- ▶ 先导化合物优化：心脏毒性和安全试验



干血点 (DBS) 样品：FTA DMPK 卡

- ▶ 先导化合物优化：早期药物发现药代动力学 (PK) 到药物候选物选择
- ▶ 临床前开发：药物开发过程中药代动力学 (PK) 和毒代动力学 (TK) 分析



See what others don't

大分子药物开发的创新解决方案



蛋白质工程

- ▶ ÄKTA pure: 纯化目标蛋白
- ▶ MicroCal DSC系统: 蛋白质性质表征, 如蛋白是否恰当折叠, 蛋白质均一性和热稳定性; 评估稳定性及可生产性, 避免后期的不稳定风险
- ▶ MicroCal ITC系统: 相互作用的化学计量关系评估蛋白参与相互作用的功能部分
- ▶ Biacore SPR系统: 候选药物和靶标的动力学特征; 目标蛋白的活性水平



克隆表达和筛选

- ▶ Wave Bioreactor: 创新波浪式生物反应器, 提高细胞密度, 改善细胞生长状态
- ▶ Biacore SPR系统: 结合的动力学和浓度, 结合初筛, 亲和力评级, 特异性及动力学分析; 解离速率和药效分析; 表位筛选



候选药物的表征和优化

- ▶ Biacore SPR系统: 药靶特异性结合的特征分析; 选择性的研究; 高精度的解离速率分析; 药物结构-活性关系的研究; 活性浓度分析;
- ▶ Micro ITC/DSC 系统: 测量热力学参数, 帮助深入的理解总结合能量 (ΔG) 和“锁-钥”驱动力: 总结合能量与亲和力常数 (KD) 直接相关; “锁-钥”驱动力, 如氢键和范德华力引起的相互作用也与纯疏水力的相互作用不同。通过热力学测定鉴别结合能量最理想的突变等



工艺开发

- ▶ ÄKTA avant: 融入DoE和BufferPro等尖端功能, 符合QbD质量源于设计的需求, 实现快速的工艺开发
- ▶ ÄKTAcrossflow: 用于切向流过滤膜筛选及工艺开发的全自动膜过滤系统, 从细胞收集到最终的超滤/洗滤步骤
- ▶ ÄKTApilot: 快速工业过程开发及小规模生产, 满足从三期临床、试生产到正式生产需要。ÄKTA平台确保从产品开发到符合GMP的经济生产的平稳放大
- ▶ MicroCal ITC/DSC系统: 生物药物制剂的研发和优化, 如辅料-蛋白质的结合强弱; 蛋白质稳定性情况监控; 评估生产过程中的生物相容性, 优化制造工艺。



临床前临床开发

- ▶ Biacore SPR系统: 免疫原性的筛选, 更早鉴别免疫响应; 免疫原性的确证和鉴定, 如相对浓度, 亚型分析, 特异性和结合稳定性



生产和质量控制

- ▶ ReadyToProcess平台: 通过提供极佳灵活性的一次性使用产品, 为生物制药生产提供无缝连接可放大的设备, 减少生产前期投资, 加速产品上市。
- ▶ Biacore SPR/ MicroCal ITC/DSC系统: 生产过程的质量控制, 活性和浓度测定; 生物仿制药的一致性分析、评价、质控。

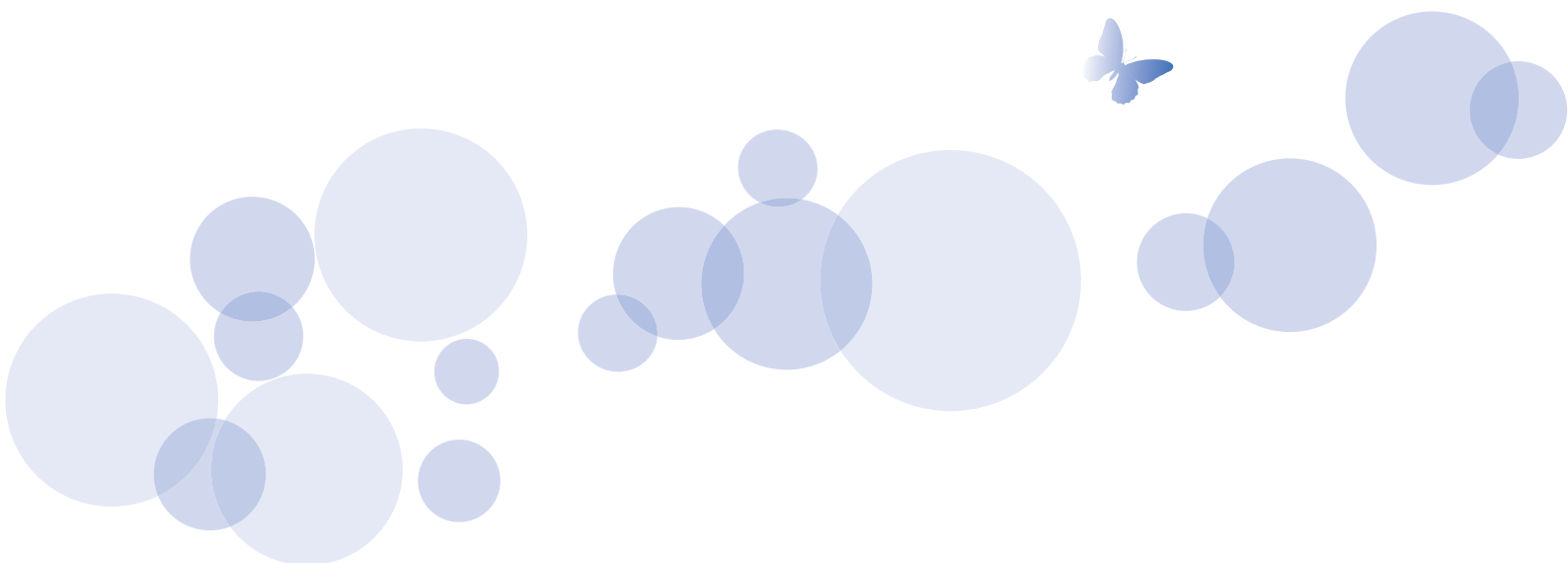




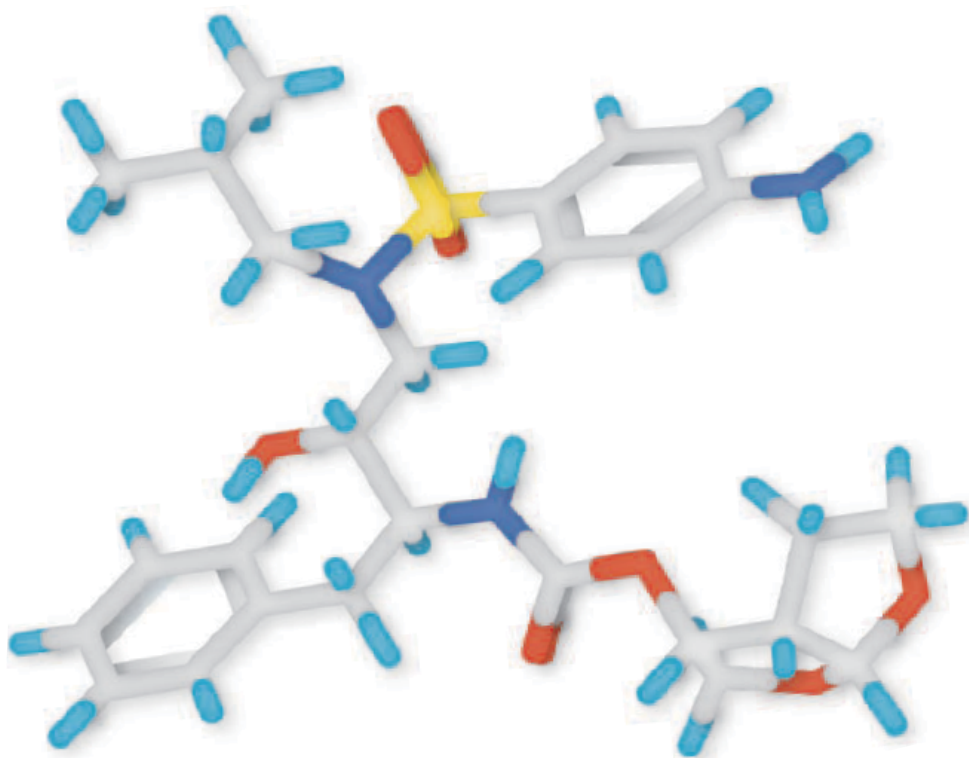
综述进展



- 应用Biacore™和MicroCal™系统开展基于化合物和片段的药物发现与药物开发
- 非标记技术生物药物研发中的应用-----利用Biacore™系统及MicroCal™系统作非标记的相互作用分析
- 高内涵筛选—药物开发中的新契机
- 人类胚胎干细胞群药物筛选作用将改变药物开发进程和临床前试验进程
- 可用于DMPK研究的干血点微量采样技术



应用Biacore™和MicroCal™系统开展基于化合物和片段的药物发现与药物开发



基于亲和力、无标记的药物发现和药物开发的分析工具

药物发现首先需要对目标蛋白进行鉴定和验证，然后筛选有可能选择性结合目标蛋白的化合物分子用于药物化学的优化流程。一旦化合物被鉴定，它们与相关靶标的相互作用会被详细地研究，以定量地证实和表征这种相互作用，并提供关于结合机理的信息。无标记的生物物理方法，例如那些开展在Biacore 和MicroCal 系统上的方法，正逐渐被用来实现对相互作用过程的更深刻的理解。在药物发现阶段对药效的更准确预测可以减少后期的损耗率。

GE Healthcare Life Sciences 提供用于结合动力学（Biacore 系统）和热力学（MicroCal 系统）研究的仪器。动力学特征提供关于复合物形成速率及其稳定性的信息，而相互作用热力学研究对于解决和理解结合机理是必需的。

在化合物药物发现和开发中，无标记相互作用分析能够：

- 验证靶标蛋白的性状和质量；
- 基于直接的、无标记的结合数据自信的对候选化合物进行选择：选择性/ 特异性、化学计量比、亲和力、动力学和热力学
- 通过对作用机制以及药代动力学和药效学的更好的理解对候选药物进行优化，以获得更高的药效和安全性
- 通过测定药物滞留时间和焓效率使用动力学和热力学数据作为关键指标用于先导物优化

这本白皮书提供了无标记生物物理分析方法是提供有关化合物- 目标相互作用的更多信息，以及这种信息如何被用于预测化合物药效的例子。

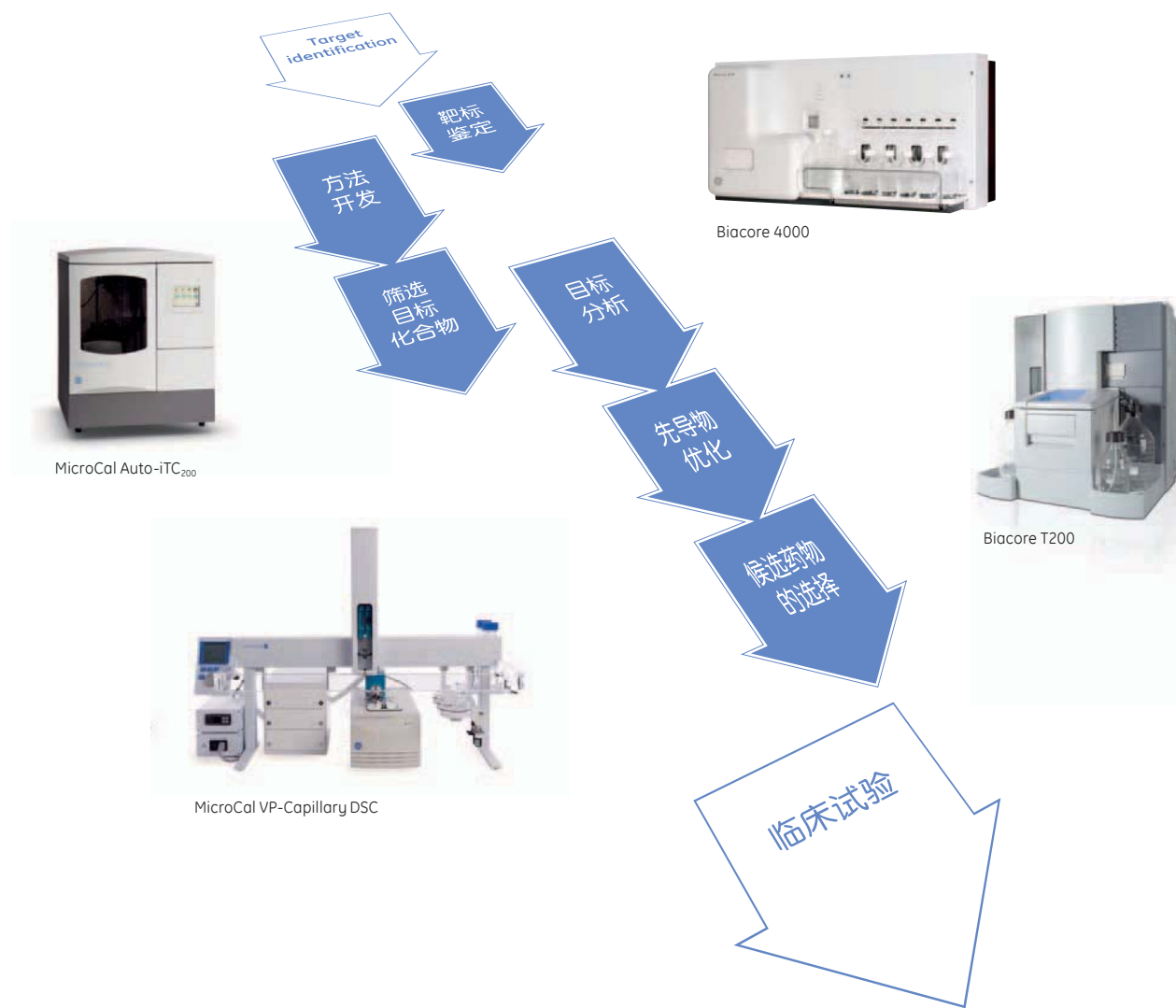


图1. 由Biacore 和MicroCal 系统组成的从靶标验证到早期ADME研究的化合物发现和开发过程的示意图。

表征清楚的药物靶标可提供最佳的性能并用于开展化合物鉴定

基于靶标的药物开发方法首先需要鉴定一个与某种疾病发生、进展相关并具有致病活性的生物靶标。其次，这种药物靶标将会被表达和纯化，并对其质量与活性进行控制。第三，需要开发一种能够调控该药靶活性、且无副作用或者仅有有限副作用的治疗性试剂。药物靶标可以通过多种技术进行鉴定，例如基因筛选、小RNA 干扰以及基因表达谱分析等 (1)。

在方法开发和靶标验证中，无标记技术，包括表面等离子体共振 (SPR) 和微量热技术 (ITC/DSC)，将被用于回答一系列的问题。例如，差示扫描量热法 (DSC) 解决了诸如靶标是否被正确折叠、是否均一和热稳定性的问题。从等温滴定量热法 (ITC) 中获取的化学计量比数据证明足以结合到先导化合物的目标蛋白组分。另一方面，SPR 可被用于检测靶标蛋白是否与底物和/或具有“正确的”相互作用动力学的阳性对照结合，还可用于分析目标蛋白的活性水平。

我的靶标蛋白有活性吗？

在下面的例子中，ITC 被应用于测试两批打算用作高通量筛选 (HTS) 检测试剂使用的靶标蛋白的活性水平。在这两种情况下，不同批次的蛋白用已知的可以与蛋白按照1:1结合的阳性参照化合物进行滴定。图2A 显示当来自产品批次1的靶标蛋白用参照化合物滴定时，热量衍化为摩尔比的函数。结合位点值数量显示为1.05，这表明实际上所有的蛋白都有活性。图2B 显示当参照化合物滴定到来自产品批次2的靶标蛋白中。0.23 的结合位点值表明蛋白靶点没有全部起作用，只有23% 有活性。根据这个信息，第二批目标蛋白是否能用于HTS 检测就令人怀疑。

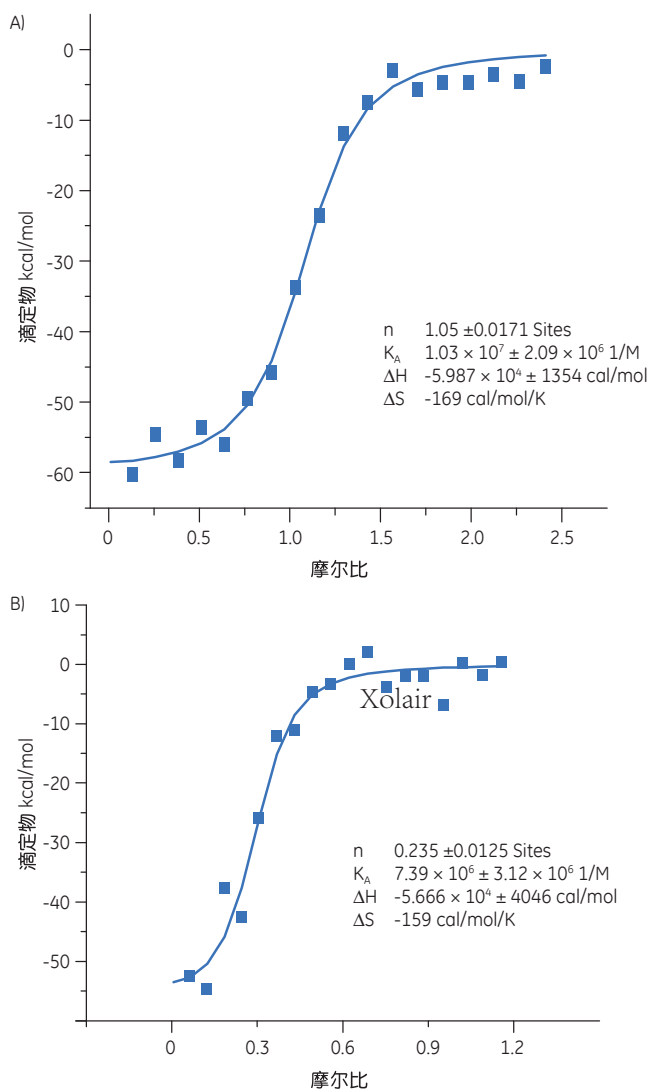


图2. 结合的化学计量比是从ITC 实验中提取的一个非常重要的参数，能够区分 (A) 纯的活性蛋白和 (B) 错误折叠的变性蛋白。

为二次筛选提供深刻见解

高通量筛选 (HTS) 仍被用于寻找有可能成为治疗药物的先导化合物。在制药行业中, SPR 被大量用来对几千种 HTS 目标化合物进行二次筛选, 以消除假阳性和杂乱结合的分子 (promiscuous binders) (2)。

基于结构的生物物理方法的药物设计和病毒配体筛选可获得新的信息, 并能够潜在地减少需要被评估的化合物数量。因此, 集中和定向文库已经替代完整库受到人们的欢迎。与结构信息和 *in silico* 方法一起, SPR 也被用于假阴性的鉴定, 以及用于使用目录方法通过构-效关系 (SAR) 所鉴定的目标化合物的表征。

基于片段的药物设计在药物发现中越来越多被用于鉴定适当的化学骨架。这种方法也以结构为基础, 它试图鉴定出非常小的化合物作为目标蛋白上不同结合位点中的初始定位点。无论是活性和失活蛋白都可以找到催化位点和别构位点结合物, 因为在基于生物物理的直接结合检测中无需底物。基于片段的药物设计提高了通过筛选相对较少的分子库就可以覆盖较大化学空间的可能性; 筛选几千种而不是千千万万种的化合物。今天, 结构和功能上的结合信息一起被用于鉴定有前景的片段, 对这些化合物进行准确而快速的优先排序以用于进一步的分析和开发十分关键。Biacore 4000 仅使用微克级别的蛋白就可以筛选几千个片段 (图3)。

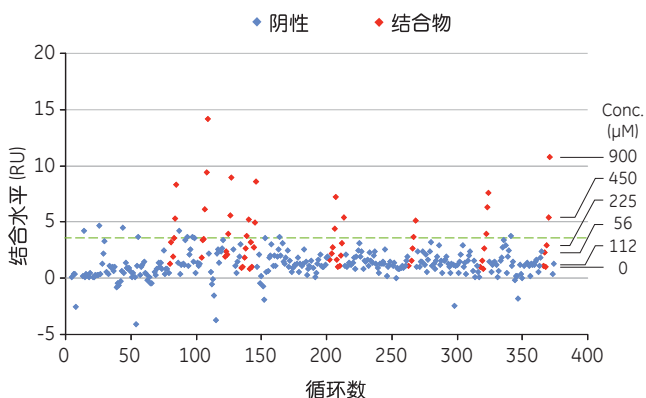


图3. Biacore 4000 的性能允许使用浓度系列对片段库进行筛选。浓度依赖的信号的系统性增强证明了结合。

使用SPR 技术筛选片段库或者定向库

片段筛选方法存在很多技术挑战。生物物理方法, 如X射线晶体学和核磁共振会耗费大量的靶标蛋白。片段所表现出的低亲和力, 一般在mM 范围, 因而需要高样品浓度, 但随之而来的却是溶解性和非特异性结合等问题, 利用上述方法也很难测定结合亲和力。基于SPR 的生物传感器具有低消耗的目标蛋白量、高信息含量和高质量相互作用数据, 因此在这种应用中很具吸引力。SPR技

术的通量一般也比X射线晶体学和核磁共振技术高出几个数量级。Biacore 4000能够快速筛选针对靶标蛋白和参照蛋白的整个片段库, 去除那些因溶解性问题而形成聚集体和杂乱结合的化合物 (图4 和5)。在经过最初的清库筛选后, Biacore 4000可以在一次分析中用单一浓度检测针对多种固定的蛋白 (如靶标、空白对照以及作为选择性参照的其他蛋白) 的片段分子, 以鉴定出真正的结合物。使用经过修饰的靶标蛋白, 如突变或对活性位点进行共价的化学阻断, 连同野生型蛋白一起作为内参可以评估结合位点的选择性。Biacore 4000也支持使用竞争法, 对靶标结合位点被位点特异性抑制剂占据前后的响应信号进行比较, 从而鉴定结合位点。配备满足片段和定向文库筛选的通量和质量, Biacore 4000所提供的方法开发、数据评价特性以及增强的样品数据导入和导出功能是用于筛选定向文库和基于片段的药物设计所必不可少的。

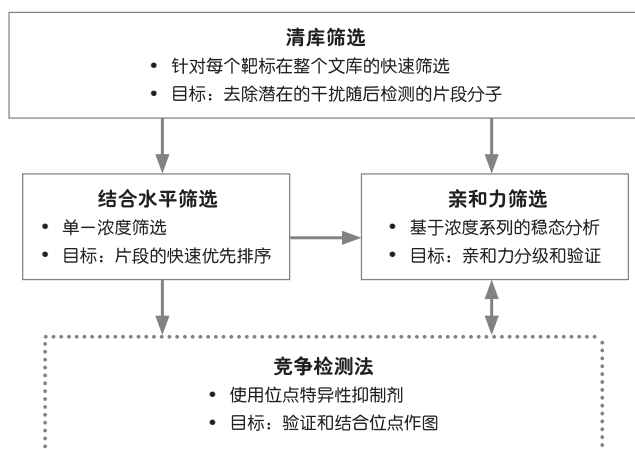


图4. 已经在Biacore 4000 的系统和软件中实施的片段筛选的最佳工作流程。相同的工作流程也非常适合用于HTS 候选目标的二次筛选。对于一个含有2000 个片段的文库, 根据这个工作流程的完整筛选和目标表征大约需要1-2 周。

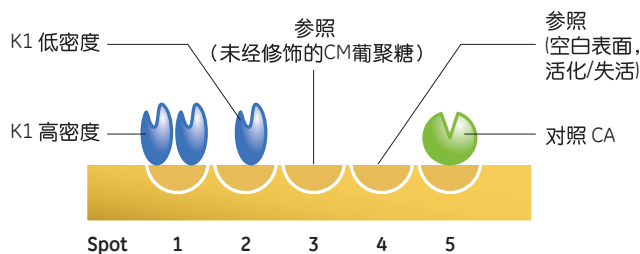


图5. Biacore 4000 具有四个流动池, 每个含有五个检测点。通过在每个流动池中使用相同排布的靶标蛋白, 在每轮中可以平行分析四个片段/样品。这个例子显示了使用传感器芯片CM5 和一种酪氨酸激酶K1 (分子量31900D) 建立方法, 以高、低两种水平分别固定在点1和2上, 而碳酸酐酶 (CA) 作为对照蛋白固定在点5上。一个含有未修饰的羧基葡聚糖的检测点和一个活化/失活的检测点被用来作为参照。

候选化合物分析以增强药效预测

候选化合物分析在小分子药物发现流程中是一个非常重要的步骤。这时，需要对将哪些候选化合物可以进入到先导化合物优化步骤作出关键的决定。在这个阶段选择最佳的候选药物将对于减少候选药物的流失率具有巨大的影响。生物物理方法例如SPR 和ITC 将亲和力解析为结合/解离速率常数（提供诸如滞留时间等重要信息）和结合热力学（提供关于焓/ 熵等信息），为来自于不同化学骨架的化合物与靶标分子如何相互作用勾勒一个定量图谱。这种增强的解析率让我们有可能更好地判断先导化合物的生物学效能，这是因为，药代动力学数据与化合物的结合动力学特征紧密相关。

消除假阳性

SPR 和ITC 都能用于假阳性的鉴定，因为它们都能测定先导化合物与靶标蛋白的直接结合。如果靶标蛋白在ITC/SPR实验中能够与参照化合物的结合，但与候选的目标化合物没有结合，则在HTS 中的这种化合物很可能是一个假阳性结果，传感图的形状可用作假阳性的鉴定（图6）。ITC 可以直接测定相互作用的热量。若靶标蛋白可以被一种阳性对照化合物证明有结合活性，而HTS 候选化合物在使用由IC50值预测的浓度范围分析时却缺乏饱和的趋势，这强烈的释放出一种假阳性的信号。在下列实验中（图7），cPLA2 催化花生四烯酸从膜磷脂中释放，以引起促炎症因子的产生，例如前列腺素。特异的抑制剂已经被证明具有有效的抗炎作用。然而，干扰膜表面的化合物在初次检测中有可能产生假阳性。

整个实验基于如下设计：将候选化合物滴入膜成分中，并对添加与不添加不可逆抑制剂时的结合反应进行比较。ITC 结果显示化合物3 没有结合（表1），但而初次筛选中它却显示出 $9\ \mu\text{M}$ 的亲和力。由于化合物3 可以非特异性地结合到膜上，因此，这是一个假阳性的结果。

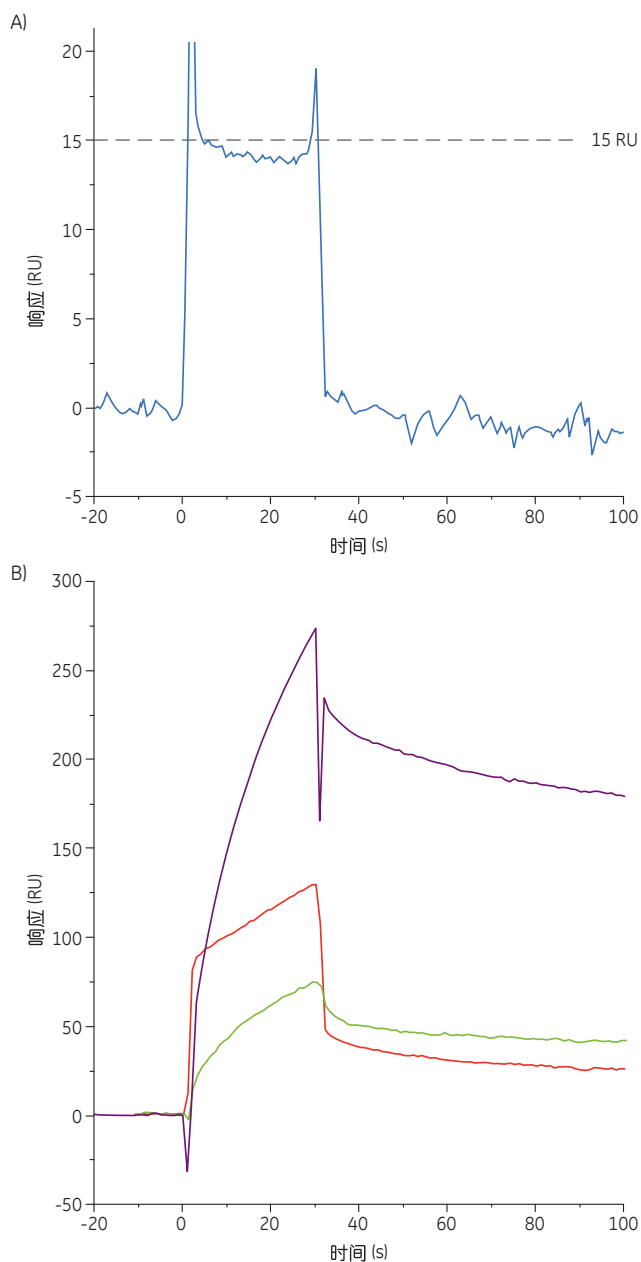


图6. 传感图的形状和信号水平显示片段与靶标蛋白的可疑和杂乱的结合。(A) 一种大约200Da 大小的片段的典型1:1 结合。(B) 杂乱的结合物通常显示更高的信号，而且它们在注射期间不会饱和。

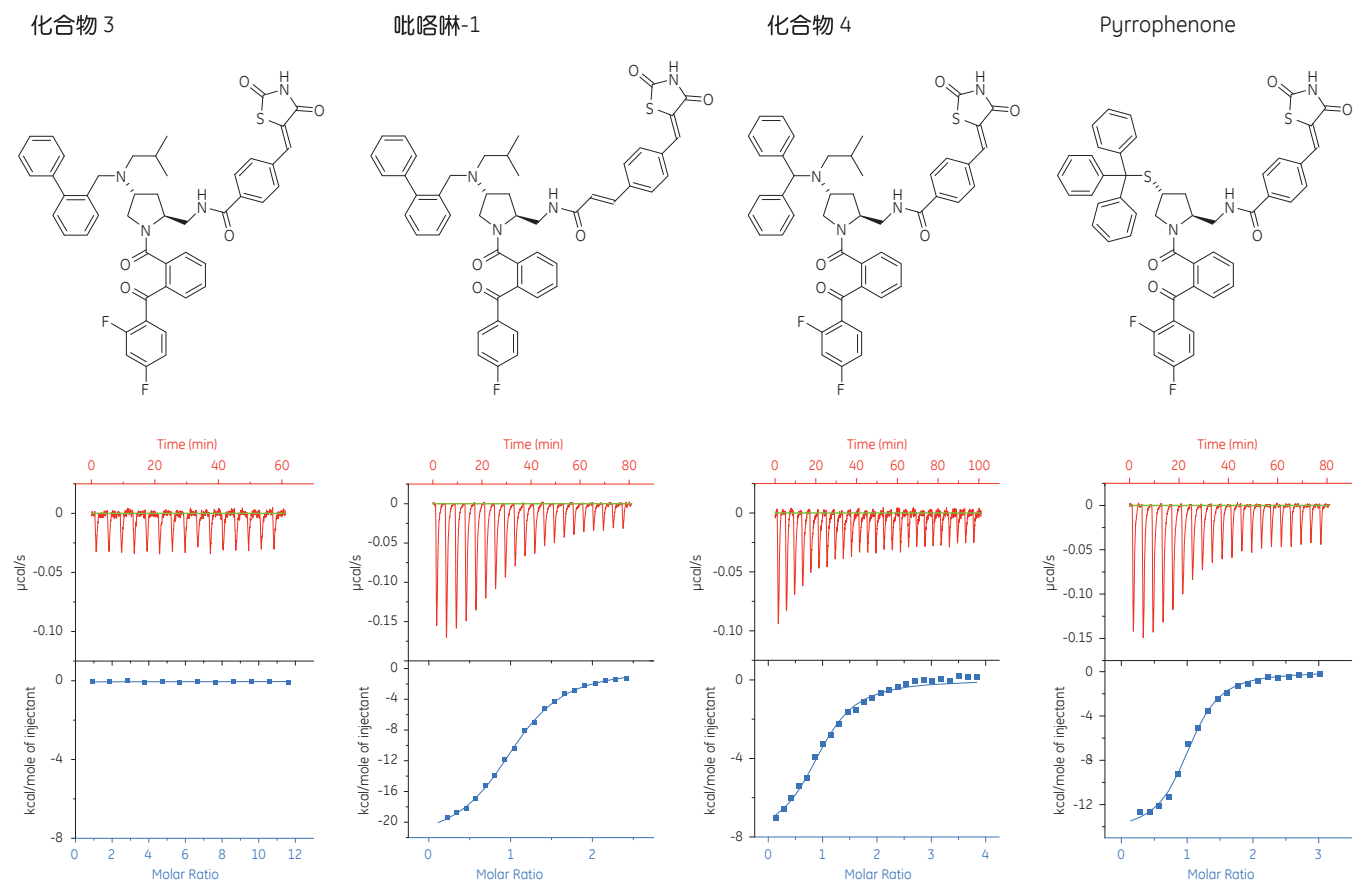


图7. 所有化合物在Glu 检测中被鉴定为阳性, 然而, ITC 结果证明化合物3 没有与靶标蛋白发生结合, 强烈证明这是一种假阳性结果。数据由Shionogi 友情提供。

表 1. 对于在 Glu 检测中鉴定为阳性的化合物所测定的热力学参数。

化合物	N	K_D (μM)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol/K)	ΔG (kcal/mol)	Glu IC_{50} μM
化合物 3	-	-	-	-	-	9 ¹
化合物 4	1	0.38	-8	2.7	-8.9	0.35
吡咯啉-1	1	0.29	-22	-44	-9.2	0.52
Pyrrophenone	1	0.15	-14	-16	-9.4	0.13

¹ Glu检测显示出9 μM 的亲合力

先导化合物的选择和优化

等温滴定量热法 (ITC) 是一种普适性的技术, 提供了亲和力和数据以及参与先导化合物与其靶标分子结合过程中的特异的非共价作用力相关的机理信息。通过直接测量相互作用的热量, ITC提供了对与亲和力 (K_D) 直接相关的总吉布斯自由能 (ΔG) 的深入理解。定向作用力 (或称“锁-钥作用”), 如氢键和范德华力, 与焓变 (ΔH) 相关, 并能够与对应于熵变 (ΔS) 的纯疏水性相互作用区分开来 (3)。图8举例说明了三种不同的化合物, A、B 和C, 它们以相同的亲和力结合到靶标上, 具有相同的 ΔG 值。

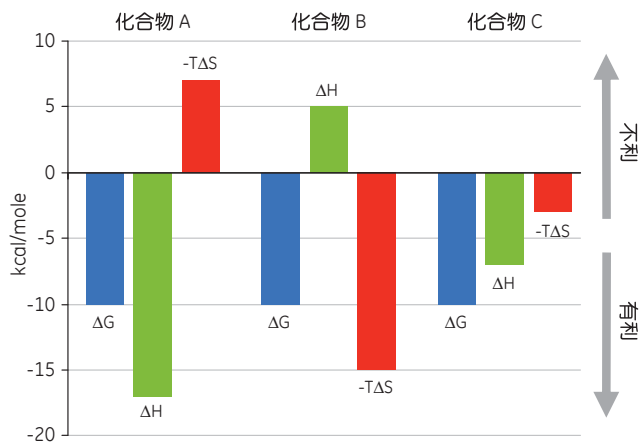


图8. 化合物A 以良好的氢键作用结合到目标分子, 但具有不利的构象变化。化合物B的结合主要是疏水作用, 而氢键和疏水作用对于目标与化合物C的结合有利。

若仅从亲和力数据来看, 这些化合物似乎是相同的。然而, 焓变 (ΔH) 和熵变 (ΔS) 的不同却揭示其结合机制本质上的不同。化合物A 具有有利的结合焓变 (ΔH) 表明该相互作用是由氢键和范德华力所驱动。然而, 这一过程的熵变不利, 说明构象可能会对结合有影响。化合物B具有基于疏水作用的结合亲和力, 正如其非常有利的熵变 (ΔS) 以及不利的焓变 (ΔH) 所示。这可能是由于表面脱水作用和极性相互作用总数的减少所致。化合物C显示兼具有利的氢键和范德华力以及疏水作用的结合亲和力。

最大限度提高化合物结合选择性的一个策略是挑选表现出最有利的焓变 (ΔH) 的化合物分子 (图9)。一个羟基基团 (红色箭头所示) 被引入到图8A 中的化合物上以形成氢键, 正如X射线结构所预测。尽管图8B中化合物的焓比图8A中的化合物更有利, 但是如果优化流程只是遵循亲和力信息, 则这个优化的化合物可能已经被丢弃。在图8C中, 羟基取代基的立体化学经过修饰, 具有了高度焓驱的特性, 却无需补偿因内部氢键断裂而引起的熵。这是一个关于热力学解析的亲和力被用于理解和指导先导化合物优化的完美例子。

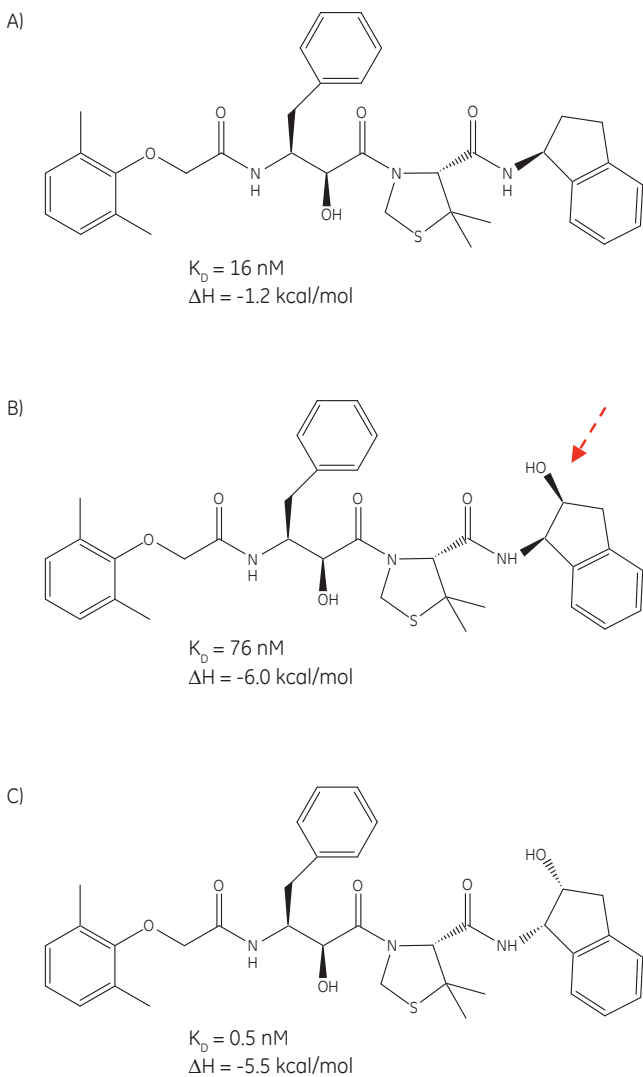


图9. 使用焓变信息作为指导针对plasmepsin II的先导化合物优化。数据由Johns Hopkins University 的Ernesto Freire 友情提供。

用正交方法对候选化合物进行自信的选择

传统的构效关系(SAR) 研究一般使用亲和力 (K_D) 或 IC_{50} , 它们通常与热力学术语 ΔG 有关, 来作为生物学活性的指标。通常情况下, 先导化合物优化主要是通过引入亲脂基团到其分子结构中来填充靶标的亲脂性口袋, 这是一种基于熵驱的优化。反映优化的较好的响应可能是滞留时间 (t_5) 和/或焓效率, 因为它们更好地反映化合物与靶标之间的相互作用。通常而言, 由氢键和范德华力驱动的化合物-靶标互作是焓有利的。具有更长滞留时间的相互作用拥有更好的药效和更长的给药间隔 (6)。基于SPR分析的结合/解离速率图 (图10A) 以一种富含信息的方式将亲和力进行解析, 并展示了这些亲和力数值在解析为结合和解离速率后的分布是如此的广阔 (7)。例如, 在灰色区域中的化合物都具有大约 $1 \mu M$ 的亲和力, 但它们却具有非常不同的结合和解离速率。这些变化影响了小分子在其靶标的上的滞留时间, 进而影响了药代动力学和药效学。具有快速的结合和解离速率以及快速清除的化合物需要频繁的给药, 而具有更低的解离

速率的化合物更可能需要更少的用药次数。具有低解离速率的化合物通常也会将自己“藏在”靶标蛋白的结合位点内, 从而避免被酶解。

ITC数据也可以通过类似的方式展示 (图10B)。图中的每条对角线代表等亲和力线, 而x 和y 轴上的数值则分别显示焓和熵对结合过程的贡献, 进而获取关于结合机制的深刻理解。

通过利用这种方式对结合数据进行解析, 研究者可以更加容易的开展构效关系 (SAR) 研究, 并基于此对化学骨架进行选择 and 先导化合物的优化。同时, 兼具最佳热力学和动力学特征组成的化合物也很容易被鉴定出来 (图11)。在大多数情况下, 一种最佳的化合物分子应该是一个强劲的熵驱互作过程并具有缓慢的解离速率, 表明其在靶标蛋白的结构“口袋”中可以滞留较长的时间。

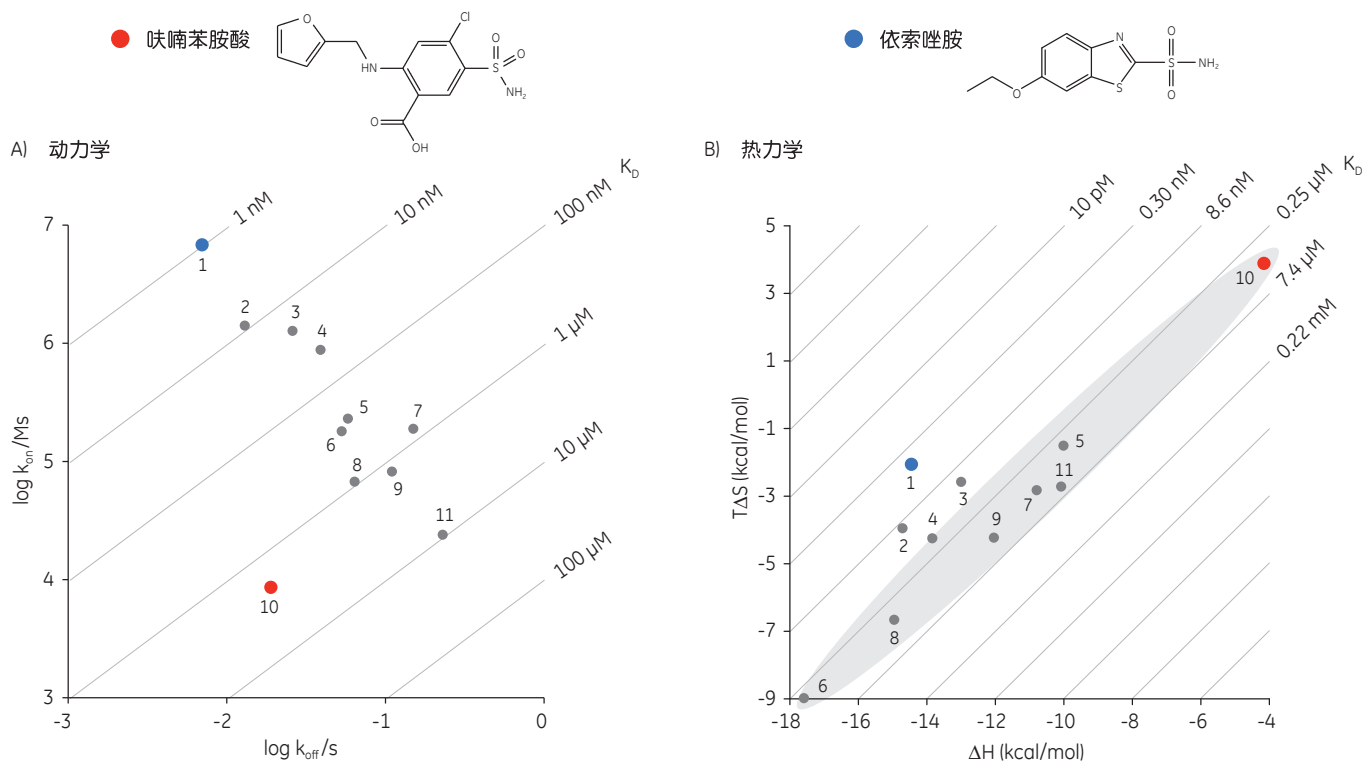
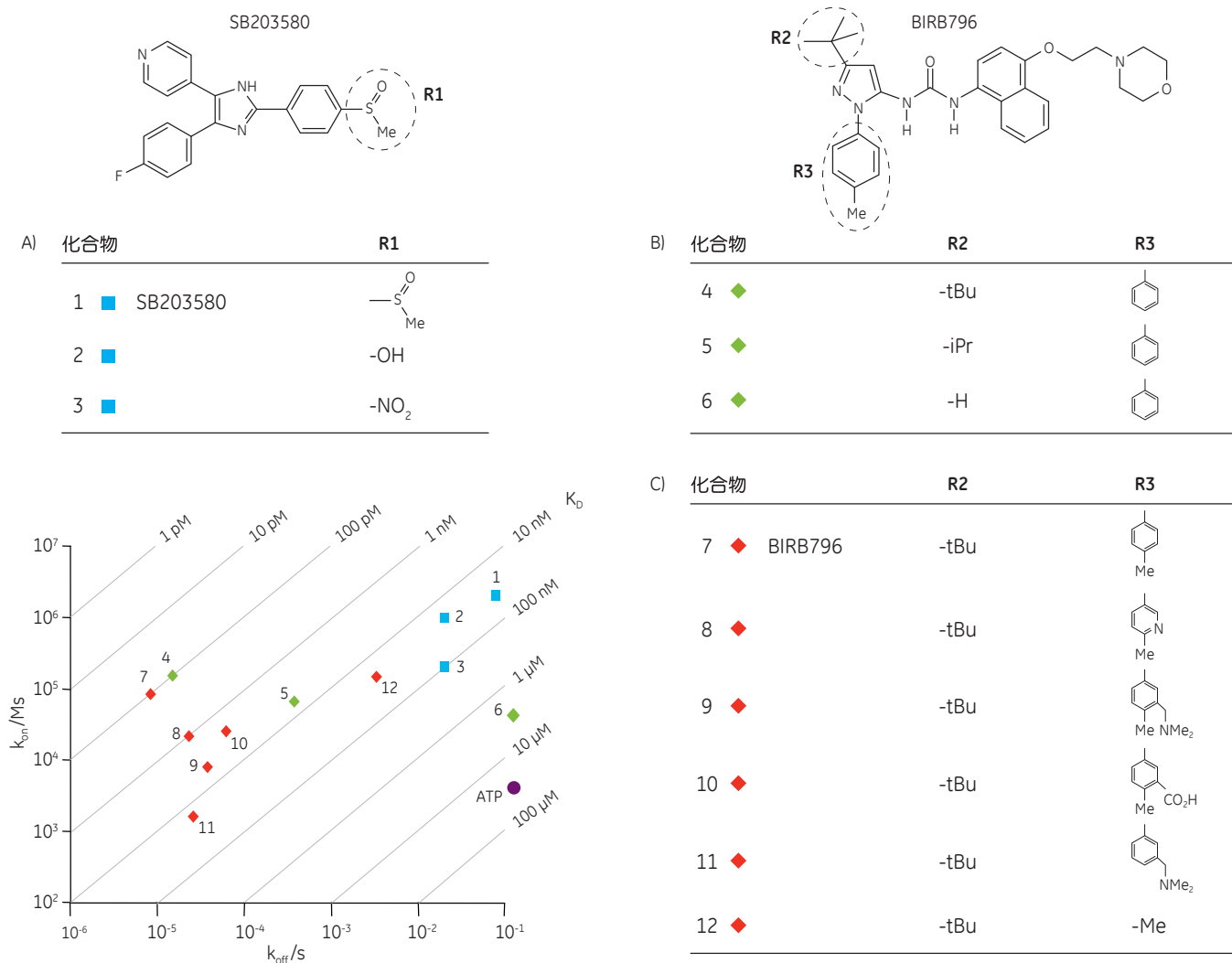


图10. 通过结合 (A) 来自SPR 的动力学数据和 (B) 来自ITC 的热力学数据, 构效关系能够被解析, 并可以选择正确的化合物用于优化。相对于仅使用亲和力, 综合考虑滞留时间 (解离速率) 和焓效率可能反映更好的治疗活性。灰色区域显示在具有相近 μM 级亲和力的结合物中, 焓/ 熵贡献 (焓/ 熵互补) 中的巨大差异。



高效检测与非靶标蛋白的结合

最大程度的降低药物分子与非靶标蛋白的结合在药物设计上与优化配体- 靶标相互作用同样重要。已知血清蛋白, 如人血清白蛋白 (HSA) 和 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白 (AGP) 能够随意的结合有机药物分子。这些血清蛋白在体内以高浓度进行循环, 因此, 与血浆蛋白之间高达 μ M 级的亲和力可能会对化合物药效产生相当大的负面效应。

在图12 中, ITC被用来测定不同的蛋白酶抑制剂与 $\alpha 1$ 酸性糖蛋白 (AGP) 和人血清白蛋白 (HSA) 之间结合的亲和力和焓变 (图12)。

SPR 是一种可以同时测定与HSA和AGP结合的出色工具。图13显示了多种针对于碳酸酐酶 (Carbonic Anhydrase, CA)、激酶和凝血酶的抑制剂与这两种血浆蛋白结合水

平的分级。其中多种先导化合物展示出与HSA和AGP之间较强的不利结合。

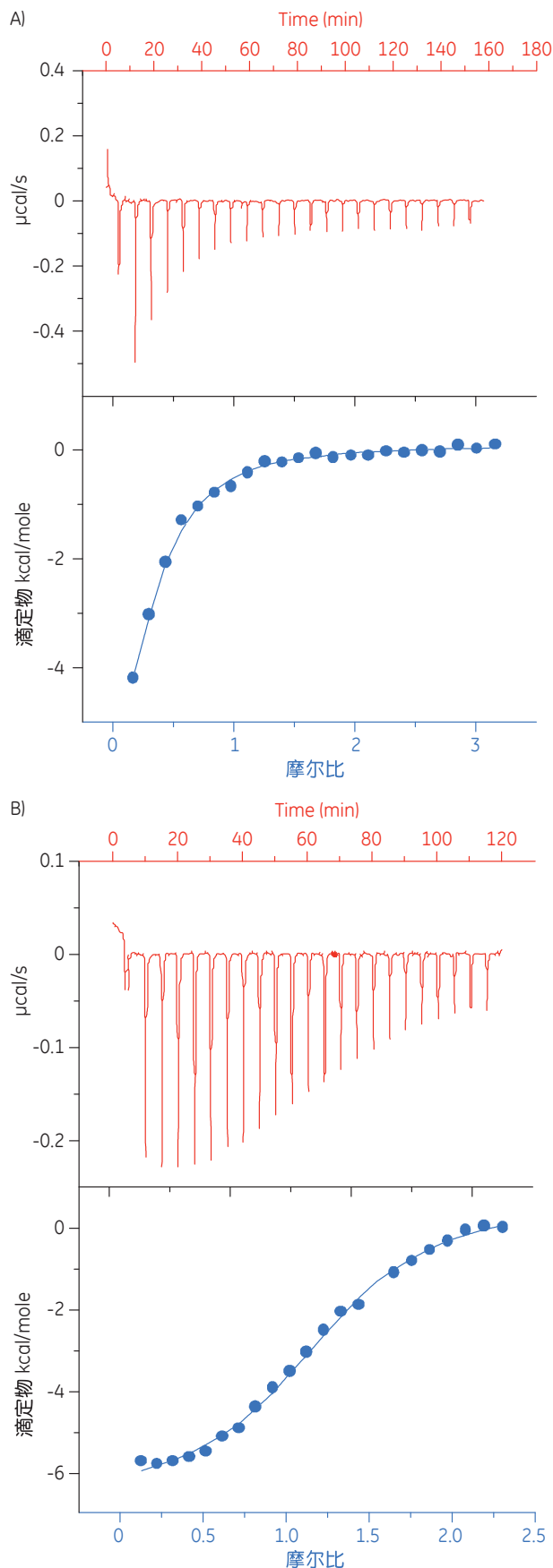


图12. AGP 与 (A) saquinavir, (KD 4 μ M) 和 (B) ritonavir, (KD 0.8 μ M) 的量热滴定。这些高的亲和力表示这些化合物与血清蛋白发生强结合。

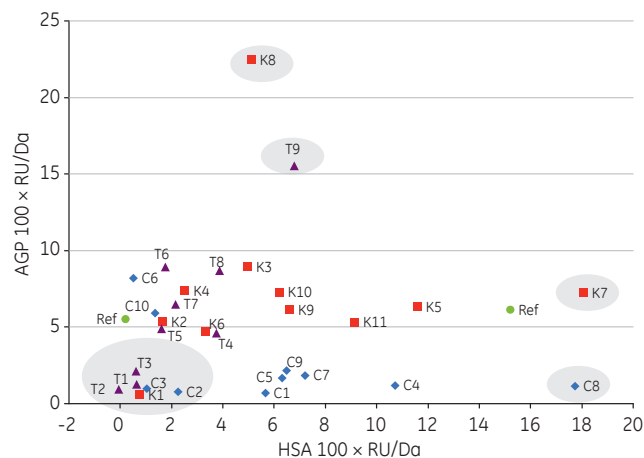


图13. 对于一系列碳酸酐酶 (C)、激酶 (K) 和凝血酶 (T) 的抑制剂与 HSA 和 AGP 结合的基于 SPR 的分级。多个先导化合物 (T9, K8, K7 和 C8) 显示与 HSA 和 AGP 非常强的结合。接近 0/0 的化合物显示与 HSA 和 AGP 非常弱的结合。

结论

SPR和ITC是一套从整个基础研究直至临床前阶段的药物开发过程中都能够使用的技术，从利用差式扫描量热法 (DSC) 对目标蛋白质量进行控制到利用SPR/ITC确定作用机制(MOA)。同时对源自HTS 的目标化合物的二次筛选、对片段和定向文库的初次筛选从而消除假阳性结果、鉴定真正的1:1 结合物也是一个重要的应用领域。使用滞留时间和焓值进行SAR 和QSAR 研究是先导化合物优化的重要原则，这将有助于理解药效，并对先导化合物的药代动力学和药效学性质作出正确的解释 (5,6,8)。我们相信，这些生物物理方法的潜在在今天仍然没有被充分发掘，如果能够更好地使用SPR，ITC和DSC这一无标记生物物理平台，将会大大提高药物开发流程的效率。

1. Hajduk, P.J. and Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 211-219 (2007).
2. Huber, W. A new strategy for improved secondary screening and lead optimization using high-resolution SPR characterization of compound-target interactions. *J Mol Recognit.* 8, 273-81 (2005).
3. *Drug Discovery Today* 13, 869-874 (2008).
4. Ferenczy, G.G. and Keserü, G.G. Thermodynamics guided lead discovery and optimization. *Drug Discovery Today* 15, 919-932 (2010).
5. Copeland, R.A. et al. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev. Drug Discov.* 5, 730-739 (2006).
6. Andersson, K. et al. Label-free kinetics binding data as a decisive element in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 1, 439-446 (2006).
7. Markgren, P.-O. et al. Relationships between structure and interaction kinetics for HIV-1 protease inhibitors. *J. Med. Chem.* 45, 5430-5439 (2002).
8. Gabriësson, J. et al. Early integration of pharmacokinetic and dynamic reasoning is essential for optimal development of lead compounds: strategic considerations. *Drug Discovery Today* 14, 358-372 (2009).

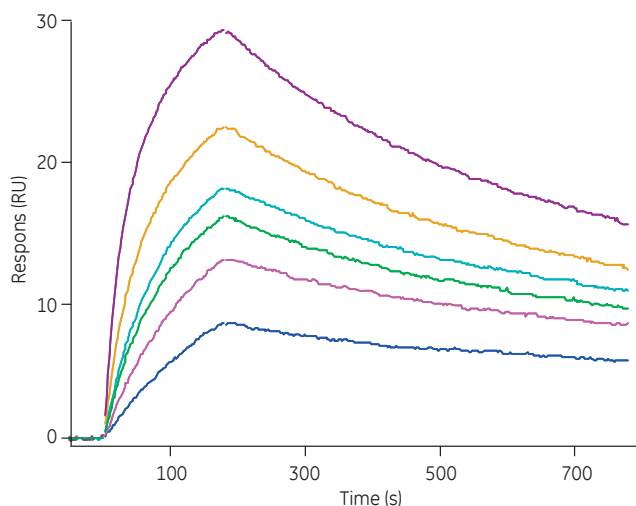
技术概述



采用Biacore 系统进行结合强度及动力学分析

Biacore 系统采用表面等离子体共振 (SPR) 原理实时监测分子间相互作用。无需标记, Biacore分析系统便可提供结合亲和力、动力学及分子间相互作用特异性等方面的信息。此外, 生物分子的活性浓度也可以被测定。相互作用的分子之一被固定到传感器表面上, 而另一分子则在溶液中流经传感器表面。这两种分子之间发生的任何相互作用可通过传感器界面附近的质量浓度变化而被实时监测, 产生的结合数据以SPR的共振响应单位 (RU) 对时间所形成的传感图显示出来。

在相互作用过程中, 复合物的形成与解离情况可通过结合曲线的形状所得出的结合动力学数据 (k_a , k_d) 被跟踪。更多信息参见www.gelifesciences.com/biacore

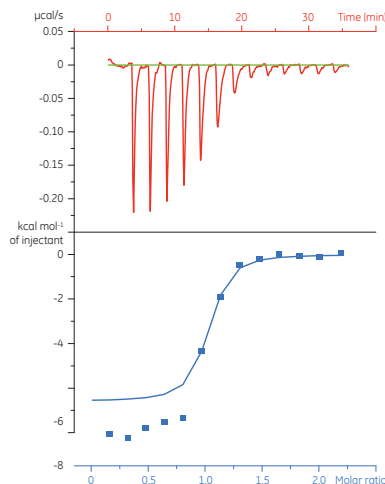


采用MicroCal ITC 系统进行结合强度及热力学分析

等温滴定量热仪 (ITC) 可在无需标记的情况下, 在单一实验中测定多个结合参数 (n , KD , ΔH , 和 ΔS)。

对一种生物分子的溶液用其结合配体的溶液来滴定, 分子间相互作用时释放/ 吸收的热能(ΔH) 被全程监控。每一个峰值代表一个小量样品被滴入时引起的热量变化。当持续的样品被滴定到等温滴定量热仪的样品室中时, 热量吸收或释放的量与分子结合数量成正比。当结合达到饱和后, 热量信号衰减直至仅有稀释热可被检出。从以热量对样品室中配体与结合物之间的摩尔比所作的结合曲线中可以测定 KD , n , 和 ΔH 。

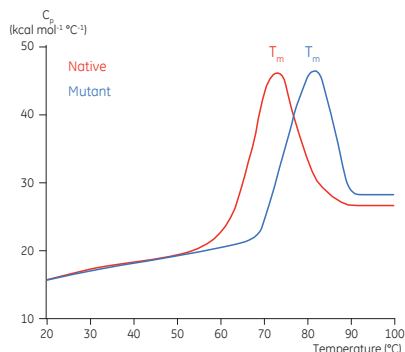
更多信息参见 www.gelifesciences.com/microcal



采用MicroCal DSC 系统进行蛋白稳定性分析

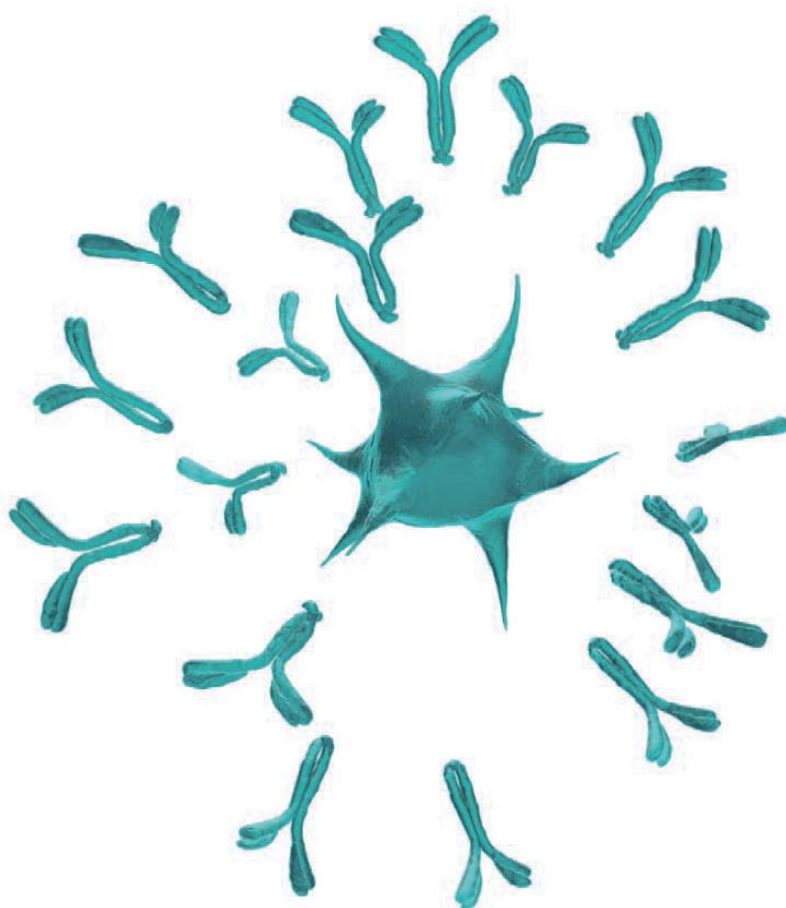
在差示扫描热量仪 (DSC) 中, 当一个生物分子以恒定的速率被加热时, 天然状态的蛋白与热变性相关的热量变化可被测定。所测定的转变中值(T_m) 可被当作一个快捷简便的稳定性指标, 应用于整个生物治疗分子开发和制剂选择过程中。热稳定性的升高或降低可通过观测 T_m 改变来判断。高 T_m 数值反映了高的热稳定性, 与长期稳定性相关性良好。

更多信息参见www.gelifesciences.com/microcal



非标记技术生物药物研发中的应用

-----利用Biacore™系统及MicroCal™系统作非标记的相互作用分析



引言

过去30年以来，重组蛋白、治疗性抗体及疫苗早已改变了我们对新药研发方式的看法。重组胰岛素在1982年首次通过批准，迄今已经对糖尿病的治疗带来了巨大的影响。治疗性抗体已经给关节炎及癌症的治疗带来了新的突破，而寻找疫苗以对抗HIV及其他传染性疾病的运动正方兴未艾。新的发展方向包括寻找那些作用持续时间更长、副作用更少、特异性更高或针对新靶点的药物变体。某些分析技术在生物药物开发的过程中扮演着重要的角色。在分子间相互作用模型分析的基础上，对候选药物的筛选提供了指南。这些分析技术可以指导细胞培养以及下游工艺的开发。它们既保证了药物蛋白质量的关键属性，同时又保证了高产量。这些分析技术还能用于药物动力学研究，以及检测及监测一些不良免疫原反应，譬如抗药性的抗体的出现。

GE医疗集团生命科学部的非标记分析平台可以提供关于蛋白热稳定性、蛋白活性浓度、结合化学计量比、结合特异性、亲和力、结合动力学及能量学等的信息。

动力学分析（Biacore系统）能够给出药靶复合体的形成速率及其稳定性等相关信息。这些数据对于预测药物和靶标的作用机制以及药物的在靶停留时间很重要，因此能与药效关联起来。热力学分析（MicroCal系统）能够帮助人们深刻理解蛋白构象的稳定性，并且可以指导药物制剂的开发。一般而言，MicroCal系统提供的是关于化学计量比、结合能量学及蛋白稳定性等的信息。这些非标记的生物物理技术在生物药物的发现和开发的各个阶段（图1）都做出了无价的贡献：从最初的药物发现一直到候选药物的筛选和优化，到临床前试验和临床试验中的免疫原性研究，再到质量控制。

非标记的相互作用分析使我在生物药物的开发中能够：

- 信心百倍地通过配体结合特征来检验靶药；
- 通过验证蛋白稳定性/活性来评估降解/凝集的风险；
- 通过筛选和早期结合特征来有效地遴选候选药物；
- 通过深入的结合特征来判定候选药物的特异性、药物在靶停留时间及结合模式。



图1： 生物治疗药物开发的示意图。

蛋白工程

基于靶标的药品物开发有以下几点要求。首先，所识别的生物靶标必须具有相关于某种发展的成因活性。其次，该靶点必须加以表达和纯化，且质量必须得到控制。第三，那些能够调控靶点活性且没有或存在有限不良反应的（从而使不良反应受限或没有）的阳性对照需要加以鉴定、表达和纯化。

一旦选中了靶点，就必须获得一种蛋白源以进行后续研究。对于重组蛋白，将会立即关注到表达、稳定性、活性等方面。

差示扫描量热(DSC)技术可解决的问题诸如：蛋白是否是恰当折叠的、均一的及热稳定的。

而来自等温滴定量热(ITC)实验的化学计量数据描述的则是蛋白质中负责与药物结合的部分。

另一方面，表面等离子共振(SPR)技术可用于指示靶标与阳性对照或候选药物结合时是否表现出“正确的”动力学特征，同时也可用于展现靶标蛋白的活性水平。

评估蛋白稳定性及可生产性以避免后期并发症

DSC数据可用于蛋白工程期间的构象筛选。 T_m 值的下降象征着稳定性的降低，这意味着构象的化学降解风险及结构降解风险会有所上升。同时，由于聚集效应倾向于随时间流逝而增强，所以其长期的不稳定性风险也会有所提高。在Applied Molecular Evolution公司施行的一项研究中(1)，利用DSC研究的母源IgG抗体展示出4种截然不同的去折叠结构域（图2A）。每个峰形对应着一个特定去折叠结构域，过渡温度从 T_{m1} 到 T_{m4} 。

抗体接受蛋白工程以便改进效价，并在第1轮筛选之后选中了抗体Ab 1。用作该抗体衍生生物的热稳定性表征。结果发现，抗体Ab 1的热稳定性低于母源蛋白（图2B）——其值较低。第2轮蛋白工程改造及筛选之后得到了抗体Ab 2（图2C）。该抗体的 T_{m1} 与母源复合物具有可比性，这意味着相似的稳定性属性。

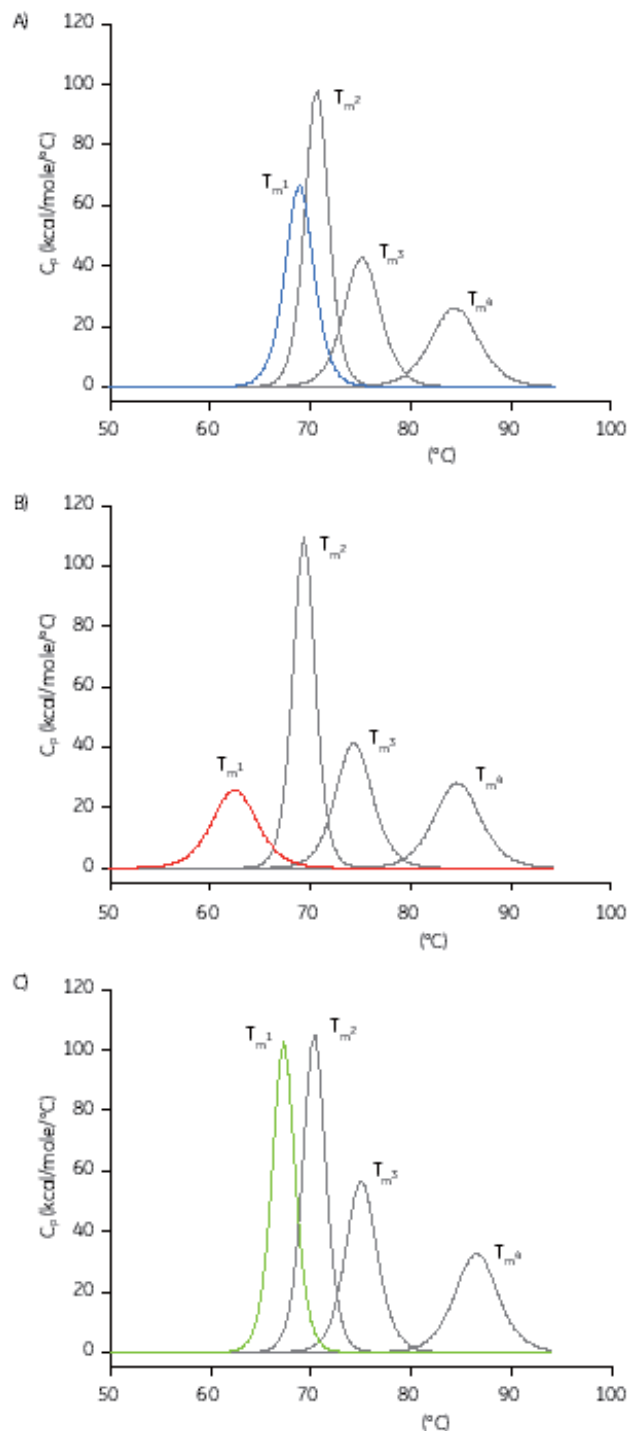


图2：抗体构象的去卷积DSC温谱图：(A)母源抗体Ab；(B)接受蛋白工程之后的抗体Ab 1；(C)接受蛋白工程之后的抗体Ab 2。经Applied Molecular Evolution公司许可引用；Applied Molecular Evolution是美国礼来公司(Eli Lilly and Company)的一家全资子公司。

基于DSC的稳定性预测与加速稳定性测试后所做的HPLC分析结果有着很好的一致性（图3），这证实：在60°C下贮存5天之后，即使T_m值最低的蛋白也会表现出最高的聚集水平。同样地，利用DSC得到的直接稳定性表征与加速稳定性研究得到的回收可溶蛋白的测量结果也有着很好的一致性。

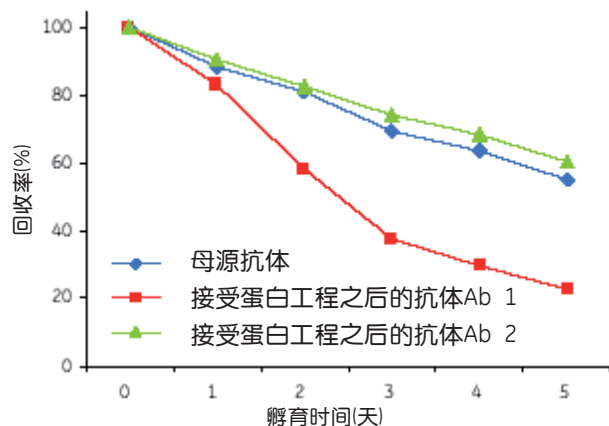


图3：加速稳定性研究（60°C下放5天）之后的可溶蛋白比例。经Applied Molecular Evolution公司许可引用；Applied Molecular Evolution是美国礼来公司的一家全资子公司。如图2所示，这些抗体的DSC温谱图明显不同，这与t=0时收集到的SEC抗体回收测量数据相对应。在这个时间点，SEC无法区别物理不稳定性的程度，因此，也就无法区别这3种抗体构象的聚集倾向性。

通过验证蛋白活性而保证数据质量

在下面这个例子中，利用了ITC技术来测试两批靶蛋白的活性水平——筛选过程会用到这两批靶蛋白。在这两种情况下，每批蛋白的滴定均采用了靶标结合比例已知为1:1的参照分子试剂。

图4A给出了作为摩尔比函数而变化的热量，这时采用了阳性对照试剂来滴定第1批靶蛋白。结合点个数显示为1.05，这表明基本上所有蛋白均是活性的。图4B给出了阳性对照试剂滴定第2批靶蛋白的结果。结合点个数为0.23，这表明靶标蛋白并不是完全起作用的，只有23%的靶标蛋白是活性的。根据该信息，可以质疑第2批靶蛋白是否应该用于下游的筛选过程。

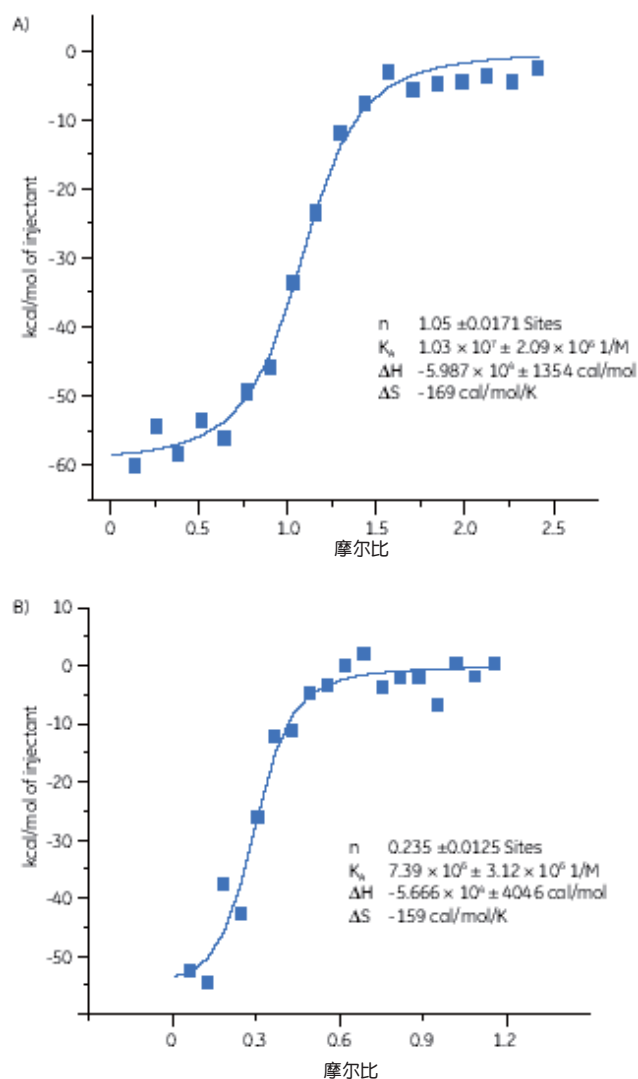


图4：结合的化学计量信息是来自ITC实验的一个重要参数，它可以区别：(A)纯蛋白；与(B)折叠不佳的、无活性的蛋白。

克隆的表达与遴选

不论是使用杂交瘤细胞，还使用重组表达系统，克隆的遴选都是避免后期失败的关键步骤。一些参数，诸如表达水平的高低、靶标结合的特异性的强弱以及结合稳定性的好坏，对筛选成功的克隆都是极其重要的指标。筛选过程涉及的样本数目变化很大，甚至多达上千份样本。因此，通常会采用一种多步骤方法；如图5所示。在筛选的早期阶段，通常都是一定体积的，未作处理的样本。

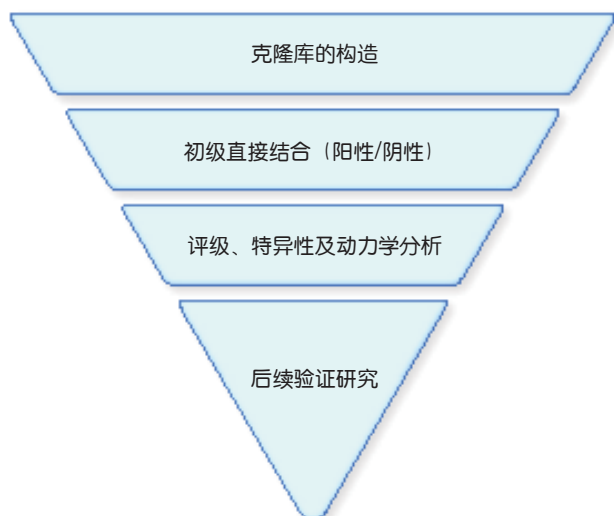


图5：克隆的表达与遴选过程示意图

这里采用了SPR技术（Biacore系统）来有效遴选克隆：在相关的缓冲条件及温度下，测量结合的动力学参数及浓度，选中那些表达水平高、靶标特异性强及结合稳定性好的克隆。此外，还会进行候选药物的表位结合/定位实验。

与那些“一步法”的技术相比，如通常用于初级筛选的ELISA技术，基于SPR技术的Biacore系统能监测及量化分子间的相互作用，并且还能够给出动力学信息和结合强度（亲和力）。尤其是可以用解离速率(off-rate)作为指标来区分不同的克隆分子。这是因为：解离速率与药物的在靶停留时间直接相关，进而与药效相关联。

与ELISA相反，使用Biacore系统时不需要任何种类的二抗，也不需要作任何标记。对一些复合体样品，譬如采集的细胞培养上清液，可以直接进行分析，无需冗长繁琐的样品制备过程。

根据动力学信息做最佳选择

在爱尔兰都柏林城市大学生物医学诊断学院的一个项目中^[2]，考察了一个源自噬菌体展示scFv组合库的大量样本。在这次筛选中，每次进样采用的样品都是未经纯化处理的。18小时之内，分析了960份样本，并根据结合稳定性的不同进行了评级。这些数据的分析和评定仅仅用了不足一个小时的时间。

利用叠加图（图6）观察数据，可以立即得到数据质量的第一评估印象。再下一步，利用解离报告点的散点图（图7）来选择最稳定的结合剂；第一组报告点位于解离早期，第二组报告点位于解离后期。

从散点图中可以分出两组scFv：靠近原点的非结合剂（红色）；以及斜上方的结合剂（绿色）。结合稳定性高且解离慢的最佳结合剂用蓝色方块表示。（图7。）

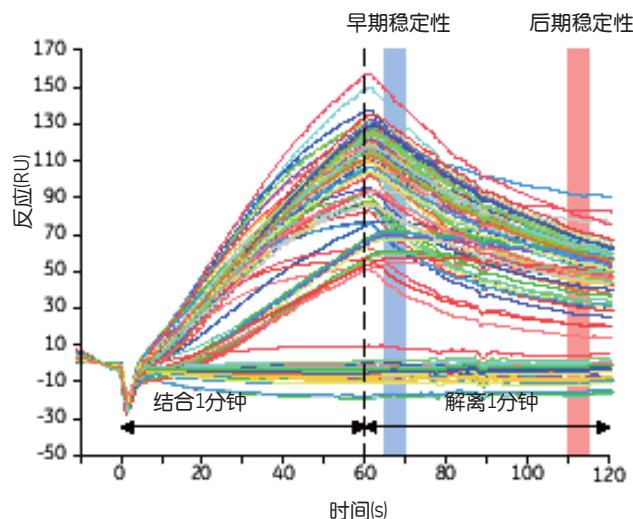


图6：120份样本的传感图，这里给出了评级时用到的报告点。剩下的复合体稳定性比例=（后期稳定性/早期稳定性）×100。

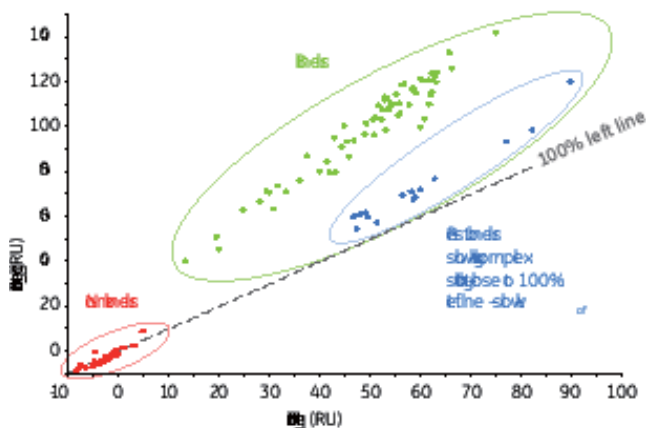


图7：用于识别稳定结合剂的散点图（早期稳定性对后期稳定性）。最佳结合剂用蓝色方块表示，而绿色结合剂是不稳定的。经爱尔兰都柏林城市大学生物医学诊断学院许可引用。

为了获得全面的分子间相互作用的动力学信息，也为了优化选择过程，可以采用“2-over-2”动力学方法来进一步分析筛选实验中获得的前10%的结合剂。利用这种方法，动力学分析将关注于高亲和力的结合剂。由于分析物只有两种浓度，分析时间会保持较短，而样本消耗量也保持较低。在Biacore 4000系统中，能同时监视最多8种scFv-抗原间相互作用，从而实现了高通量的动力学分析（图8）。

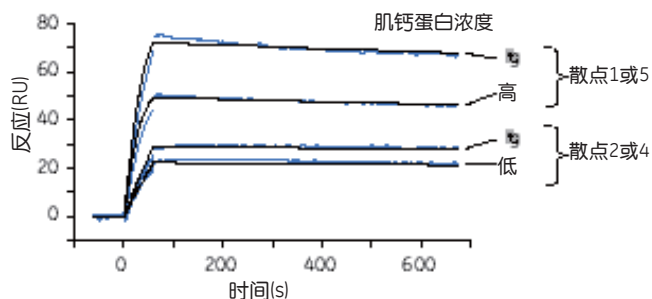


图8: scFv-肌钙蛋白间结合的“2-over-2”动力学信息叠加图。两种不同密度的捕获分子各固定一半在样品通道上。

为了保证这些抗体片段在最终诊断检验时的稳健性，可以使用Biacore 4000系统来监测在不同温度下的scFv-抗原间相互作用。在25°C和37°C下，分析了很多亲和力处于次纳摩级的scFv，并根据不同的动力学行为分成两组（图9）。其中一组scFv为了补偿温度提高时的解离速率增长而平行地提高了结合速率，从而表现出一种对温度稳定的

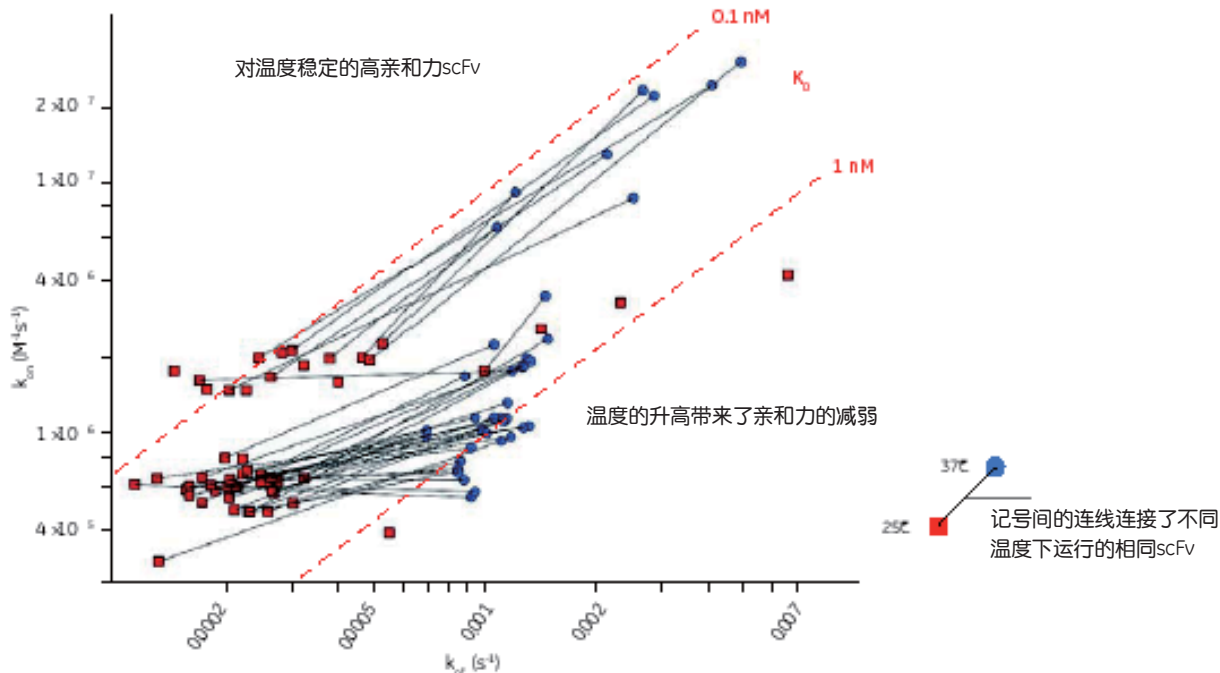


图9: scFv特异于肌钙蛋白的结合速率/解离速率图表；所呈现的数据选集来源于爱尔兰都柏林城市大学生物医学诊断学院施行的研究。对温度稳定的高亲和力抗体组可能是最稳健的，也最适合于在多变温度下进行诊断性分析。图表由Spotfire生成™。

亲和力。另一组scFv在较高温度下表现出较弱的亲和力。该信息可用于评估抗体片段在诊断检验用时的稳健性，也可以在生物制药的开发过程中很好地反应药物在活体内的情况。

有效的表位筛选

根据最终的应用不同，表位筛选可以依据表位结合情况对候选药物进行排序，或者也可以选择表位特异性相容的配对抗体用于诊断检验当中。

利用Biacore系统作表位筛选的常用方式是，在组合设置中两两配对地测试所有抗体。接着，在结果矩阵中显示出相对的结合水平/解离速率数据，这样就可以鉴别出结合剂及非结合剂。

Biacore 4000软件配有多种预定义的设置/评价方法，其中就包括了成对式抗原表位筛选的方法。这种预设的方法减少了动手做实验的时间，同时将可能发生的错误最小化。结果显示在一张综合的颜色编码表中（图10），查看也非常方便。

	Ab1	Ab2	Ab3	Ab4	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8
Ab1								
Ab2	3.9E-002		4.9E-004	6.2E-002	2.2E-002			
Ab3		4.4E-002		1.9E-001		4.6E-004		
Ab4		4.9E-002				5.1E-002		
Ab5								
Ab6			3.2E-004					
Ab7			3.7E-004					
Ab8								

图10: 为了方便查看，结合剂/非结合剂的表位筛选结果采用了不同的颜色进行了分类。蓝色=阳性结合剂（单独的表位），黄色=非结合剂（相同的表位），白色=信息不可用。

候选药物的特征化和优化

筛选出那些蛋白能特异性表达且在靶停留时间理想的一定数量的克隆分子之后，通常会着手进行详细的特征化和优化。

详细的特征化会涵盖特异性、选择性和结合稳定性的进一步分析，还包括药物靶标之间相互作用的驱动力研究。接着，可以进行药物蛋白的性能的进一步优化，通过引入点突变来影响药物与靶标的结合、蛋白的稳定性或翻译后修正（如糖基化）。但是，在引入变化的同时，必须要保证关键的结合属性和生物功能不能发生改变。

在这个阶段中，Biacore系统具有非常典型的应用，内容包括：药靶特异性结合的特征分析；选择性的研究；高精度的解离速率分析；药物结构-活性关系的研究；以及在相应得缓冲条件和温度下的活性浓度分析。

ITC在这个阶段通常用是另一个附件的标准，用于选择最有前途的治疗性候选药物。ITC可以直接测量热力学参数，帮助深入的理解总结合能量（ ΔG ）和“锁-钥”驱动力：总结合能量与亲和力常数（ K_D ）直接相关，而“锁-钥”驱动力（如氢键和范德华力）的相互作用也与纯疏水力的相互作用不同。

动力学特征表现出药物开发期间的选择效应及饱和效应

在KaloBios Pharmaceuticals Inc.公司实施的一项研究中，使用了Biacore系统来特征化大量不同Fab以进行高精度的动力学分析。这个分析是在生理学温度下进行的，以便为后续的细胞/动物实验及下游的临床应用提供相关的预测。

首先，高亲和力的鼠源抗体在接受蛋白工程改造之后转化为人源抗体。其次，建立一个改造后的人源Fab库，这个Fab库在菌落转移分析实验中会接受高严格度/低严格度的筛选，并使用Biacore系统对得到的样本进行动力学信息的特征化。最后，最佳结合剂会出现亲和力的饱和效应，接着再利用Biacore系统进行动力学信息的特征化(3)。

高精度的动力学信息特征化带来了一幅清晰的图像，描绘出在人源Fab开发期间所发生的变化。与鼠源Fab A相比，低严格度筛选出的Fab的亲和力明显降低，这绝大部分是因为解离速率提高而促成的。提高筛选的严格度，选择出亲和力接近或优于鼠源Fab的Fab；改进后的筛选过程则重点关注解离速率的降低。（图11。）

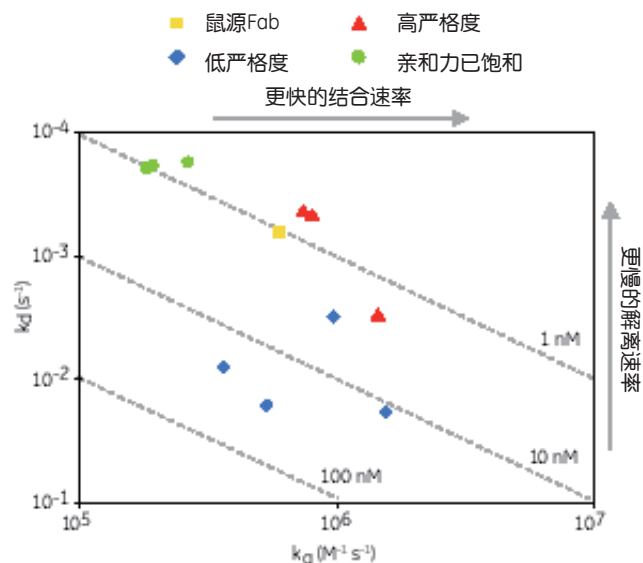


图11：解离速率/结合速率的映射图表明了结合亲和力与速率常量的解析度。 k_d （反转刻度，y轴）相对于 k_a （x轴）的对数做图，解离速率/结合速率的变化方向如箭头所示。在这幅图中，亲和力（ k_d/k_a ）的增长方向从左下角到右上角，得到了几条等亲和力的斜线。

接着，在细胞毒性实验的基础上，比较Fab的结合属性与其治疗性能，根据降低细胞毒性水平的能力来判断抗体的效价。在这些实验中，细胞毒性的保护与Fab解离速率的关联性要比结合速率紧密得多。这表明，在这种情况下，解离速率常数是Fab活性的最佳预测参数，而且利用Fab筛选过程中的解离速率的偏差，这次实验中成功地生产出了药效更高的蛋白药物（图12）。

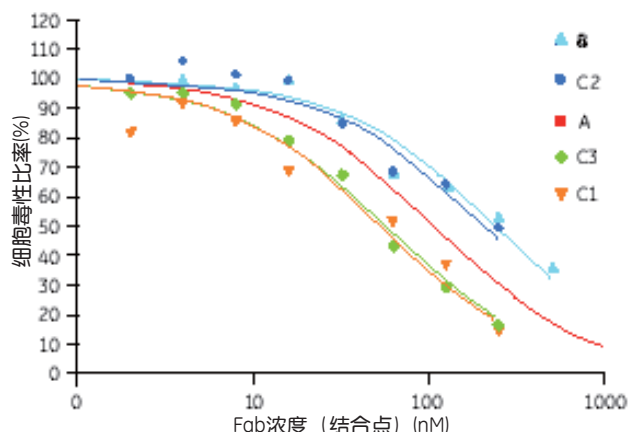


图12：在基于细胞毒性保护的实验中，Fab治疗功能与Biacore所推导结合参数的相关性。细胞毒性保护实验的数据表达。

鉴别出结合能量最理想的突变

利用ITC，“锁-钥”驱动力（譬如氢键和范德华力）的相互作用（与 ΔH 相关）可以与纯疏水效应的相互作用区分开来。因此，最大化结合选择性的策略之一就是，找出那种表现出最理想焓变（ ΔH ）的结合剂。

在下面这个例子中，利用ITC研究了溶菌酶与3种抗体片段之间的相互作用，得到的热力学特征如图13所示。从ITC数据可直接推导出 ΔH ；采用1:1理想结合模型拟合数据可算得结合常数 K_A ；根据结合常量则可推算出 ΔG 的值（ $\Delta G = -RT \ln K_A$ ），再根据公式 $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ，即可算得 $T\Delta S$ 的值。

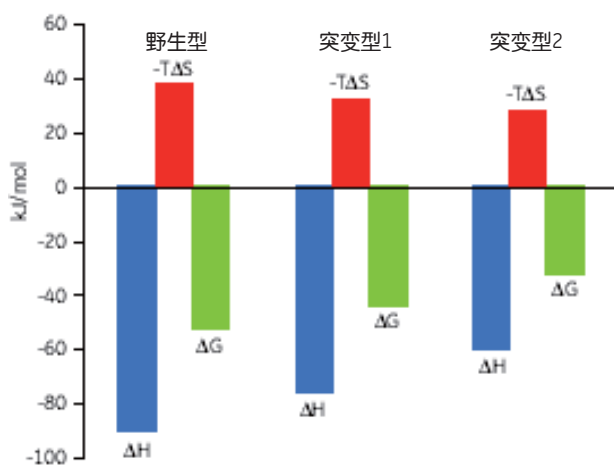


图13：溶菌酶与3种抗体间相互作用的热力学特征图。

这些测量表明，对于野生型抗体和突变型抗体而言，其相互作用都是焓变驱动的，焓变没有受到突变的明显影响。相反，突变型抗体的 ΔH 值低于野生型抗体，这意味着，突变型抗体不能再形成像野生型抗体那样的高能键。

活性结合浓度在研究突变变体时的重要性

精确测定靶标/候选药物活性结合浓度所带来的无价数据可用于评估结合的活性、稳定性及批次间的一致性。与那些基于吸收性的测量蛋白总含量的技术不同的是，ITC（图4）和Biacore系统有能力测得活性结合浓度。活性浓度的正确判定能反映出特定的结合活性，并且对正确判定亲和力/动力学信息也很重要。

Biacore系统提供了两种浓度测量方法：(i) 传统的标准曲线法；及(ii) 无需校准的浓度分析法，这种测量方法的优势是不需要标准品。

传统的标准曲线法设置与其他技术用到的实验设置并无不同，只不过这里是非标记的。第二种方法的设置是Biacore系统预设好的：即使没有任何标准品可用，它也能带来一种判定浓度的崭新方法。毕竟校准用的标准品有时候是不稳定的或是难以监测到信号的(4)。

一项关于结合点定向突的研究很好的阐明了活性浓度分析对动力学/热力学分析的重要性。

半胱氨酸蛋白酶抑制剂B共生成引入4种突变，以便研究其与木瓜蛋白酶结合期间涉及到的氨基酸。利用A280来测定突变体的总浓度，并使用CFCA来评估活性蛋白的浓度（图14）。

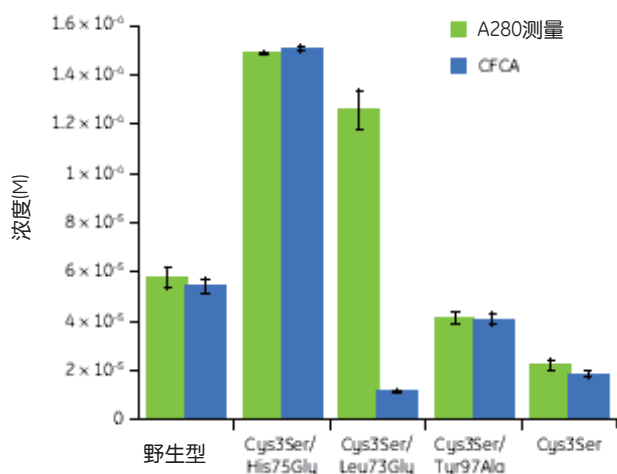


图14：比较A280测得的抗体总浓度与CFCA方法判定的活性蛋白浓度。

只依赖吸收性数据会导致这样的结论：Leu73Gly对于结合速率而言很重要，它带来的结合速率比其他的突变体要慢10倍。作为对比，CFCA测出了明显更低的活性蛋白含量，这带来了另一种解释，并可以更准确地评估 k_a 、 K_D 及靶点突变效应。

结论

非标记的生物物理方法为生物治疗药物发现-开发的所有阶段带来了无价的贡献，而且这些方法还能用于临床前研究及临床研究。GE医疗集团生命科学部带来的非标记分析平台可用于判定活动结合浓度、化学计量、亲和力、动力学、热力学及蛋白稳定性等信息。

动力学的特征化（Biacore系统；SPR技术）提供了靶药复合物的形成速率及其稳定性的相关信息，而一些热力学研究（MicroCal系统；DSC/ITC技术）则用于解决、理解蛋白稳定性及热力学的相关事宜。

运用这些技术，可以评估靶标蛋白的质量，并根据相关疗效参数而选择初始的候选药物。

在候选药物的优化期间（不论是通过氨基酸序列突变，或是通过氨基酸序列结合），均可以使用SPR、ITC及DSC来进行监测，以维持譬如特异性、活性之类的参数，同时还能提高药物的血清半衰期及在靶停留时间。

参考文献

1. Park, C.-H. Engineering monoclonal antibodies to enhance drugability: A case study. MicroCal Application note DSC340 (2008).
2. Application note: Resolving a bottleneck in screening and characterization of recombinant antibody fragments using Biacore 4000. GE Healthcare, Code no. 28-9777-72.
3. Application note: Selection of protein therapeutic candidates using Biacore T100. A critical role for high-resolution kinetics in assessment of engineered human Fabs. GE Healthcare, Code no. 28-9214-29.
4. Hajduk, P.J. and Greer, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 211–219 (2007). Edition AA (2010).

技术概述



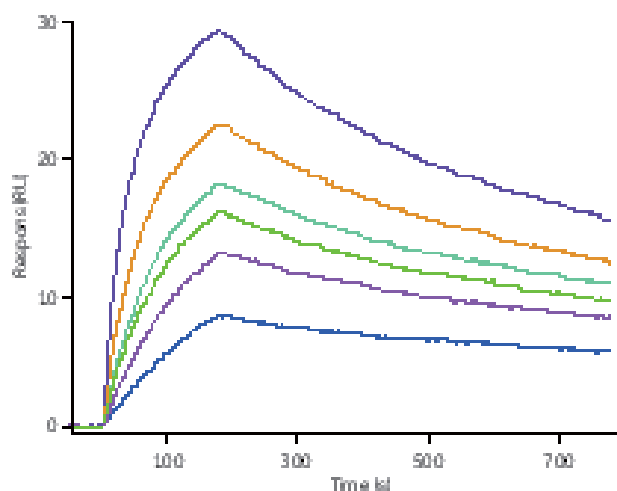
Biacore系统：结合的强度与动力学

Biacore系统利用表面等离子共振(SPR)技术实时监测分子间的相互作用。无需标记，Biacore化验就能提供分子间相互作用的亲和力、动力学及特异性等相关信息，同也可以判定生物分子的活性浓度。

分子间相互作用的一方分子被固定在传感器表面，而另一方分子在溶剂中流过传感器表面。通过传感器表面附近质量的变化，可以实时检测出两方分子间的相互作用，而结合数据则会呈现在传感图中——根据时间绘制的SPR反应曲线（单位为RU）。

相互作用过程包括复合物的形成与解离，而结合曲线的形状会揭示结合动力学信息(k_a , k_d)。

更多信息可浏览 www.gelifesciences.com/biacore。

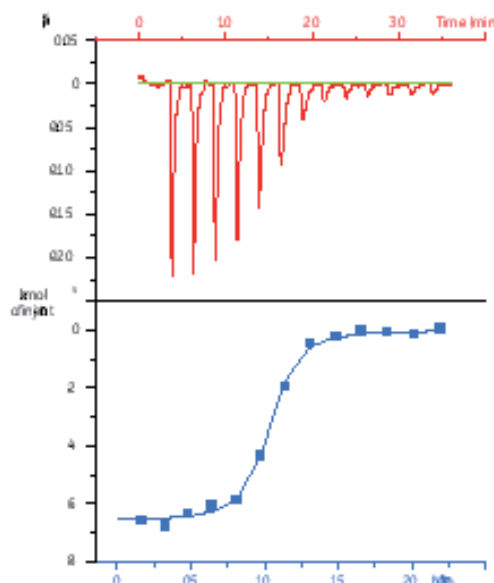


MicroCal ITC系统：结合的强度与能量

无需标记，等温滴定量热(ITC)技术可以在一次试验中判定很多结合参数 (n 、 K_D 、 ΔH 及 ΔS)。

一种生物分子的溶液会用与其结合的分子的溶液进行滴定，两者会因为发生了相互作用而释放/吸收热量，监测因相互作用而发生的热量变化 (ΔH)。每个峰形代表的是注射少量样品时所发生的热量变化。随着连续量的样品滴定到ITC样品池中，释放/吸收的热量与结合的量呈直接比例关系。饱和时，热量信号减少，直到只能观察到稀释热量变化。根据样品池中配体结合的化学计量比而绘制出结合曲线，分析结合曲线进而判定 K_D 、 n 及 ΔH 。

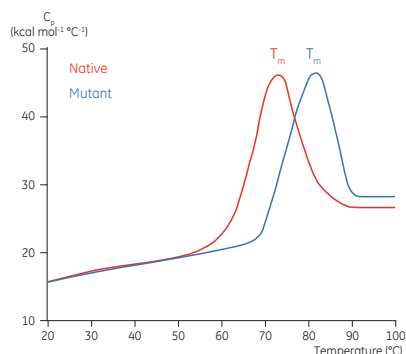
更多信息可浏览 www.gelifesciences.com/microcal。



MicroCal DSC系统：蛋白的稳定性

在差示扫描量热(DSC)技术中，以恒定速率加热自然状态下的生物分子，测得因热变性而带来的热量变化信息。测得的过渡中点(T_m)为稳定性评价提供了一种快速而简单的表征，这可以应用于整个生物药物发现和开发的过程当中。 T_m 值的偏移可以表征药物的热稳定性的升高或降低。更高的 T_m 值反映了更高的热稳定性，这与生物药物的长期稳定性有着很好的相关性。

更多信息可浏览 www.gelifesciences.com/microcal。



高内涵筛选—药物开发中的新契机

药物靶点是能够与特定药物特异性结合并产生治疗疾病作用或调节生理功能作用的生物大分子或生物分子结构。在当代药物开发过程中，发现和选择合适的药物靶点是药物开发的第一步，也是药物开发成败的关键因素之一。当前用于临床治疗的药物靶点停滞在500多个，用于治疗不到100种的疾病，远不能满足新药研发和疾病治疗的需求【1】。其次，新药开发受到复杂药物调节机制的制约，临床上药物疗效还涉及到药物代谢以及药物的毒副作用，导致药物在临床试验中的失败率仍然很高【2】。因此，新药开发迫切需要寻求更多新思路、新方法和新技术的介入来确定优良的药靶和候选药物。就药物创新而言，转化医学的兴起打破了基础医学与药物开发和临床医学之间的屏障，缩短实验室到临床的过程，最终能够使患者更快地受益于生命科学的研究成果【3】。

随着当代基因组学的发展，医学研究模式发生了变化：从经典的序列测定到高通量测序及基因功能分析，从基因组学到蛋白质组学、代谢组学，从组学到系统生物学研究。在这样的转变过程中，基因组研究使我们能够从基因组的表型认识人体生理、病理过程中疾病发生、发展规律的本质，有可能从系统整体的角度解决医学问题。基于基因组的转化医学是推动医学发展和药物开发一个引擎【4】。RNA干扰（RNAi）技术是引入外源性双链RNA分子（siRNA），在mRNA水平上诱发的序列特异性的转录后基因表达沉默，从而获得去基因功能表型【5】。这种技术仅需要少量的核酸序列信号，而且不被蛋白结构所影响。随着2001年人类和其他物种基因组序列初稿完成，现在可以设计合成出针对每个基因的siRNA，质粒或病毒载体表达的小发卡RNA（shRNA）达到干扰目的基因，从而实现疾病表型的基因的筛选。在疾病研究中，如发现某一基因为持续某种表型所必须，其编码蛋白将可能成为疾病治疗极好的靶点。与基因敲除（gene knock down）、转基因和其他传统方法相比较，RNAi的技术简单易行、通量高、资金消耗少、周期短，使得研究人员能够在短时间内大规模地在细胞水平和动物水平筛选药物靶点和评定药靶【6,7】。

RNAi文库（RNAi library）是通过人工构建的siRNA或shRNA有针对性抑制不同基因表达的文库。以RNAi文库为平台的“loss-of-function screens”可以同时全基因组的基因进行功能研究和筛选，从而进行高通量大规模药靶探寻，在短短几年内迅速发展，已取得了引人瞩目的进展【8-14】。Morgan-Lappe等【10】针对蛋白激酶、G蛋白偶联受体、泛素连接酶3、核蛋白等大约3700个基因构建了siRNA文库，以肺癌细胞系H1299为实验对象进行高通量筛选，寻找和肿瘤生长密切相关的蛋白。首次发现抑制蛋白Ran和TPX2表达后均能使细胞周期阻滞，甚至出现凋亡迹象。并进一步在乳腺癌及Ras基因突变的癌细胞系中验证了Ran和TPX2有望成为治疗肿瘤的新靶点。Cole【12】等分别在4种成神经细胞瘤细胞中以loss-of-function genetic screens的方法筛选与细胞增殖相关的激酶，成功地从592种激酶中筛选出CHK1作为成神经细胞瘤的治疗靶点。Alexander Karlas等【13】在人宿主细胞中，通过全基因组RNAi筛选，发现了287个宿主基因影响了A型流感病毒的复制。并在进一步的研究中，发现SON DNA结合蛋白和CDC类激酶1在流感病毒的复制中发挥了重要作用，为下一步流感药物的开发提供可能的靶点。Dr. de Pril等【14】在前列腺癌细胞中用腺病毒shRNA文库研究7000多个基因，在96孔板中采用划痕试验并借助IN Cell Analyzer高内涵细胞成像分析系统筛选出与癌细胞迁移相关的CXCR4、PIK3CA、ROCK2和PGF四个基因作为可能新药物靶点。

继检测基因水平的基因芯片，转录水平的RNA芯片和表达水平的蛋白芯片等检测手段之后，以RNAi技术为基础的功能性检测成为了下一代高通量技术的发展方向。RNAi细胞水平高通量筛选与芯片类技术相比，在保持细胞结构和功能完整性的前提下直接研究基因和细胞功能之间的关系，如生长，分化，迁移，凋亡，以及细胞形态等，更有助于认识基因和疾病发生发展的关联，从而展开药物靶点的寻找。在过去近十年中，通过提高仪器制造技术、生物检测手段、图像分析软件的功能等，高内涵细胞成像分析系统打破了常规技术在高通量情况下只能对单一参数进行分析，或者对复杂参数无法进行高通量分析的瓶颈。使高内涵筛选技术朝着通量更高，速度更快，检测参数更多样的方向发展【15-17】。

在确定药物靶点后，对治疗药物的筛选也是高内涵筛选应用的重要方面。以往药物开发过程，“串联”了从化合物筛选，初步药效和毒理学评价，临床前研究，最后到临床研究各个阶段，该过程效率低、速度慢且高通量药物筛选成功率相对较低。因此，传统的单指标高通量药物筛选技术已经不能适用药物开发的需要，而且也不利于对药物活性的综合评价。而高内涵筛选技术能使研究人员在新药研究的早期阶段就能获得药物对细胞的多重效应的详细数据，包括细胞毒性、代谢调节和对其他靶点的非特异性作用等，从而可显著提高发现先导化合物的速率和准确性，提高药物后期开发的成功率【18.19】。

现如今，受制于药物靶点的发现速度，新药开发尤其是针对新疾病的药物开发显得尤为困难，成本和周期亦逐年递增。因此，如何提高药物靶点的发现速度，缩短药物开发周期，减少新药开发投入成为了医药产业发展的重大挑战。转化医学概念的提出，拉近了临床资源和基础研究及药物开发的距离，使得临床数据能更快速，有效，全面的反馈到药物开发中去；RNAi技术的发展，使得高通量研究基因和功能之间的关系成为了现实，解决了以往芯片技术无法直接关联表达谱和基因或蛋白功能的弱点，使得细胞水平的大规模药物靶点发现成为可能；与此同时，高内涵筛选技术的应用，可以使得靶点发现和药物开发过程中，高通量和多参数分析并行成为可能，加速了新药开发过程，提高了新药开发的成功率。

References:

- 【1】 Drews J. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 2000 Mar 17; 287(5460):1960-4.
- 【2】 Lina W, Chonggang Y. Development and applications of RNAi technology in drug research. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2007 Vol. 19(5): 557-561.
- 【3】 Changxiao L. Translational research in discovery, research and development of new drugs. *Tianjin Institute of Pharmaceutical Research*, 300193.
- 【4】 李青, 刘超. 转化医学-药物研发的新契机. *药品评价*, 2011年第8卷11期。
- 【5】 Hannon G. RNA interference. *Nature*, 2002, 418: 244-251.
- 【6】 Brummelkamp T R, Bernards R. New tools for functional mammalian cancer genetics. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 781-789
- 【7】 Hannon G J, Rossi J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*, 2004, 431: 371-378
- 【8】 Danhui W, Shixuan W, Ding, M. Application of RNAi Library to Oncology Investigation. *Chinese Journal of Cancer*, 2008, 27(11): 1229-1232. new components of the p53 pathway. *Nature*, 2004, 428: 431-437
- 【10】 Moffat J, Grueneberg D A, Yang X, et al. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, 2006, 124: 1283-1298.
- 【11】 Morgan-Lappe S E, Tucker L A, Huang X, et al. Identification of ras-related nuclear protein, targeting protein for *Xenopus* kinesin-like protein 2, and stearoyl-CoA desaturase 1 as promising cancer targets from an RNAi-based screen. *Cancer Res*, 2007, 67: 4390-4398.
- 【12】 RNAi Screen of protein Kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *PNAS* 2011, 108(8) 3336-3341.
- 【13】 Alexander Karlas^{1,4}, Nikolaus Machuy, et al. Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. *Nature*, 2010, 463, 818-822
- 【14】 de Pril, R. et al. A high-content screen for inhibitors of cell migration in cancer metastasis using adenoviral knock-down. *BTi*, 21 (2), 16-18 (2009).
- 【15】 Connick JH. A flexible technology platform to explore valuable drug targets [J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30 (4): 786 - 788.
- 【16】 Echeverri CJ, Perrimon N. High-throughput RNAi screening in cultured cells: a user's guide. *Nat Rev Genet*. 2006 May;7(5):373-84.
- 【17】 V Starkuviene and R Pepperkok. The potential of high-content high-throughput microscopy in drug discovery. *British Journal of Pharmacology* (2007) 152, 62-71
- 【18】 ZHANG L i, DU Guan-hua. High content drug screen ing and its application, *Acta Pharmaceutica Sinica* 2005, 40 (6) : 486 - 490.
- 【19】 SUN Wan. LI Min. A noVel advancement in drug screening techniques: high content screening. *Chinese Journal of New Drugs*. (2006) 15(1):12-16

人类胚胎干细胞群药物筛选作用将改变药物开发进程和临床前试验进程



Stephen Minger医生
细胞技术部研发总监,
GE Healthcare

制药行业在开发新药物时仍可继续从大量化合物中筛选出备选药物，然后用备选药物在动物细胞和从经过数十代连续培养的人类宫颈癌组织中取下的细胞进行试验来了解该备选药物的属性。但是，使用这种老生常谈的药物开发方法反馈回来的信息千篇一律，备选药物在并不能代表人体内细胞和组织范围的生理和表型多样性环境中表现出来的信息，已被证明在关联性和实用性方面具有局限性。此外，目前针对不同人种和种族群体以及不同年龄段、合并症、疾病症状的患者群体使用的细胞株缺乏基因、外遗传、表型方面的多样性。制药行业在研发个人化药物以及制定更加“量身定做化”的治疗方案和治疗药剂时，这些差异具有更大的意义。

如果未来不在制药行业引入新科技，那么在研发道路上，追求更安全高效的治疗方案，引进能提供更多信息的诊断产品、诊断/治疗混合用途产品时，我们会举步维艰。又或许当药物在临床试验后期甚至上市后出现损失严重、不可接受的失败几率时，我们不得不急需找到快速解决办法。当某种经过目前最先进的高通量药物筛选法（HTS）筛选得到化合物在经过集中最优处理化处理和一组严格的临床前分析后，在临床试验第三阶段失败而不能成为一种药物时，则投资造成的损失将可能超过10亿美元。制药行业根本不可能负担起另一种Vioxx——一种成功商业化却必须被撤出市场的药物。该药物在开发、生产、制造、法律相关环节大约花费了40亿美元，而使用期限却相当短。

为了对制药行业探索、评估和认知先导化合物的方式产生真实而又深远影响，也为了让制药行业在开发药物的关键时刻应用自己掌握的知识的方式产生真实而又深远影响，就必须在开发工作刚开始阶段重新思考之前已被应用了近半个世纪的化合物筛选方式。尽管进行HTS时所用的仪器和方法经过数年的改进形成惊人的生产能力，例如，在单一的高内涵筛选过程中生成数万亿字节数据，但是在大多数情况下，药物筛选试验的关键还是在于动物细胞或经过无数代培养已不再近似于人类初生细胞的人类肿瘤细胞。如果您倾听一下那些每天坐在试验室跟一些细胞株打交道的生物学家、试验开发人员、筛选团队成员、毒理学家、化合物分析人员，您就能清楚地认识到他们需要更好、更健康、更具有代表性的工具。执

行肝毒性试验的研发团队需要用人类肝脏细胞开展这些试验；那些进行心脏毒性研究的团队如果能够对人类心肌细胞进行研究，则他们会取得质量更高、更加可信的数据。同样，HTS团队不能假设他们对动物细胞进行研究所获得的结果能够与对人类细胞株研究所结果相同。继续使用这些“不太理想的”细胞进行试验获取数据，并根据所得数据判定何种化合物用于新药开发是注定要失败的。

目前使用的细胞株不仅缺乏人类初生细胞模型，另外，所用细胞株很难呈现人类细胞的巨大变异性——细胞间的差异会导致药物的吸收、新陈代谢、及排泄方式不同，会对药物达到它们的靶点的能力产生影响，进而影响到关键信息的传导和接下来的生化过程，并对药物参与其它预计之外相互作用（会产生不良后果有时甚至产生致命的副作用）的能力产生影响。不同种族、人种及不同区域的人群在染色体组上的差异性在于染色体标志，蛋白质生物标记和新陈代谢特征不同，这些差异真正预示着毒理学，预示着该如何设计适应性临床试验和如何重新利用虽已失败但是仍有希望的备选药物（该药物可能对患病的一小组成员有效，但是对于其他患有相同疾病的成员无效）。人们普遍接受许多药物（不是大多数药物）只对一定比例的患者起到了期望的治疗效果这一事实。另外，对药物没有反应的患者当中有一些在服用药物后遭受了负面影响或没有起到治疗效果。

只有当我们能够在期待药物最终起作用的细胞环境下对备选药物进行筛选和评估时才能够改变这种格局。实现这种能力指日可待，并可通过应用新兴科技生产从人类胚胎干细胞（hESCs）中提取标准细胞群来实现。这些稳定的、定义明确的细胞株对于实施HTS鉴定和最佳化具有价值。在于高内涵分析过程中，使药物移动和活动可视化，监视靶点信号传导通道，观察细胞形态变化、复制及其它发育迹象，以及体外试验的临床前研究等都有价值。

此技术的核心在于能够在受控条件下培育人类胚胎干细胞，并能够让细胞按照预先决定好的通道进行分化。分化得到的可繁殖细胞群会具有稳定基因属性和明确的人类基因组。在不久将来，人们可以预想一下可扩展的培养方法和生产流程能够生成大量的分化hESC，并按照细

胞类型、年龄、传代次数、人种和种族、独有基因和表型特性进行编目。制药研发团队那时将能够按照一个非常标准的方式在一个更能反映人体生理学的细胞环境下应用这些细胞群来评估备选药物的活性、药效性能以及毒理。更大程度地标准化了的细胞株，不仅可以通过降低变异性来得到更加稳健和重现性好的细胞进行实验，还可以加速探索开发、药物筛选、临床前试验工作的步伐，推进试验开发，扩展以细胞为基础的检查分析技术的适用性，增加对输出数据的质量和关联性的信任。拥有了一套由标准的hESC衍生而来的细胞株，就可能实现对同一种药物对不同种群的活性和毒性进行对比研究。这些类型的研究结果可能对某种特殊备选药物的广泛安全性和有效性具有支持性意义，或者在药物进入临床试验或上市前，这些研究结果还可有助于在根据基因特性或疾病特性识别出靶点治疗组。这些对比研究得出的结论将有助于指导制药行业迷途知返，摒弃无法持续下去的“一刀切式”“重磅型”药物开发策略——该开发策略近年来在制药行业没有发挥它的良好效应，且几乎没能用来开发出极度成功的新药种（重磅型药物）。评价备选药物用的由hESC培育而成的细胞株拥有10、20甚至50种基因型，覆盖了人类种群的差异性，这种评价功能使得制药行业向实现“在同一个盘子里”进行第1阶段研究迈进了一步，或者至少可以实现使用实验室用一系列微量滴定板进行研究。

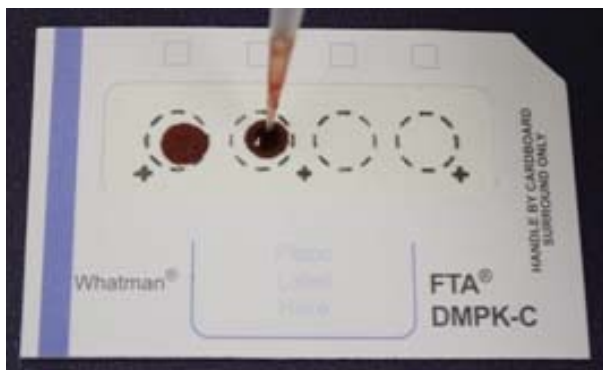
随着分子成像技术不断改善，可越发清晰地呈现出的细胞及细胞内细胞器的内部工作状态。当以由hESC培养得到的细胞株为基础的检验技术与高内涵成像技术结合，可获得高关联性数据，从而支持药物筛选和开发工作。在试验开发与执行、质量控制以及毒性研究工作中，成像技术可用来呈现干细胞和已分化细胞群的特性。新兴的以hESC为基础的技术的另一功能就是可用来开发临床平台，从而使以细胞为基础的治疗方法应用可以到组织工程学、再生医学、基因疗法。直观来说，使用基因稳定、定义明确的细胞株从事细胞疗法可能会有助于生成更加标准的方案和更加成功的结果。培养ESC得到的新一代人体细胞株在可用性上具有重大改进，这种进步将会改变我们探索和开发新药物的方式。尽管如此，也还存在一个有待改进的疑问，就是用三维细胞培养技术取代过时的方法，用来大量繁殖和制备细胞。栽培和分化多能细胞群所用的新方法和新设备，更好的培养介质，更有效的细胞因子和增长因子组合，改良的指导细胞分化用方案、更能模拟细胞运行、相互作用并结合形成组织时所处体外环境的新基质，以及更大程度的自动化使得细胞更加稳健和更具有重现性等等因素都使得基于细胞形成的工具具有更好可用性，这是成功开发新药物的基础。

可用于DMPK研究的干血点微量采样技术

药物代谢 (DM)，药代动力学 (PK) 和毒代动力学 (TK) 可为研究候选药物在体内的作用提供重要的线索，一直是药物开发进程中的不可或缺的重要步骤。在传统研究中，血浆被认为相对于全血而言更容易处理、运输及储存。因此在临床实验中被用于新的化学药物的剂量研究和药代动力学研究。然而，在制备血浆的过程中，常需要大量的血液（通常每个时间点的研究对象至少需要100-500微升）以制备足够的血浆用于定量生物分析。由于每只受试实验动物能够被取血的次数和数量有限，有时研究者不得不使用多个动物的混合样品进行研究。这种混合样品会降低定量药代动力学的数据质量，并且会间接增加所需实验动物的数量。此外，从全血中分离血浆用于生物分析往往需要使用固相萃取、液-液萃取、蛋白沉淀等方法。这些方法往往存在着耗时、耗力、通量小的缺点，并且在实际操作中还需要考虑和处理冷链运输、储存血液样本的要求。

干血点 (DBS) 技术使用纸张进行血液样品的采集，是一项可克服以上不足的样品采集技术。运用干血点技术的Guthrie card自1970年起就被用于新生儿筛查。之前该项技术的应用主要受仪器灵敏度的限制无法进行定量试验，而检测方法和仪器灵敏度的提高使得DBS越来越多的被用于药物筛选的检测和药代动力学研究。在2009年，GSK首先报道使用Whatman FTA卡将DBS用于DMPK分析，线性 (Linearity)、灵敏度 (Sensitivity)、选择性 (Selectivity)、准确性和精确性 (Accuracy & Precision) 等方面证明了干血点技术可成功应用于DMPK领域 [1]。在2011年，他们再次验证了indicating FTA DMPK卡可用于DMPK分析[2]。继GSK之后，更多的药厂和科研机构将DBS-DMPK用于新药研发。罗氏制药在2010年对其一种需要进行治疗监测及上市后临床研究的免疫抑制药物霉酚酸酯的活化形式霉酚酸(MPA)及其糖苷酸代谢物MPAG分别使用DBS采样技术 (Whatman FTA DMPK-B卡) 及液体采样方式进行了比较实验。结果证明了DBS无论对全血或血浆样品均可提供与液体采样方式媲美的数据质量 [3]。同样在2010年，百时美施贵宝使用whatman 903卡和Whatman FTA DMPK-B卡对两个体外不稳定的药物前提进行了稳定性研究，提示干血点技术可作为另一种药物前提稳定性研究的样品采集方法及储存手段[4]。辉瑞制药在2012年尝试应用自动化干血点样品采集技术进行Wistar Han大鼠样品达沙替尼代谢信息的解析并取得了成功，证实了干血点技术在通量化获取药物代谢信息的能力 [5]。

DMPK卡的使用十分简便：首先将全血样品点在卡片上并让其自然干燥。随后使用打孔器在干燥后的血点上取少量纸片，使用溶剂将样品洗下。随后进行后续生物学分析即可。



此外，DMPK卡还有指示卡的形式，这种指示卡可被用于无色透明样本的采集，如血浆、尿液、脑脊液等。当样品被点样于指示卡上时，卡上蓝色指示剂会发生颜色的改变，使含样品的区域变为无色，方便进行辨识。



GE医疗集团生命科学部的干血点微量采集卡（FTA卡）使用特殊的whatman滤纸介质，可为来源于不同结构体的化合物提供可控的批内、批间差异，得到精密、准确的数据。目前这项技术及产品已被广泛用于药代动力学和毒代动力学研究。FTA DMPK-A 卡和FTA DMPK-B卡可对细胞结构进行裂解并将卡上的蛋白质变性。FTA DMPK-C卡则保留蛋白质的本来性质。点样后的卡片可在常温下运输和储存，长期稳定。样品已被证明可用于血浆中代谢物的生物分析。

[1] N Spooner, R Lad and M Barfield. Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method. *Anal.Chem.*2009, 81, 1557-1563

[2] M Barfield and R Wheller. Use of Dried Plasma Spots in the Determination of Pharmacokinetics in Clinical Studies: Validation of a Quantitative Bioanalytical Method. *Anal.Chem.*2011, 83 (1), 118-124.

[3] Heinig K, Bucheli F, Hartenbach R, Gajate-Perez A. Determination of mycophenolic acid and its phenyl glucuronide in human plasma, ultrafiltrate, blood, DBS and dried plasma spots. *Bioanalysis.* 2010 Aug; 2(8):1423-35.

[4] D'Arienzo CJ, Ji QC, Discenza L, Cornelius G, Hynes J, Cornelius L, Santella JB, Olah T. DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors. *Bioanalysis.* 2010 Aug; 2(8):1415-22.

[5] Shen Z, Kang P, Rahavendran SV. Metabolite profiling of dasatinib dosed to Wistar Han rats using automated dried blood spot collection. *J Pharm Biomed Anal.* 2012, Aug; 67-68:92-7.



小分子应用专题



- 利用无标记相互作用分析表征先导化合物：在类风湿性关节炎治疗中阻断T细胞的活化
- 采用Biacore™ 4000进行片段库的筛选和鉴定
- 1+1>2 ? 利用ITC研究低亲和力的配体片段 FBDD
- 以ITC技术导航激酶抑制剂的抑制机理研究技术
- 在IN Cell Analyzer 2200上利用高内涵分析研究药物对高尔基复合体的效果
- 采用IN Cell Analyzer 2200成像和量化基于细胞的GPCR激活测定
- 采用心肌细胞进行多重标记活细胞毒性试验的高内涵分析
- Whatman™指示型FTA™ DMPK卡



利用无标记相互作用分析表征先导化合物： 在类风湿性关节炎治疗中阻断T细胞的活化

阻断T细胞的活化是治疗自身免疫性疾病如类风湿性关节炎（RA）的有效手段。Avidex公司已经研发了一系列小分子化合物用于结合抗原递呈细胞（APC）表面的CD80蛋白，从而阻断其与T细胞表面CD28的结合，进而抑制T细胞的活化。在先导物优化的研究中，Avidex公司已经利用无标记相互作用分析提供了关键性的结合数据。利用Biacore™系统检查259个先导化合物的CD80结合特性，提供亲和性以及动力学速率常数等数据，从而有助于对一般先导系列特性的化合物和单个化合物进行标准。在抑制分析中，Biacore系统也可用于直接检查CD80抑制剂与CD80的结合情况，其也用于特异性和交叉物种的CD80结合实验。因此，Biacore分析能够为CD80项目的多个方面提供重要的信息。具体的动力学速率常数分析能够为后续的研发识别那些人们感兴趣的化合物，然而之前基于标准亲和力的评估忽视了这一点。

介绍

虽然目前对于造成类风湿性关节炎（RA）的原因依然不清楚，但潜在疾病的进展机制已经被很好的表征，对机制的了解是治疗干预的关键。疾病发展进程中被最早清楚明确的是：T细胞被正常细胞异常激活，导致细胞因子的产生，进而出现不合理的自身免疫攻击。在RA的典型症状中，往往造成关节组织的破坏，通常导致严重的下肢损伤和变形。临床上有一些方法用于治疗RA，但大多数都是针对疾病进展中的晚期，其目的也仅仅是减轻自身免疫攻击所引起的症状。阻断最初T细胞的异常活化是一种非常具有吸引力的替代方法，因为这样在疾病的最早期阶段即可阻止病情的发展。

T细胞活化是一个复杂的过程，需要多种分子的相互作用（图1）。最初通过T细胞表面的T细胞受体（TCR）识别抗原递呈细胞（APC），而抗原多肽是由APC表面的HLA（人白细胞抗原）II类二聚体所递呈的。这种分子相互作用之后，T细胞表面的CD4分子通过与HLA分子的相互作用，介导了刺激信号向T细胞的传递。抗原依赖信号不足以刺激T细胞发生活化，然而随后细胞因子的产生和完全免疫应答的发生以及非抗原依赖的继发信号通路也参与到活化T细胞过程中。继发信号是通过T细胞上的CD28跨膜糖蛋白与APC表面的CD80和CD86相互作用而产生的。只有联合以上描述的两种信号才能激活T细胞。这种现象就是已知所谓的共刺激信号，它广泛存在于T细胞的调节机制中，其中参与了不同的分子配对涉及多种刺激信号通路和抑制信号通路（1）。

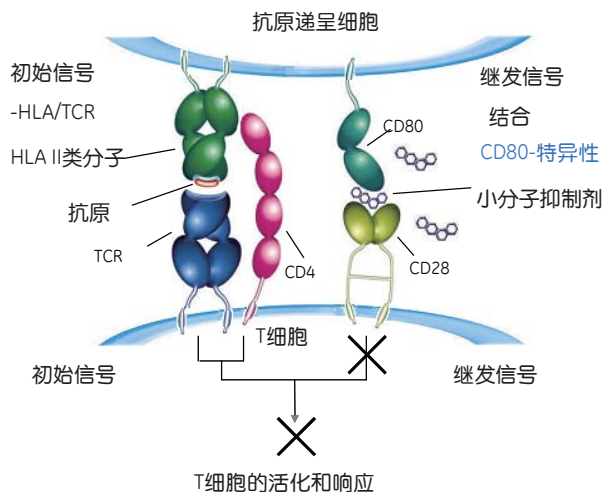


图1. 抗原递呈细胞（APC）激活T细胞需要抗原依赖和非抗原依赖信号的共同刺激。HLA/抗原结合到T细胞受体触发初始信号，而继发信号则依赖于CD80（位于APC表面）与T细胞表面糖蛋白CD28的相互作用。T细胞的完全活化都需要这两种信号。CD80抑制剂能够阻断CD80:CD28的相互作用，从而防止继发信号的激活，最终阻断T细胞的活化（见正文）。

在正常情况下，T细胞不会被自身蛋白所激活。然而在RA中，机体区分自身和外来蛋白的能力丧失，进而导致T细胞活化失控而炎症反应。理论上，阻断任一条T细胞活性信号通路即可防止RA的临床症状的进展。已经证实要阻断TCR-HLA/抗原相互作用十分困难，然而，阻断CD28/CD80信号通路可能是一个更有前景的替代手段。Avidex公司已经识别了一些能够特异性结合CD80的抑制剂，阻断T细胞活化所必须的非抗原依赖信号通路，从而潜在降低RA中的组织损伤（图1）。

如同大多数药物研发项目一样，为了找到用于治疗具有优化特性的改良分子变体，我们需要寻找有前景的先导化合物如CD80抑制剂进行先导物的最优化研究。这个过程是复杂的，需要技术能够对有关药物靶向结合事件进行表征的高质量数据进行传输。而且，充分理解药物靶向分子的相互作用必须考虑到结合和解离特点。利用Biacore系统的无标记相互作用分析能够提供这种高质量的结合数据用于研究复杂生物分子的相互作用、传递有关亲和力和动力学速率常数的综合信息。

在本文描述的应用中，Biacore系统被用于研究五种先导系列的CD80抑制剂。工作内容包括：

- 对测定的先导系列化合物亲和力和动力学速率常数进行表征和等级评定
- 进行抑制研究显示复合物依赖的CD80:CD28结合抑制能力并获得抑制50%结合能力所需的EC50药物浓度
- 采用CD80相关分子的结合研究以表明CD80先导化合物高度特异性的相互作用

Biacore实验提供大量重要的数据并鉴别可用于后续研究的最有前景的化合物，而这些在其他分析方法中都曾忽略了。

方法

所有的实验均在25°C的分析温度下进行。生物素标记的重组蛋白被捕获固定在抗生物素蛋白链菌素包被的传感芯片表面（S系列CM5传感芯片）；3000-3500RU强度的CD80蛋白也被固定在传感芯片表面。CD86蛋白也被进行固定作为阴性对照。电泳缓冲液采用10mM HEPES, pH 7.4, 150nM NaCl和0.005%的p20。如有需要，可在缓冲液内补充5%的DMSO。

Hit选择

Hit选择试验用于化合物的起始评估，其操作如下：流速30ul/分钟，每20个样本循环含三次启动运转循环（缓冲液）和溶剂校准（八个校准点）。样本循环包含30-60秒的样本注射、30-60秒的解离时间和额外的20%DMSO冲洗以去除任何可能的滞留分子。样本化合物以1μM的浓度进行注射。

化合物表征

化合物表征试验按以下步骤进行：流速30ul/分钟，每2个样本浓度梯度后进行三次启动运转循环（缓冲液）和溶剂校准（八个校准点）。样本循环包括60-200秒的样本注射、400-1000秒的解离时间和额外的50%DMSO冲洗。样本浓度系列通常从最大浓度1μM稀释三倍，采用六种不同的浓度系列（其中一个作为重复浓度）和零样本。

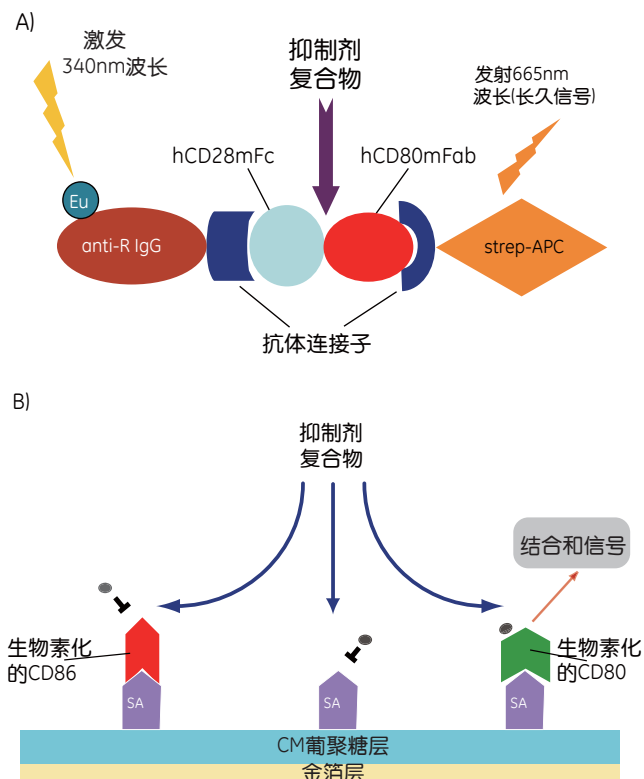


图2. CD80先导化合物的TR-FRET和Biacore试验。A) TR-FRET试验：对抑制剂阻断人CD28-鼠Fc融合蛋白（hCD28mFc）与人CD80-鼠Fab融合蛋白（hCD80mFab）相互作用的能力进行分析。每个重组蛋白通过抗体连接器耦合了荧光基团：抗鼠IgG标记的铕（Eu）和抗生物素蛋白链菌素共轭的别藻蓝蛋白（strep-APC）。重组CD28/CD80蛋白的相互作用引起持续发射665nm波长的荧光信号，这是由于荧光基团之间的荧光共振能量转移造成的。CD80-结合化合物抑制CD80与CD28之间的相互作用并阻断FRET依赖的信号。B) Biacore试验：传感芯片表面覆盖抗生物素蛋白链菌素（SA）并用于捕获生物素化的CD80和CD86（阴性对照蛋白）。之后检测到先导化合物的结合引起接近芯片表面的溶液质量浓度发生变化，从而产生跨越整个相互作用过程的实时信号。

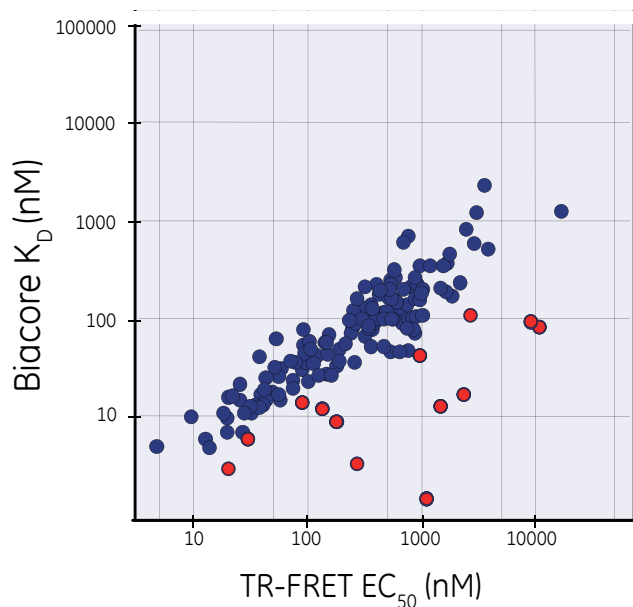


图3. 对Biacore试验获得的化合物-CD80结合的亲和力数值与TR-FRET试验获得的抑制CD80-CD28结合的EC₅₀数值进行比较。利用Biacore和TR-FRET试验以平行组的方式对先导化合物进行检测。从Biacore直接结合试验中获得亲和力常数 (KD) 如y轴所示, 而相应的TR-FRET试验中获得的EC₅₀数据如x轴所示 (两个数轴均采用对数标尺)。采用两种试验对结构活性相关的大多数化合物进行基本一致。当采用Biacore试验进行测量时, 一些含有终末苯基基团 (红色表示) 化合物的结合亲和力比TR-FRET试验预测的亲和力要高。有趣的是, 这些化合物也同时被发现具有细胞毒性。

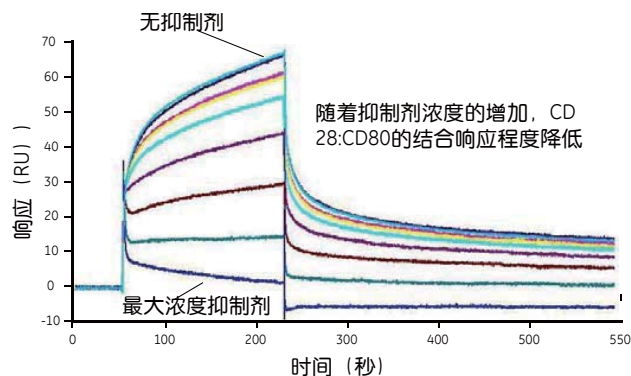


图4. Biacore试验显示CD80项目的先导化合物对CD28:CD80的结合具有抑制作用。CD80被固定在传感芯片表面, 包含200nM浓度的CD28溶液随着抑制剂浓度的增加 (从4.12nM至1μM) 被注射到制备芯片的表面。根据时间从样本注射到225秒左右跑缓冲液 (标记从结合相到解离相的转变) 作出共振单位 (RU) 的散点图来反映相互作用的情况。一旦抑制剂与CD80结合, 将抑制剂+CD28的数据减去单独注射平衡浓度的抑制剂所检测到的响应, 进而获得最终的相互作用情况。对于所示的化合物, EC₅₀的数值为160nM。

结果

采用补充试验对系列先导化合物进行分析

采用时间分辨荧光共振能量转移 (TR-FRET) 试验进行初次筛选。该方法中, CD80-鼠Fab和CD28-鼠Fc融合蛋白通过抗体连接子分别与荧光共振能量供体和受体耦合。然后对先导化合物阻断CD80和CD28的相互作用进而降低TR-FRET依赖光发射的能力进行筛选。这种技术检测了先导化合物功能性的抑制特性, 并且有能力通过改变化合物浓度建立EC₅₀ (50%抑制CD80-CD28的结合所需要的药物浓度) 的方法测定阳性的“Hits”。TR-FRET试验的原理如图2所示, 随后是Biacore试验的图解设计流程。

尽管TR-FRET实验具有指导信息, 但其无法提供有关化合物与靶向CD80结合特点的信息, 然而, 通过Biacore试验可以轻易的获得详细的化合物-靶向结合分析数据 (提供亲和力和动力学速率常数数据), 从而完善先导优化试验。因为TR-FRET试验提供了EC₅₀的数据, 从而可以在CD80项目内对Biacore和TR-FRET试验进行比较。对于大多数化合物, 当评价亲和力 (Biacore试验) 或EC₅₀数值 (TR-FRET) 时, 结构与活性之间的关系基本相同。这些类似的数据 (图3) 表明, 初次抑制剂筛选结果是化合物-CD80结合特点的准确反映。

重要的是, 从属于五个先导系列的化合物的Biacore分析结果也表明, 它们与CD80的亲和力至少是CD28亲和力的两倍 (表1)。

Biacore系统同样可用于抑制试验。在这些实验中, CD80被固定在传感芯片表面, 含有固定数量CD28的一系列样本在随着先导化合物浓度不断升高的情况下被注射到芯片的表面。采用这种方法, 浓度依赖的抑制CD28与CD80结合的情况可以被轻易地观察到 (图4), 采用Biacore可获得与TR-FRET试验结果完美相关的EC₅₀数值 (数据未显示)。

表1. Biacore试验对代表性的抑制剂系列先导化合物和CD28的CD80结合特点进行了测定。采用Biacore试验对五个先导系列化合物（A-E）以及生物学CD80的相互作用分子CD28检测其与CD80结合的亲和力（平衡解离常数， K_a ）和解离速率常数（ K_d ）数据。

化合物	Biacore K_a (nM)	Biacore k_d (s^{-1}) $\times 10^3$
CD28	2000	> 200
A	150	119
B	12	226
C	7	12.2
D	2	7.7
E	30	0.3

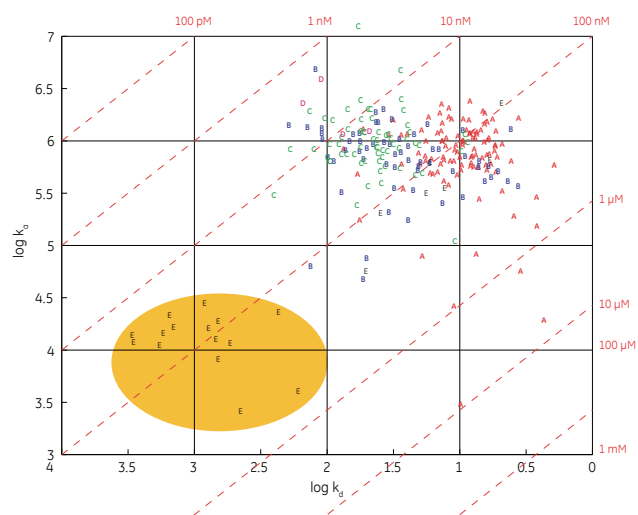


图5. 系列先导抑制剂化合物与CD80结合的 K_a/K_d 图像。采用Biacore系统对属于5个化学相关系列的（A-E）总共259个先导化合物进行了分析，获得的 K_a 和 K_d 的对数值如图所示。虚线表示等距亲和力对角线。在这种形式下，“理想的”结合特点（最快结合速率和最慢解离速率）将出现在图像的左上象限内。单个化合物的先导系列标识由字母和颜色表示（A=红色，B=蓝色，C=绿色，D=淡紫色和E=黑色）。黄色阴影区域表示具有特殊有兴趣的动力学特性的一组E系列先导化合物（见正文）。

五个系列的先导化合物与CD80结合的动力学分析

正如所有药物研发项目一样，通过研究和分析化学变体进行先导抑制剂靶向结合特性的优化是药物研发的重要步骤。由无标记相互作用分析提供的动力学速率常数为先导药物的评估提供了良好的基础，使研究者能够更深入的理解结合特性而不是仅仅获得亲和力数据（2）。因此，复合物特性分析试验可用于检测属于五个化学系列（A-E）的259个先导化合物的CD80结合特性。对所有先导化合物的独立结合和解离速率常数进行计算，并用于制作针对 $\log K_d$ 的 $\log K_a$ 图像，形成的对角线显示对应不同 K_a 和 K_d 协同作用所产生的亲和力（图5）。这些图像阐明了动力学数据的重要性，因为具有相同亲和力的复合物可产生完全不同的结合速率和解离速率的联合效果。

如图5所示，虽然五个系列的前导化合物具有不同的结合特性，有些一般系列特殊的属性表现明显。对于三个最大系列（A-C）的先导化合物，其靶向亲和力从系列A到系列C逐渐升高。而且，隐含的总的趋势显示这些亲和力的增强基本上是由于结合稳定的提高所造成的（如较低的解离速率）。虽然系列D包含相对较少的先导化合物，但相比于系列A-C其对靶向分子的亲和力更高。

采用Biacore试验利用单个速率常数的亲和力数值的分辨能力识别了一群特殊的有兴趣的系列E化合物亚群，见图5的黄色阴影区域。这些化合物仅有中等至较弱结合能力，其亲和力与最初系列A化合物相比仅有轻微或无明显改善。在正常情况下，这些系列化合物由于其相对较弱的结合能力而被排除在后续研究之外。然而Biacore分析表明，虽然这些化合物结合速率比其他化合物低而造成结合能力低下，但系列E化合物同样表现出所有化合物中迄今为止最慢的解离速率。而低解离速率是抑制剂药物相当期待拥有的结合特性，这方面使得E系列化合物比其结合能力更能引起人们的兴趣。因为通过工程化的化学修饰可改善这些化合物的结合速率而又能维持低的解离速率，因而这些化合物被Avidex公司保留作为具有较高前景的先导化合物用于后续研究。

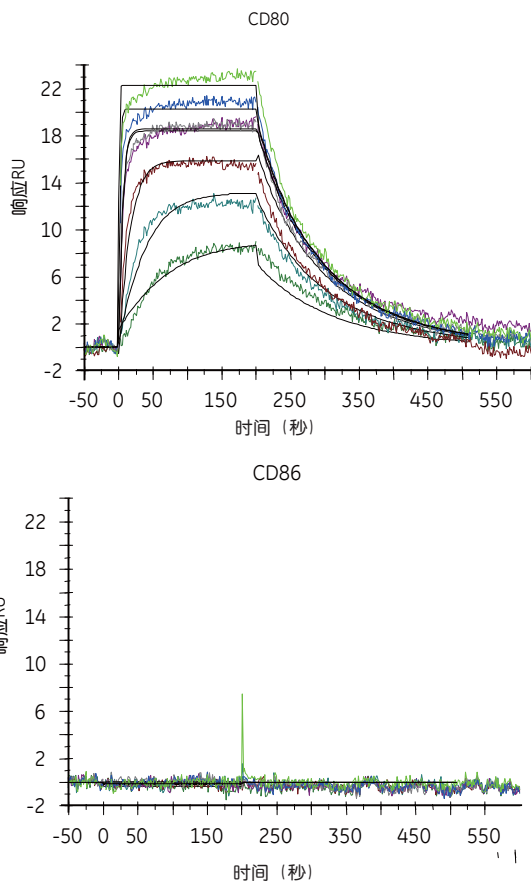


图6. CD80先导抑制剂的特异性。一系列浓度的某种先导化合物与固定在传感芯片表面的CD80（上）和CD86（下）作用的结合响应。

与人CD80结合的特异性

虽然早期药物研发策略最主要关注点是靶向结合的特性但靶向结合的特异性也同样重要。因此先导化合物与其预期靶分子的特异性结合是可取的。图6显示了一种先导化合物与靶向蛋白和对照蛋白特异性结合的数据。在所示的例子中，对一系列浓度的某种先导化合物与CD80以及紧密相关的CD86蛋白的结合情况进行的分析。结果显示先导化合物能与CD80结合（图中所示相互作用的结合响应呈剂量依赖性）而与CD86无反应（图6）药物研发后期可能会涉及基于细胞和动物模型的实验，而CD80结合的种属特异性也是人们感兴趣的点。小鼠、大鼠以及狗的CD80的可溶性胞外片段被克隆并用于基于Biacore的特异性试验。用来源于合适物种的CD28对这些不同种属的CD80变体进行了可行性的检测。从CD80抑制剂先导化合物库中选取了96个化合物进行分析。虽然这些被选取的化合物中包括了所有最具潜力价值的样本，但也包含了库中多样性的样本，结果发现来源于小鼠、大鼠或狗的CD80与库中选取的96个化合物未发生结合（数据未显示）。这些结果十分重要，因为它们表明在动物模型中进行人的自身免疫性基础研究没有什么意义。

结论

基于本报告中呈现的数据以及Avidex公司进行的另外的研究，结果显示，CD80项目先导化合物对用于治疗RA和其他自身免疫学疾病具有卓越的潜力：

- 与CD80的结合具有高亲和力（是CD28与CD80结合亲和力的100倍）

- 在抑制试验中能有效阻断CD80与CD28的结合
- 对CD80具有显著的特异性
- 良好的口服用药特点

Biacore试验的数据明显可用于药物研发过程中的先导优化流程，呈现无标记相互作用的动力学数值以及进行实时的相互作用分析。测量的亲和力数据方面，Biacore试验的结果与TR-FRET的筛选结果十分契合，这也为抑制研究提供了一种有用的补充手段。

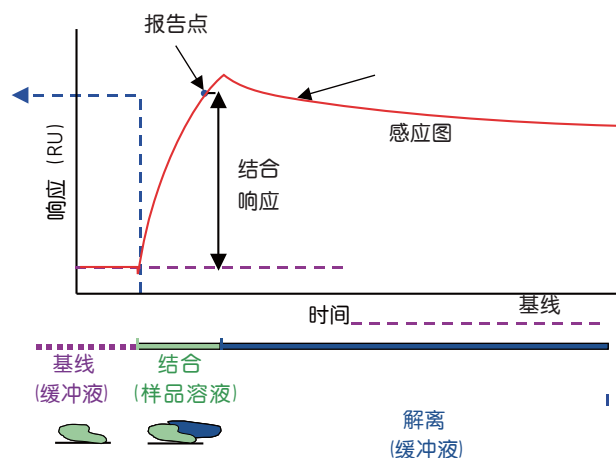
更重要的是，采用Biacore系统进行的相互作用分析提供了重要的动力学信息，从而为先导系列化合物评估提供更多的信息，而不是仅仅提供一个替代技术。对所有测试化合物进行 K_a 和 K_b 值的检测了解先导系列化合物的特点提供了一个良好的概况，同时又能精确的找到人们特别感兴趣的个体化合物。本研究中的主要发现包括：

- 可通过系列A-D先导化合物改善靶向亲和力的明确趋势，对结合和解离速率的影响也是显而易见的
- 识别了具有低亲和力的E系列先导化合物，由于其解离速度非常低，因而可以作为后续研发的具有前景的指标

总之，本研究显示，CD80抑制剂先导化合物可能为有效的治疗RA奠定坚实的基础。此外，研究数据表明，Biacore试验在药物研发的多个方面具有巨大的价值并且可能为这种类似的研究提供高质量动力学信息做出不可估量的贡献。

利用Biacore系统监测蛋白之间的相互作用

采用无标记检测方法，利用Biacore系统实时检测蛋白之间的相互作用。将相互作用分子中的一个蛋白固定在传感芯片表面，而另一个则通过溶液进行注射，并流过传感芯片表面。当注射样本中的蛋白分子与固定的分子相结合时，在传感芯片表面的折光率会由于表面质量浓度的改变而成比例的变化。通过表面等离子共振（SPR）现象，这些变化可以被实时地检测到而数据则以感应图方式呈现（根据时间绘制的SPR响应）。感应图中结合曲线形状所揭示的动力学变化（结合和解离比率）反映了整个相互作用过程中复合物的形成和解离情况。



通过测得结合响应数值（共振单位RU），感应图对整个蛋白相互作用过程提供了实时信息。在相互作用过程中，可选择某个特定时间点的结合响应情况作为报告点。

更多的信息请访问www.gelifesciences.com/biacore。

采用Biacore™ 4000进行片段库的筛选和鉴定

在药物研发中越来越多的使用基于片段的药物设计方法用于鉴别合适的结构框架。目前已经证实无标记技术如X线晶体学和核磁共振成像（NMR）技术可用于鉴别药物靶点的低亲和力片段复合物。由于其较低的靶蛋白消耗、高信息容量和高质量数据等优点，表面等离子共振（SPR）生物传感器已经成为该领域具有吸引力的一项技术。

配备Biacore 4000 LMW扩展包的Biacore 4000系统可应对低毫摩尔分子亲和力水平和低分子量片段所带来的挑战。目前已发展的方法和评估工具可用于识别过当量的粘性结合物，并自动检测非典型的结合行为，从而将研究重点快速集中到表现良好的候选分子上。这些分析可应用于筛选单个浓度或一系列浓度的单个样本。通过竞争性实验确认片段攻击的特异性。专门的亲和力筛选评估工具简化了毫摩尔级分子水平的亲和力评估。

拥有能够满足大多数片段库筛选要求的足够通量，Biacore 4000配备了新的方法设计、数据评估性能以及增强性的数据输入和输出功能，Biacore 4000已经成为基于片段药物设计的一个潜在的重要工具。下面展示的范例说明，将Biacore 4000用于片段筛选和亲和力评估可在一定程度上改善片段的选择，从而显著提高随后的共结晶的成功率。

介绍

基于片段的先导设计在短时间内以及高通量筛选无助于识别小分子片段作为化学研发项目起始点的情况下，便可以满足研发新药物的要求。这种方法提高了通过筛选更小数量的复合物/片段（成千上万而不是几千）以尽可能多得涵盖相对大部分化学空间的可能性。整合结构和功能结合信息用于识别有应用前景的片段。准确且快速优先地对这些片段进行后续分析和开发是至关重要的。

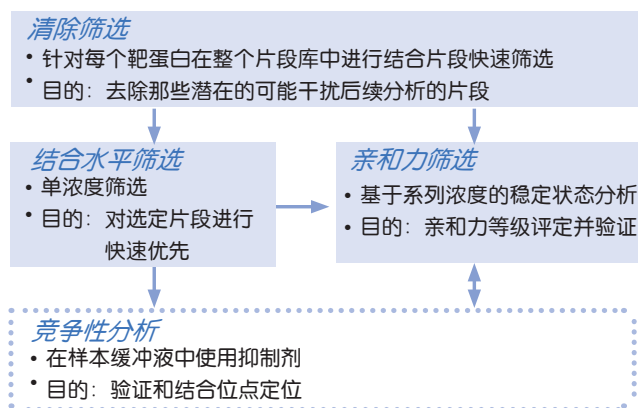


图1. 采用Biacore 4000系统提供的三个主要工具进行片段筛选以便提高筛选质量（阴影框内）和简化分析。竞争性分析可显著降低结果的假阳性率，而利用软件中的一般功能即可轻易实现操作。

尽管具有优势，但片段筛选依然面临诸多技术问题。许多结构结合分析方法，如核磁共振成像NMR和X线晶体成像等需要消耗大量的靶蛋白。此外，通常呈现低亲和力的片段（0.1-10mM）需要较高的样品浓度以获得较高的结合位点占用率。在实际操作中，这就意味着在与亲和力相关的分析中，由于溶解度的限制可能被迫使用未达到最佳标准浓度的片段。

Biacore系统的优势是在提供足够通量的同时，仅消耗少量的靶蛋白和片段。然而，SPR技术基于质量变化，分子量较低的片段（相对分子量在80-300）产生的信号也会较弱。总的来说，片段具有非常快的结合速率和解离速率，从而导致呈现方形的传感图。这表明应该使用稳定状态的亲和力分析以明确亲和力的大小，因为在正常情况下，动力学速率常数是无法解决的。

为了应付这些挑战，Biacore 4000 LMW扩展包提供了三种专门的软件工具用于片段和其他低分子量复合物的筛选（图1）。清除筛选工具用于识别那些持续结合的有问题的片段，这些片段可能会降低后续样本的数据质量。进行清除步骤之后，采用结合水平筛选对片段进行优先的后续分析。单浓度的片段与多个固定蛋白进行作用，包括靶蛋白、空白对照和额外的对照靶蛋白。根据结合强度以及通过传感图形状分析得到的结合情况，如次级相互作用情况来选择有前景的结合片段。将优先考虑的片段（或整个片段库）在一系列浓度样本中进行作用结合，并通过亲和力稳定状态分析描述其结合特性，测定用于评定亲和力和配体效率等级的解离平衡常数。在使用非最佳标准浓度样本时，或在与感兴趣的靶位点无关的次级结合等条件下允许采用特定合适算法进行评估。

材料与方法

采用包含1920个片段的内部的无偏重片段库，对能与酪氨酸激酶K1（相对分子量31900）结合的片段进行筛选。根据标准选取片段，这个标准类似与特别强调化学多样性和分子可溶性的三条规定。所选片段的分子量在100 Da到260Da之间，平均分子量为220Da。为了实现最大的样本处理量，所有分析均在关注单个样本的试验安排下进行，而相同的配体则固定在四个流通池内（见图2）。采用氨基偶联的方法将靶蛋白固定在感应芯片CM5表面。分别在1号孔和2号孔固定高水平浓度和低水平浓度的K1蛋白，而碳酸酐酶（CA）则固定在5号孔作为靶向对照蛋白。一个孔含未修饰CM-葡聚糖和另一个活化/失活作为参照（图2）。在每个分析周期中注射四个不同的样本，每个流通池一个样本。

一般而言，片段与靶向分子结合较弱则说明片段从表面完全解离的速率较快，没有必要进行恢复再生。使用Biacore 4000低分子量扩展包中的评估工具对所有筛选进行评估。

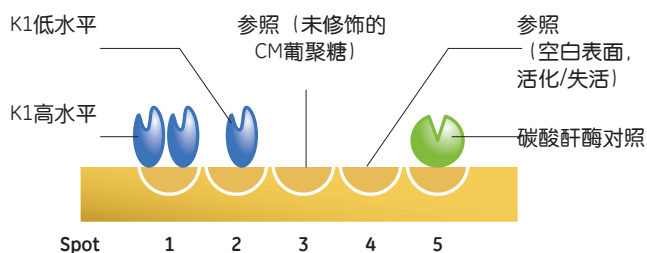


图2. 片段库筛选时的靶配置。

清除筛选

采用相同的注射时间对所有的片段在最高浓度下进行筛选，随后按计划用于后续分析（2mM）。分析缓冲液：10mM HEPES/NaOH pH 7.40, 150mM NaCl, 0.05% P20表面活性剂, 5mM MgCl₂, 1mM DTT和2%DMSO。对结合到固定的靶向激酶和碳酸酐酶（对照蛋白）上的片段同时进行筛选，如图2所示。

结合水平筛选

清除筛选运行设计包含一个具有良好性能的活化位点抑制剂Inh1，作为阳性对照和缓冲液为阴性对照，其同样可用于结合水平筛选的评估。评估内容包括减除参照、溶剂校正和分子量调整。

竞争性分析

在存在潜在特异性位点竞争剂Inh2的情况下，对所有浓度足够高的样本和缓冲液重复进行结合水平筛选，以确保整个分析过程中活化位点被完全阻断。

亲和力筛选

在结合水平筛选中所有孔采用相同的配置。在亲和力筛选中，Inh1同时作为阳性对照和R_{max}对照。采用2μm（KD 20nM）的Inh1饱和浓度来确定R_{max}值。每个样本从2000uM浓度开始逐步对半稀释10次，形成11个浓度（2000、1000、500、250、125、63、31、16、8、4和2uM）。每个样本包括一个空白对照。

结果与讨论

清除筛选

清除筛选的目的是为了识别那些有问题的片段，特别是“棘手”的复合物。这些片段具有明显的持续结合能力，而这可能会降低后续循环分析中的数据质量。对于清除筛选，评估无需对照样本、减除参照或溶剂校正，只需最简单的分析设置。在本研究中，所进行的清除筛选评估设定同样用于结合水平筛选的评估，而这种方法可被高质量的片段库所简化。在这1920个片段以外，有12个片段在浓度为2mM的条件下被确定为问题结合物（占0.6%）。这12个复合物都能发生一般的或靶向相关的持续性结合（图3）。而其中一半的持续性结合物是靶向依赖的，其他的则可以分为一般的持续性结合或葡聚糖结合。

对于每个靶向蛋白，软件的自动评估结果以散点图的形式表现，并在每个循环（n）基线响应和下一个循环（n+1）基线响应之间转变。正是以这种方式，n次循环中注射的样本在n+1次循环中仍然能持续结合，从而可以对其进行定量。定量值根据循环数作散点图。

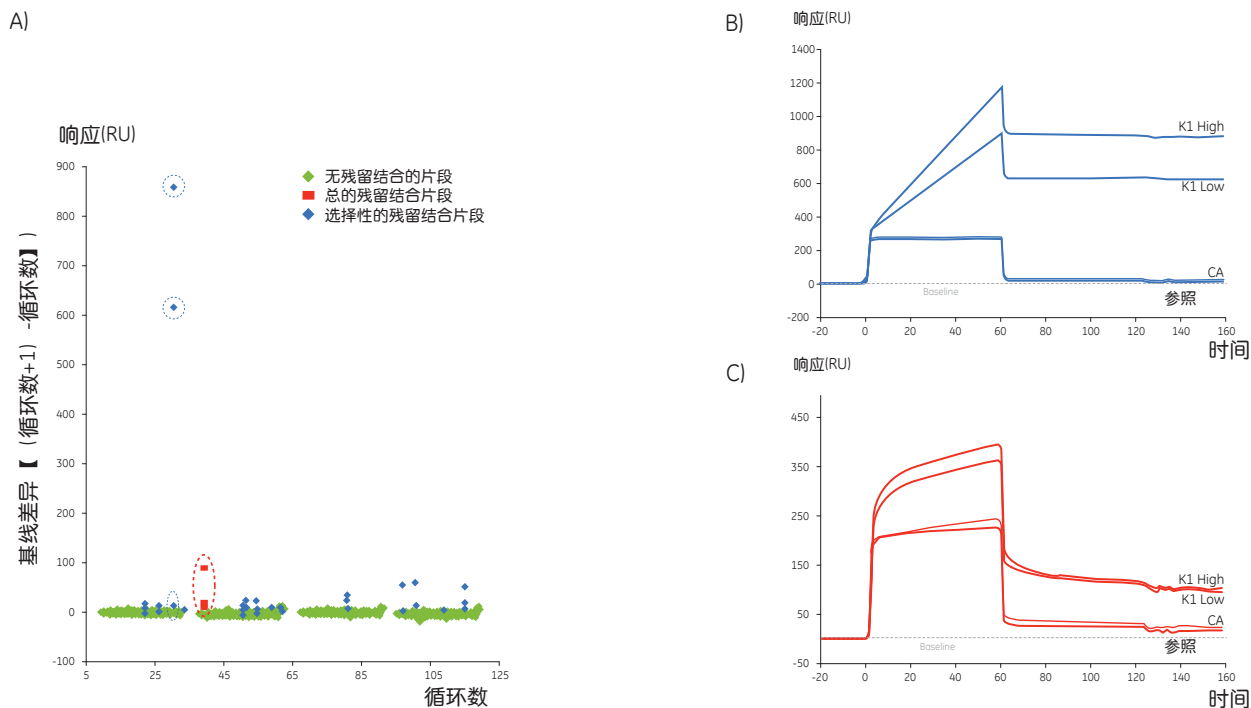


图3. 本研究来自一块芯片板（384个样本）的清除筛选结果：A图显示每个循环（n）基线响应和下一个循环（n+1）基线响应之间的差异。以这种方式，n次循环中注射的样本在n+1次循环中仍然能持续结合，从而可以对其进行定量。定量值根据循环数作散点图。在清除筛选结果中，蓝色的数据点表示与K1选择性结合（持续结合）而与CA（碳酸酐酶）不结合的片段。红色数据点表示在向所有靶蛋白注射后持续信号升高的一般持续结合片段。图B中的传感图代表图A（圆圈内的）中相应的蓝色样本数据，而图C中的传感图代表图A（矩形圈内的）中相应的红色样本数据。

软件自动对样本分配不同的符号（图3）：红色方框表示包含在评估中所有孔内总的残留的结合片段，蓝色方框表示复合物中选择性残留结合的片段（如酪氨酸激酶K1或碳酸酐酶CA），而绿色方框代表无残留结合的片段。残留结合的cut-off设定为10RU。

虽然持续结合不会阻断我们所感兴趣的位点，正如不会影响阳性对照的结合一样，但仍可能导致分析过程中的偏移从而低估片段的结合水平，降低数据质量。问题片段可能会降低片段的优先性，在实验顺序中排在持续结合片段之后。因此对于后续分析有必要去除这些问题片段。

结合水平筛选

在基于片段的药物研发早期阶段，候选片段几乎不可能通过单一的检测从简单结合的片段中可靠地识别出来。因此，设计结合水平筛选仅仅是为了后续工作选择一定数量的片段而不是提供结合片段的安全识别。

结合水平筛选过程支持对那些注射开始后立刻检测响应水平即表现出最强结合能力的片段进行优先考虑。在早期报告时间点提供有关结合水平的足够的测量数据，而同时降低在注射过程中由于发生非特异性结合而无意中使片段发生优先化的风险。这些片段复合物通常无序杂乱的结合，且易于被软件所识别，并用结合行为标志物进行标记。

散点图中片段不同的结合行为用不同的颜色来标记：低解离速率的样本用黄色标记，而速率 $R > R_{max}$ 的样本用青色标记，在结合过程中速率呈现一定斜率的用蓝色表示，有多种结合行为的样本用红色表示。无结合行为的样本则用绿点表示。根据结合水平对片段进行等级评定确定那些潜在的具有强烈结合能力的片段，而结合行为标记物可简化结合行为良好片段的识别过程。因此，结合水平筛选可以为那些最有前景值得后续研究的片段的优化提供足够多的帮助。

自动设定cutoff选取10%的样本，且这些片段作为优先考虑的。然而，为了获取10%具有正常结合行为或其他结合水平的片段，cutoff可以相应的进行调整。

为了获取关于位点特异性的更多信息，在存在位点特异性竞争剂的情况下，在所有样本和缓冲液中进行竞争性试验，从而确保整个运行过程中活性位点被完全阻断。将该运行结果的数据与无竞争剂存在情况下进行的实验结果数据进行比较。Hits的初次筛选需要两个选择标准：结合水平的差异应该在20RU和50RU之间，在存在竞争剂的情况下，结合水平在10RU左右或更小（图5）。这种分析设定非常有效，因为在存在竞争剂的情况下，所有片段的结合都与靶蛋白的其他结合位点有关，而与研究感兴趣的位点无关，在本研究中将其视为次要结合。

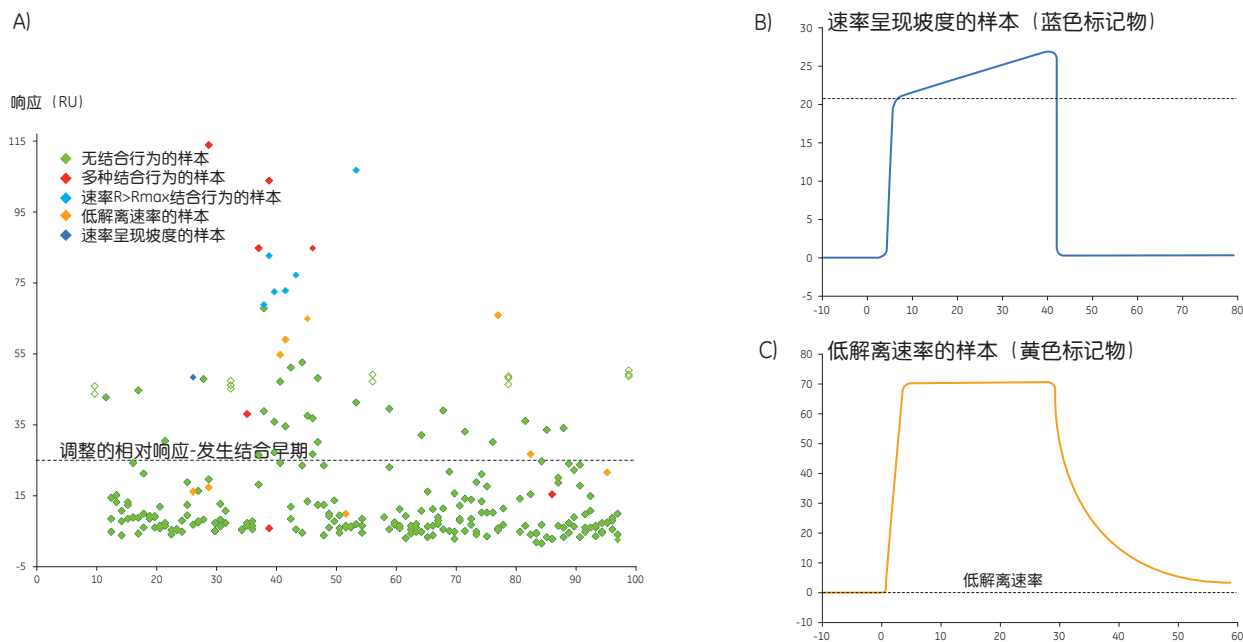


图4. 将384个片段(浓度2mM)对靶蛋白K1进行结合水平筛选。(A) 分子量调整后的结合响应对循环数的散点图。(B) 含结合行为标记物的速率呈现斜率的样本传感图的图解说明(注射样本过程中信号不断增强;蓝色标记)。(C) 含结合行为标记物的低解离速率样本的传感图的图解说明(延迟一段时间后,信号降低趋于基线)。

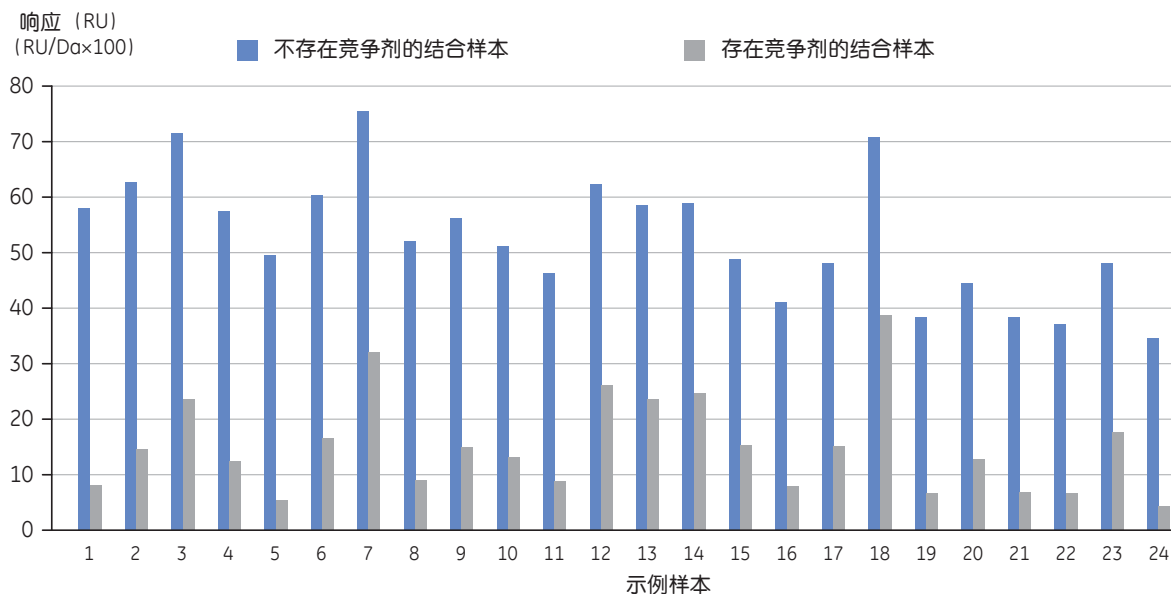


图5. 对于样本的选择,在存在竞争剂(灰色)或不存在竞争剂(蓝色)的条件下进行结合水平的比较。

这些数据中表明,192个化合物,其中180个Hits,12个作为阴性对照的片段作为初次筛选的样品并进行之后的亲和力筛选。竞争性试验的主要优势在于其显著降低了后续分析的样本假阳性率。

亲和力筛选

清除筛选和结合水平筛选是基于单样本浓度的分析过程,而亲和力筛选则需要每个样本有一系列的浓度。在经典的稳定状态亲和力分析中,理想的浓度范围必须扩大到至少两倍的相互作用的 KD 值。在低亲和力片段的实际应用中几乎是不可行的。

预先设定的 R_{max} 允许在次优浓度下进行分析

符合亲和力筛选提供的预先设定的 R_{max} 值增强了分析质量，同时允许其在相对于 K_D 来说次优的浓度梯度下进行分析。在本研究中，自由拟合与预先设定 R_{max} 拟合一致，增加了结果的可信度，证实了数据的高质量，这些可以通过使用清除筛选、结合水平筛选和竞争性分析来可靠地获得。

为确保稳定的评估，可使用已知能与靶蛋白感兴趣位点紧密结合的阳性对照片段。对照结合片段的结合能力被用来自动计算每个片段的经分子量调整的预定 R_{max} 值。这个数值被用作亲和力评估的基础，可见图6的示例。

存在次级相互作用时的亲和力评价

亲和力筛选评价通过将结合数据放入单位点或多位点的相互作用模型中来估计其结合强度。当速率 $R > R_{max}$ 或传感图显示结合时速率出现斜率并且解离缓慢时（这两高 R_{max} /常数 R_{max} 比率反而表明缺少有关 R_{max} 的信息，导致高度依赖使用预定 R_{max} 进行的评价（图7B）。

与其名称不一样，多位点模型只确定与预定 R_{max} 有关的单个亲和力；然而，它是在存在次级相互作用的情况下进行的。

由于预期片段结合会以快速的结合、解离速率发生，可以假设开始样本注射后几乎立即达到平衡，此时的数据很少受到次级结合事件的影响。因此，亲和力筛选曲线图更喜欢使用这个早期数据点，而不是靠近注射结束时的数据点，后者通常被用于测定稳定状态亲和力。

成功进行X射线晶体成像筛选的候选片段的选择

使用结合水平筛选和竞争性分析所选择的192个片段，使其在11个浓度梯度中进行运行，浓度范围为 $2\mu\text{M}$ 到 2mM 。使用与结合水平筛选相同设置的流通池。建立预定 R_{max} ，并通过确认饱和浓度 $2\mu\text{M}$ 下单次注射抑制剂（Inh 1）的结合水平来监测表面活性。

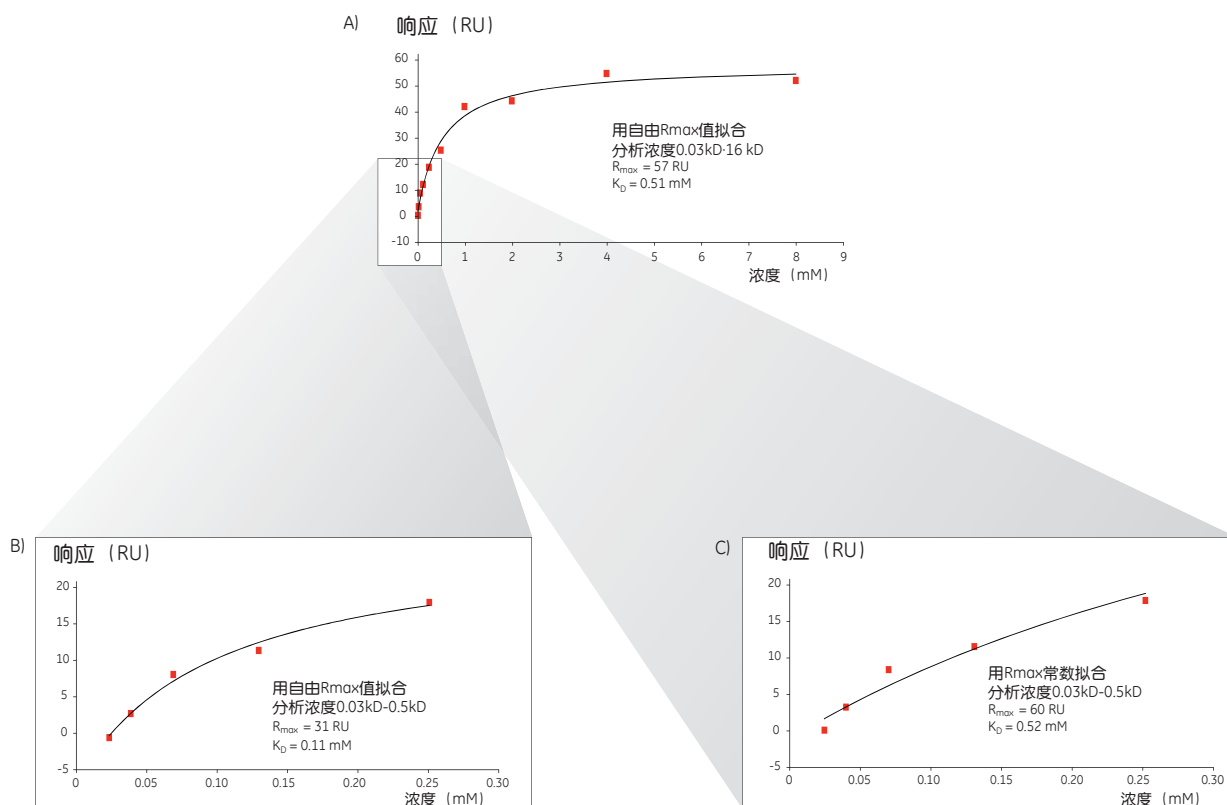
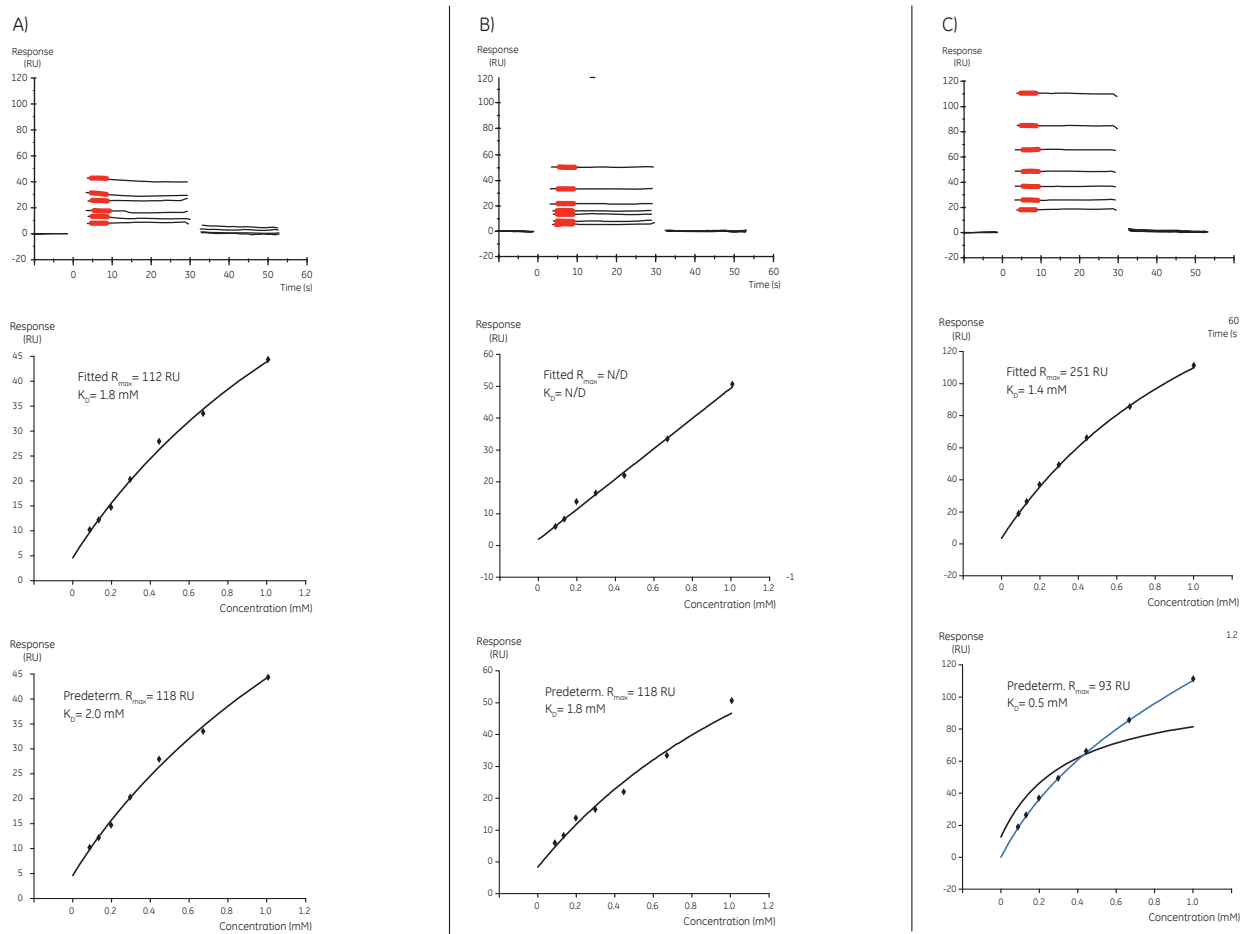


图6. 预定 R_{max} 值的原理。上方的图（A）显示数据集示例的拟合（模拟 $R_{max}=60 \text{ RU}$ ， $K_D=0.5 \text{ mM}$ ），浓度远远高于 K_D ，结果可以很好地获得 K_D 。（B）前五个点的拟合，代表片段的典型状况。在这里，由于数据点缺乏有关 R_{max} 的信息，无法正确测定 K_D 值。（C）与常数预定 R_{max} （ 60 RU ）拟合，很好地获得 K_D 值，接近模拟值。在这种情况下，数据点缺乏的有关 R_{max} 的信息可以由其它来源提供。在真正的实验中，可以从阳性对照获得这一信息。

片段的高溶解度使浓度可以达到2 mM，这提供了良好的拟合质量，因此亲和力估计的可信度非常高（图8）。

研究的最终结果为105个命中，亲和力范围为13 μ M到>3 mM。这些Hits满足以下标准：1) 位点特异性是竞争性分析中已有的标准。2) 它们可以在单位点模型中进行拟合，效果比使用多个点的模型好。3) 在预定的Rmax范围内达到或将达到表面饱和。

已经使用ITC对K1的105个Hits进行定性分析，80%以上被确认为结合片段。最后，根据化学多样性、配体效率和亲和力从105个命中位点中选择48个进行结晶。浸泡和共结晶实验表明，共有41个片段在分辨率2.0-2.9Å有清晰的电子密度，亲和力范围为43 μ M到>3 mM。相应的X射线成功率>85%，反映出Biacore 4000提供的数据选择过程具有很高的质量和成功率。



12

图7. 最上面一行显示传感图数据，数据读取框标为红色。中间一行举例说明这三个数据集的自由拟合，最下面一行显示相同数据集与预定常数Rmax的拟合。（A）列举例说明两种方式都拟合良好的数据集，拟合与预定Rmax之间的一致性良好（Rmax比率接近1）。中间列（B）举例说明使用自由拟合测定参数失败（Rmax比率高），而与预定Rmax拟合成功。右边列（C）举例说明自由拟合与数据反应表明超化学计量结合。使用多位点模型和预定Rmax可以确定化学计量高亲和力KD。

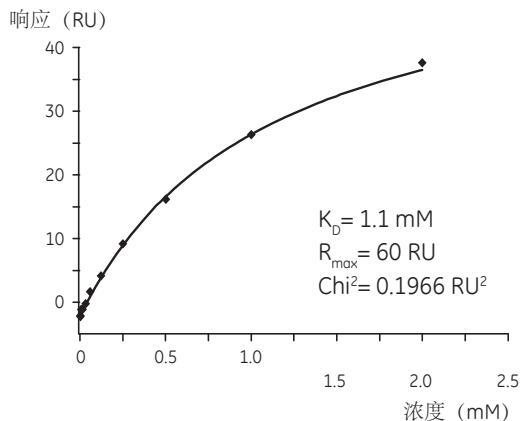


图8. 举例说明1:1化学计量下高质量测定1 mM亲和力

结论

使用Biacore 4000系统对片段库进行筛选提供了高效、信息丰富的途径，可以在X射线晶体学等结构方法前使用，或同时使用。进行这一操作时采用适合片段库的连续处理量，靶蛋白的消耗量非常低，可以在扩大靶蛋白生产之前进行。尽管存在片段筛选的挑战，Biacore 4000配备的新的评估工具支持快速去除聚集的问题片段，通过高灵敏度和结合行为分析高效选择优先片段，在使用次优的样本浓度并且存在次级非特异性结合下，仍然简化了以亲和力为基础等级评定，从而产生高质量的数据。

1+1>2 ?

利用ITC研究低亲和力的配体片段 FBDD

W. Bruce Turnbull博士

将配体分解为更小的片段能够为分析蛋白质-配体相互作用中关键功能基团的作用提供一种策略。能够同时占据受体结合位点的低亲和力配体片段经常可以被连接在一起以形成高亲和力的抑制剂。这些研究的主要挑战在于测量低亲和力相互作用的热力学。这份白皮书将解决通过等温滴定量热法 (ITC) 研究低亲和力系统的问题。主题将包括利用低于KD的受体浓度 (即低的c值) 工作, 以及置换技术如何能够用于测量非常低的亲和力, 同时遵从c值规则。这将从利用碳水化合物结合蛋白的研究例子中得到说明。

介绍

分子识别对于从酶催化到信号转导的所有生物学过程都是一个根本性的先决条件。现代制药业正是建立在对这些系统的选择性干预的理念上 (1)。此外, 从超分子化学到开发用于纳米技术和分子电子学的新型材料和元件也正在实施类似的理念 (2)。如果我们想要驾驭分子识别的全部潜能, 那么我们理解复合物形成中结构与热力学之间的微妙相互作用就十分必要。

ITC已经很快成为研究分子识别过程的一种最普通的技术之一, 而且成为测定焓和熵对整体结合自由能 ΔG° 的作用所选择的技术(3-5)。

$$\Delta G^\circ = \Delta H - T\Delta S^\circ [1]$$

因为ITC只要求在复合物形成时有可测量的焓变化, 因此它一般适用于大多数系统。由一个ITC实验所获得的热力学参数对发生在溶液中的所有过程进行了总结 -- 氢键的形成和断裂、构象改变、去溶剂化等。因此单个实验将不能对单个羟基或苯环对整体结合焓或自由能的作用进行测定。通过研究一种给定受体对一系列在结构上显示系统变化的配体的相互作用, 分解配体的各个片段的结合贡献是可能的。假如所有的片段配体以相似的方式结合到它们的母配体上, 那么就有可能分配一种关键配体的每个部分的热力学贡献 (图1A)。

然而, 如果一种特定的功能基团或片段是总结能的主要贡献者, 则这个片段的去除将导致配体对受体具有非常差的亲和力。尽管人们可以定性地推断被删除的这个基团对于活性是必要的, 但是为了得到更详实的、定量的系统图像, 有必要测量即使是最低亲和力的相互作用。

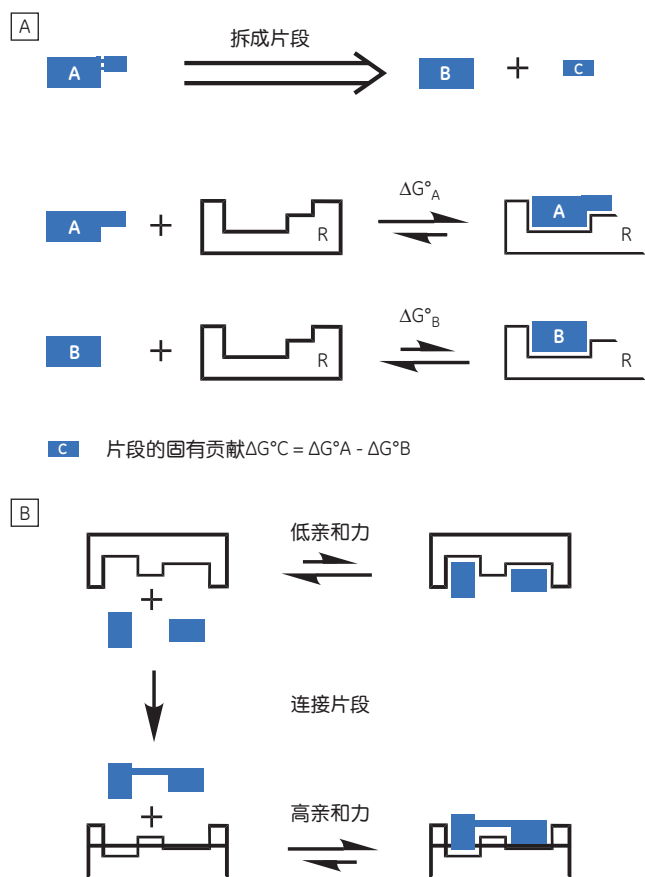


图1. (A) 配体A被分解为两个片段B和C, 它们可以被用于评估这个分子的这些部分对整体的结合相互作用的贡献。(B) 低亲和力“片段”配体可以被连接在一起形成高亲和力配体。

如果一个高亲和力配体可以被分解为低亲和力片段，则反之亦然：如果两个或更多个低亲和力片段可以同时被受体结合位点所容纳，则应该有可能通过适当的接头把它们连接在一起形成高亲和力的配体（图1B）。事实上，这种现象已经是广为人知的整合作用（6）。一旦一半的二价配体已经被连接到它的受体上，在结合位点附近就有非常高的二次识别元件的局部浓度，从而提高了发生二次相互作用的可能性。另外，整合作用可以用熵补偿的概念描述：必须为两个分子相互作用以形成一个颗粒时独立的旋转和平移程度的丧失付出代价（7）。当二价配体的两个片段结合到它们的受体上时，必须付出两倍的补偿。然而，完整的二价配体只需要补偿这个处罚一次，因此可以大力提高相互作用的亲和力。

这种用于配体设计的基于片段的策略在制药行业正获得更广泛的认可（8,9），特别是在现有化合物库的高通量筛选不能为一种给定的目标蛋白鉴定一种合适的先导化合物时。通常，采用基于NMR的筛选方法鉴定成对的小分子“片段”（< 250 Da），并用于提供受体结合位点中关于它们的定位的结构数据（10,11）。ITC能够提供互补的信息，例如片段结合的验证。此外，选择显示最有利的焓变化的片段可以证明是一种有用的策略，对于最终配体的结合选择性的最优化是非常有用的（3）。然而，利用ITC测量对于低亲和力系统的热力学参数并不总是微不足道的。两种用于研究弱的结合配体的策略方法将在这份白皮书中被列出，但首先理解与低亲和力系统有关的特殊问题是十分重要。

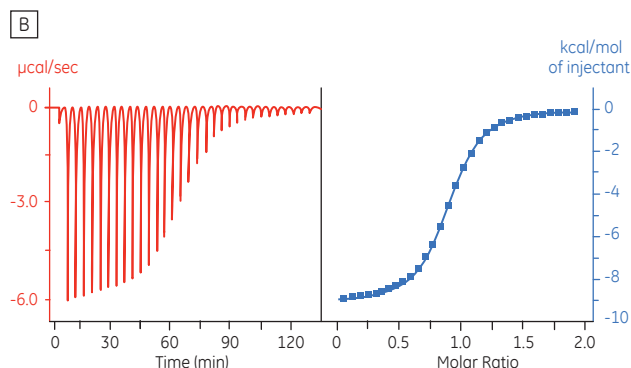
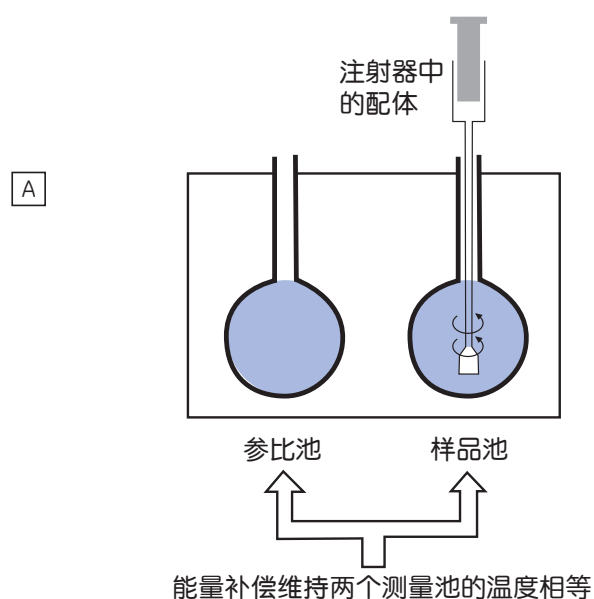


图2. (A) 描绘等温滴定量热法基本设计的示意图。(B) 典型的滴定数据：原始数据显示两个加热器功率差对时间的差异（左图）；每次注射的积分热量变化具有最佳拟合曲线（右图）。

ITC实验

等温滴定量热法含有两个测量池 -- 一个是进行滴定实验的样品池和一个只含有水的参比池（图2A）。每个池的温度由小加热器维持恒定，加热器由功能强大的反馈系统控制。在一个放热系统的滴定期间，当配体和受体相互作用时热量被释放。如果两个池要被保持在相同的温度，则补充到控制样品池温度的加热器中的能量比补充到参比池中的少。被补充到每个池中的能量的差别被记录为时间的函数（图2B）。这个能量对时间积分的曲线提供与每次连续添加配体到样品池中的受体溶液相关的热量变化。

在滴定开始时，每次添加配体时有相对大量的热量被释放，反映了每步复合物形成的大量增加。在滴定结束时，所有的受体结合位点现在都被占据，随后的热量变化主要是由于稀释配体到样品池中的结果。焓变化 ΔH° 、结合常数 K 和结合位点数 n 都可以利用适当的模型通过非线性最小二乘法拟合曲线，例如简单的1:1结合：

$$\frac{dQ}{d[X]_t} = \frac{\Delta H \cdot V_0}{2} \left[1 + \frac{1 - \frac{[X]_t}{n[M]_t} - \frac{1}{n[M]_t K}}{\left\{ \left(\frac{[X]_t}{n[M]_t} \right)^2 - \frac{2[X]_t}{n[M]_t} \left(1 - \frac{1}{n[M]_t K} \right) + \left(1 + \frac{1}{n[M]_t K} \right)^2 \right\}^{1/2}} \right] \quad [2]$$

其中 $[X]_t$ 和 $[M]_t$ 分别是总配体和受体（大分子）浓度， V_0 是量热器测量池的有效体积，而 dQ 是滴定期间每个点的逐步热量变化。然后可以利用方程1和方程3计算 ΔG° 和 ΔS° ：

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A [3]$$

然而 ΔH° 影响Y轴截距，而化学计量学 n 控制拐点的位置，曲线的整体形状取决于结合常数 K ，也取决于结合位点浓度 $n[M]_t$ 。这种亲和力和实验设计之间的关系被所谓的Wiseman c -参数所总结：

$$c = n[M] K [4]$$

曲线的形状，包括Y轴截距相对于 ΔH° 的位置，与沿着X轴和Y轴的绝对刻度无关，是取决于如图3所示的 c 值（12）。对于 c 值大于10，曲线是明显的S形，并且随着 c 值接近亲和力而趋向垂直。

然而，随着 c 值降低到10以下，拐点变得很难定义，而且结合的化学计量学不再可以通过实验测定。因此为了同时测定 ΔH° 、 K 和 n ， $1 < c < 500$ 是必要的。 c 值实验窗口的范围提供了一个研究低亲和力相互作用的特殊方法。

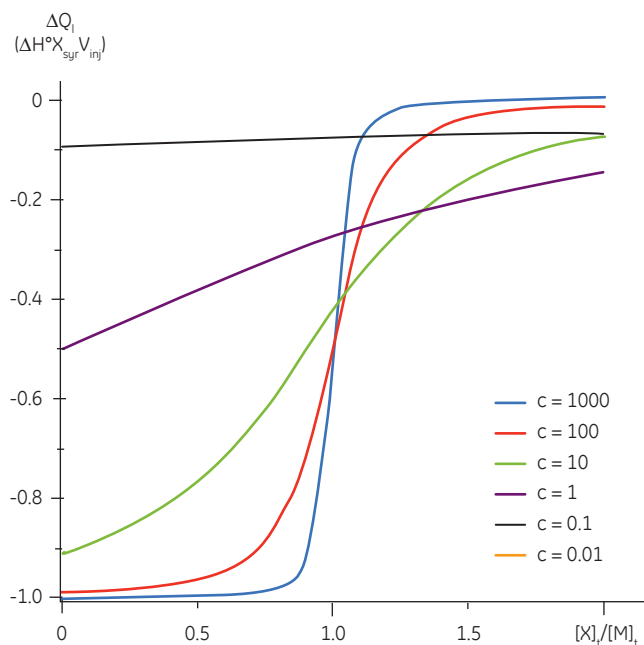


图3. Wiseman等温线的传统描绘。

对于 $K_D = 1$ mM的系统， c 值为10将需要初始受体浓度达到10 mM，而最后的配体浓度将大约是这个值的两倍。因为样品池一般具有大约1.4 ml的体积，因此每个实验将需要大量的结合伴侣。然而，许多中等大小的蛋白在1 mM以上是不可溶的，注射器中的配体浓度通常需要是样品池中受体浓度的10倍。因此，在应用传统方法进行ITC实验设计时，受体和配体溶解度实际上是研究低亲和力系统的主要限制。

如果ITC在这种情况下被证明是有用的，将有必要以这样的方式设计实验，即完成滴定所需要的配体和受体的量被最小化。我们提供了两个这样的策略：在存在竞争配体或在低 c 值条件下进行滴定。

竞争检测法

要考虑的第一种情况是一种中等到高亲和力配体（ K_D 在 μ M到nM之间）的热力学结构-活性关系研究。在这里，研究的目的是测定分子的每个部分对整体的自由能或与受体的相互作用焓作出什么贡献。高亲和力配体A可以被分解为两个片段-B和C（图1A），用于随后的结合研究。尽管高亲和力的配体（A）结合的足够紧密，使它很容易实现S形曲线，但片段B和C每个 K_D 都有大于1 mM-受体R的溶解度限制。

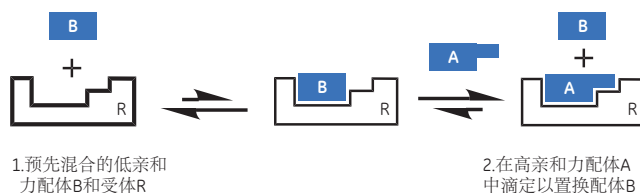


图4. 利用高和低亲和力配体竞争结合受体R的置换滴定。

在这个假设的例子中，有一个“表现良好的”配体可以在普通的 c 值试验窗口中被研究，而另外两个配体应该是A-R相互作用的弱竞争性抑制剂。因此，应该有可能通过竞争/置换检测法研究弱的配体（图4）。如果高亲和力配体A被加到受体和低亲和力片段B的溶液中，受体将仍然优先与配体A相互作用。然而，结合等温线形状相对于不存在B时将被干扰。如果受体分子的一部分目前结合到片段B，则可以与A相互作用的自由受体的浓度将减少，结合等温线将有一条更浅的曲线，反映了更低的表现 c 值。同样的，如果配体A和B两者都与负的焓变化有关，片段B从结合位点上被置换将是一个吸热过程，必须在A的结合放热之前发生。因此，对于A结合R的表现 ΔH° 将是较小的负数。

介绍了一种方法用于从置换滴定方法中导出低亲和力结合参数，这种滴定法已经利用标准的一点模型进行曲线拟合（14）。使用方程5和6计算对于低亲和力配体（B）的结合常数和结合焓。

$$K_B = \left(\frac{K_A}{K_{Aapp}} - 1 \right) \frac{1}{[B]_t} \quad [5]$$

$$\Delta H_B^\circ = (\Delta H_A^\circ - \Delta H_{Aapp}^\circ) \left(1 + \frac{1}{K_B [B]_t} \right) \quad [6]$$

其中 K_A 和 K_B 分别是对于高和低亲和力配体的结合常数。 K_{Aapp} 是对于配体A在存在给定浓度的配体B ($[B]_t$)时的表观（即实验测定）结合常数。 ΔH° 参数以一种类似的方式被定义。

这种方法现在已经很大程度上被Sigurskjold严格的置换模型所取代（15），它允许结合参数在曲线拟合过程中被直接测定。尽管Sigurskjold最初导入模型是为了扩展 c 值实验窗口的高亲和力范围，这种方法也同样适用于低亲和力系统，而且已经被用于研究EDTA结合的金属离子（16）以及碳水化合物衍生物结合凝集素（17,18）的片段。

只要对于高亲和力配体A的 K 和 ΔH° 已知，对于低亲和力片段B的相应参数就可以被测定。因此，置换检测法提供了在正常的 c 值实验窗口中测量低亲和力相互作用的机会，同时使用更低的受体浓度（即 c 值在关于高亲和力相互作用方面被定义）。在我们的经验中，与它对受体的 KD 相当的低亲和力配体浓度足以用于置换检测法的应用。这些浓度比低 c 值条件下用于直接滴定的必要浓度低得多（见下文）。

当然，有三个重要的注意事项必须注意：1）对于高亲和力配体的参数误差将被合并到低亲和力竞争剂导出的参数中；2）对于一个自由能变化的比较分解，必须假设低亲和力片段正结合到与高亲和力对应部分相同的受体部分上；3）当存在适当的高亲和力配体时，这种策略只适合测量低亲和力。因此，竞争法适用于结构-活性关系，不适合目标是找到高亲和力配体的基于片段的药物设计。然而，在后一种情况下，低 c 值滴定可能是合适的。

低 c 值滴定

在产生S形曲线的条件下进行ITC实验始终是最好的。然而对于低亲和力系统，由于没有高亲和力竞争配体，或当受体浓度被溶解度或可用性限制时，则低的 c 值滴定没有替代方法。图3显示随着 c 值降低到低于1，曲线变成平的无特征线，从而不适合用于曲线拟合。然而，Wiseman等温线的传统描述有些误导。曲线的拐点随着 c 值降低的确变得很难定义，但曲线不是平的！

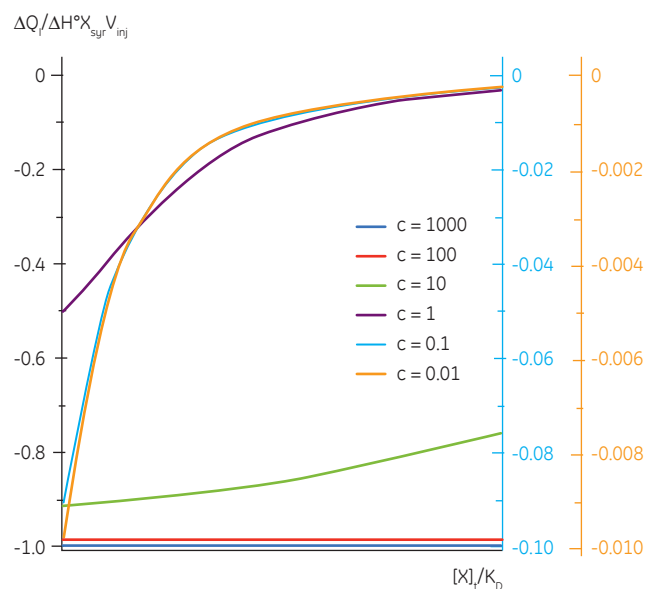


图5. Wiseman等温线的另一种描述，其中逐步的热量变化（关于 ΔH° 和每次注射添加的配体量进行标准化）对配体浓度与相互作用解离常数的比例作图。用于 $c = 0.1$ 和 $c = 0.01$ 的不同刻度被显示在图的右边。

在 $KD = [M]_t$ 时的 $c = 1$ 边界中，系统已经转移到一个新的状态，在这个状态下受体占有基本上独立于受体浓度，并主要依赖配体浓度 $[X]_t$ 对 KD 的比例。如果图3用 $[X]_t/KD$ 在 x 轴上重绘，如图5所示（19），则现在正是高的 c 值曲线变平，而低的 c 值曲线接近恒定的双曲线形状，虽然在 y 轴上具有不同的刻度。图5证明对于 $c < 1$ ，接近受体饱和需要配体浓度比 KD 高五倍。

在 $c = 0.1$ 时将需要100当量的配体以达到90%的饱和 - 与 $c = 10$ 时进行滴定期间所添加的两个标准当量相差很远。虽然，乍看起来，低 c 滴定在配体消耗方面似乎更浪费，但必须记住这些是相对的量。在绝对数量方面，低 c 滴定只需要 $c = 10$ 时所使用的1%受体浓度和大约50%的配体浓度。重要的是要注意到对于低的 c 值，在 $[X]_t/[M]_t$ 和受体饱和度之间没有简单的相关性；每个结合位点只添加两个当量将获得非常小的络合作用和不足的结合等温线部分，以允许进行成功的曲线拟合。因此需要多少的结合等温线呢？根据我们的经验，对于以70、80或90%饱和度结束的滴定获得类似的结果（19）。

随着 c 值降低到10以下，曲线拐点变得不清楚，出现了结果不足以证明拟合方程中三个变量参数的更简单的曲线形状。因此，当曲线拟合时有必要固定结合化学计量学。这种观察对于实验设计具有重要的实用影响：当利用 $c > 10$ 进行滴定时，每次注射中添加远小于1个当量的配体是至关重要的。以便可以获得足够数量的数据点以定义结合等温线的形状。如果对于低 c 滴定采用类似的方法，最后的 $[X]_t/[M]_t$ 大约为50，则高达500次少量注射是必需的，每次注射都会导致受体结合有非常小的增加，并且可能导致非常差的信噪比水平。然而，如果化学计量法不能由实验测定，则不需要记录滴定等当量点附近的许多数据点。因此，更适合把滴定分为通常的20到30次注射，并且每次增加多个当量的配体，从而最大化每个数据点的信噪比。

值得注意的是达到足够水平的信噪比对于低亲和力系统通常是一个次要的问题，因为对于每次注射的热量变化的数量级取决于形成的复合物的量以及摩尔焓变化 ΔH° 。对于一个给定的 c 值，具有更低亲和力的系统很明显将具有更多的受体存在。如果高和低亲和力系统达到一个相等水平的受体饱和度，接下来进行相等数量的注射，然后正是低亲和力系统将显示最高水平的信噪比。

如果结合的化学计量学在曲线拟合期间被固定，则配体和受体浓度准确已知变得非常重要，因为在曲线拟合过程中不再对这些值有独立的检查。图6显示在高和低 c 值条件下，强加于受体或配体浓度上的误差如何影响对于 ΔG° 和 ΔH° 的计算值。通常，浓度误差对 ΔG° 几乎没有影响 - 也许是由于 ΔG° 和 K 之间对数关系（方程3）的结果。然而， ΔG° 的准确度更加高度依赖于受体浓度的准确性（对于低 c 值），或配体浓度（对于高 c 值）。

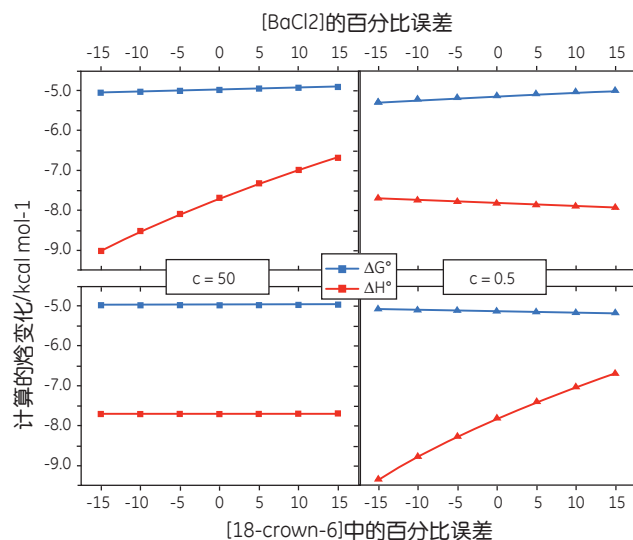


图6. 对于在 $c = 50$ 和 $c = 0.5$ 时进行滴定，配体（BaCl₂）和受体（大环离子整合剂18-crown-6）的浓度误差对 ΔG° 和 ΔH° 的计算值的影响。

如果遵循一些简单的规则-获得具有良好信噪比水平的结合等温线的充分部分，以及准确的受体浓度知识 - 非常有可能获得低 c 值下低亲和力系统的结合数据。评估在 $c = 1$ 以下进行滴定的准确度的指南目前已经由Turnbull和Daranas提出（19），并总结在图7中。为了使 ΔG° 或 ΔH° 分别获得小于0.4 kcal mol⁻¹或1 kcal mol⁻¹的误差， ΔH° 和 $\log c$ 的特殊组合必须位于适当的 $\log KA$ 线的右侧。例如，在 $c = 0.01$ ($\log c = -2$)下研究的具有 $KD = 1$ mM ($\log KA = 3$)和 $\Delta H^\circ = -10$ kcal mol⁻¹的系统应该提供的 ΔG° 误差小于0.4 kcal mol⁻¹。

然而，在 $c = 0.001$ ($\log c = -3$)时研究的相同系统将提供超出指定误差范围的结果。这些图都来自根据MicroCal™ VP-ITC的技术规格的模拟数据集（19）。尽管从信噪比作为 ΔH° 和 c 值的函数角度它们提供了合理的准确度估计，但它们不容许在配体或受体浓度上出现误差。这样它们只提供对源自实验的参数正确性进行粗略的回顾性检查。

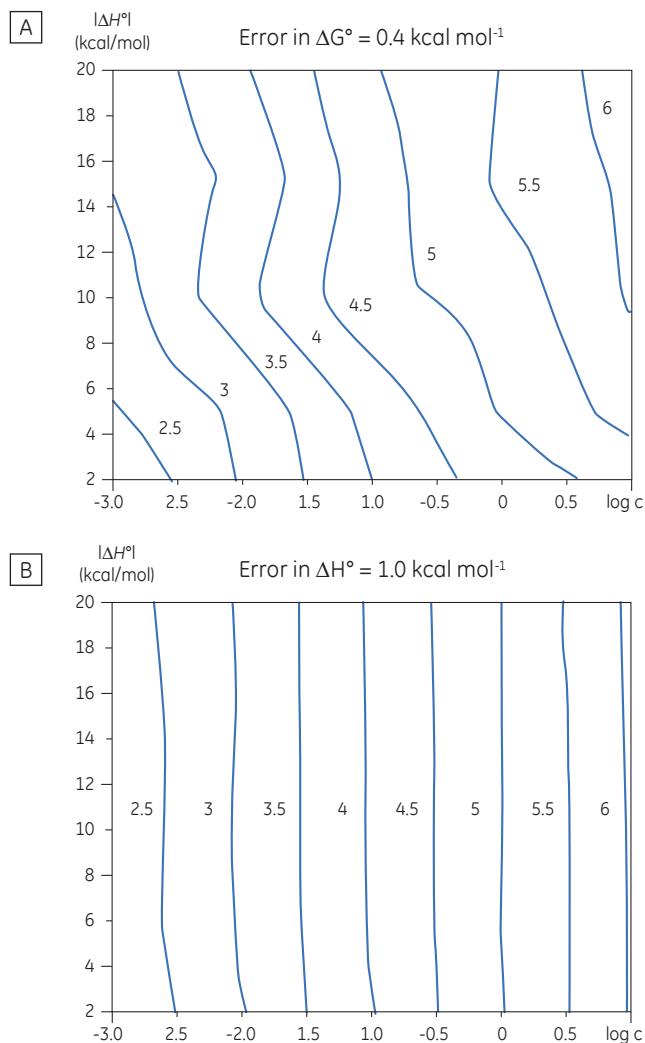


图7.等高线图显示log c、log KA和 ΔH° 的组合将导致 (A) 在 ΔG° 中0.4 kcal mol⁻¹和 (B) 在 ΔH° 中1.0 kcal mol⁻¹的误差，通过曲线拟合计算。为了低于这个误差范围，log c和 ΔH° 的组合必须位于给定的log KA等高线上的右侧。

案例研究：霍乱毒素-神经节苷脂GM1相互作用的热力学分解

蛋白质-碳水化合物相互作用介导了许多重要的生物学过程，包括细胞粘附和信号转导 (20)。然而，它们多是具有毫摩尔到微摩尔范围内的低亲和力。对于这个规则有一个值得注意的例外是细胞表面糖脂、神经节苷脂GM1和霍乱毒素B亚基 (CTB) 之间的高亲和力相互作用。霍乱毒素是一种AB₅蛋白复合物 - 一个简单的A亚基，具有细胞毒性的ADP核糖转移酶活性，五个相同的B亚基拷贝，作为GM1寡糖部分的受体。毒素到细胞表面GM1的粘附是毒素内吞和激活的前提条件。

CTB-GM1相互作用是一种用于结合分析的常用基准，因此能够使用各种技术进行研究，包括荧光光谱 (22)、表面等离子体共振 (23)、原子力显微镜 (24) 和ITC (17,25)。CTB和它与GM1寡糖(GM1os)以及类似寡糖的复合物也已经通过X射线晶体学被广泛地研究 (26)。晶体结构表明，分枝的GM1os以“双指紧夹”的形式结合蛋白 (图8)，与位于非还原末端的三个糖基具有大量的氢键连接。剩下的两个糖基离开蛋白表面，并与神经酰胺形成连接点，把GM1锚定在细胞膜上。

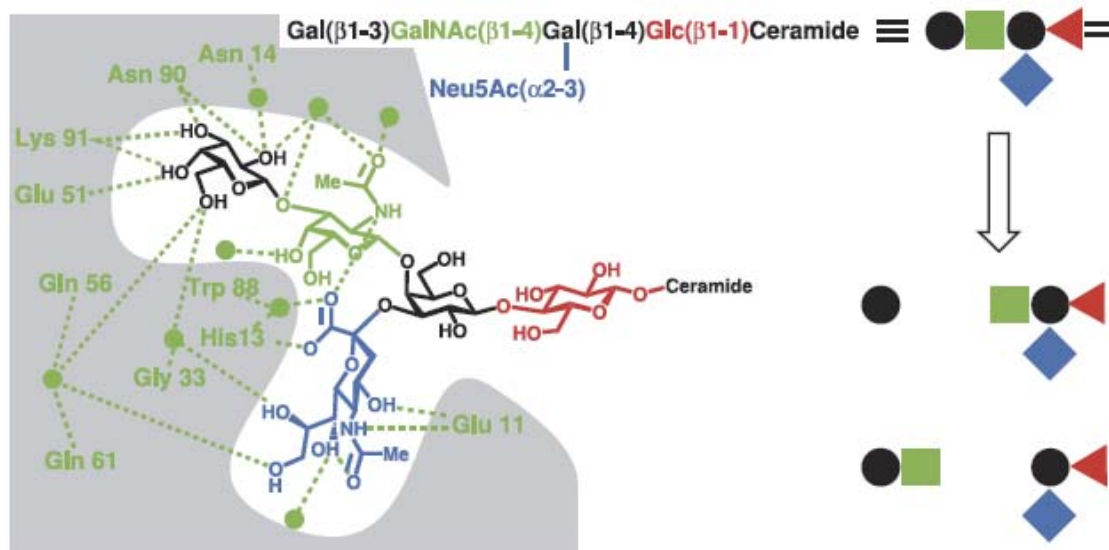


图8. CTB-GM1相互作用图，在Merritt等(26)之后。五糖从片段上裂解（右下图）用于随后的结合研究。

GM1os五糖被分解为从单糖到四糖的片段以评估三个末端糖基的每一个对整体结合能作出的贡献 (17)。在这种情况下使用可溶性低聚糖 (即无脂类) 十分重要, 以避免可能使数据分析和结果解释复杂化的多价相互作用。此外, 在适当的时候, 在低聚糖片段的还原末端的糖基被固定作为具有适当的异头构型的甲基糖苷。通过NMR光谱测定低聚糖浓度是最方便的, 使用已知浓度的乙醇作为内参, 然后被冷冻干燥并溶解在适当体积的缓冲液中。通过在280 nm的紫外吸光度测定蛋白浓度。

当使用10 μM ($c = 230$)的初始CTB亚基浓度时, GM1os低聚糖被发现结合非常紧密 ($K_D = 43 \text{ nM}$), 并提供具有极好的信噪比水平的明确的S形曲线 (图9A)。然而, 所有的其他片段结合非常弱, 即使当使用浓度非常高的CTB时 (一般为145-265 μM), 只能获得低 c 值双曲线 (图9B)。在唾液酸乳糖三糖的案例中不能检测到任何结合 (图9C), 尽管添加超过20当量的配体 (最后的配体浓度=5 mM - 更高的浓度会抑制配体的有效性)。平的结合属性可能是由于非常小的焓变化, 或比所使用的最大配体浓度高得多的解离常数。随后的研究与后面的争论是一致的。

尽管在这些低 c 值下对于一些配体可以获得高质量数据 (对于图9B $c = 0.03$), 高浓度CTB需要通过透析和冷冻干燥回收蛋白。因此, 置换检测法被改变为另一种被证明为更有效的替代方法, 无论是在时间还是在每个实验所使用的蛋白量上。一个典型的置换滴定法如图9D所示。这种滴定法与图9A所示的方法相同, 除了它是在25 mM GalGalNAc二糖存在时进行外。置换实验显示标准化焓变化的明显减少以及在等价点附近更缓和的斜率。在接近滴定结束时明显稀释热的大幅增加, 是检测池中有25 mM配体的结果, 但在注射器中没有配体。对于不带电的低聚糖, 通常由可能粗略计算的稀释热作为一个常数, 可以从每个数据点减去该常数。然而, 在存在带电配体或与相互作用热相比具有高的稀释热配体的情况下, 最好在注射器和检测池中维持相等浓度的低亲和力配体, 特别是如果配体浓度接近缓冲液浓度时。如果提供足够量的配体, 通过利用低亲和力配体的溶液透析受体, 浓度是最容易被匹配的。Sigurskjold置换模型可以被很容易地修改以适应在恒定浓度下具有的低亲和力“B”配体。

置换检测法允许对所有的片段配体进行参数测量, 包括非常低亲和力的甲基唾液酸 (红色菱形)。在表1中引用的误差是那些被Origin™曲线拟合软件返回的误差。重复滴定表明来自置换滴定法的 K_A 误差大约为 $\pm 20\%$ -大约为直接GM1os-CTB滴定法的误差的三倍。在甲基唾液酸参数中的较大的不确定性本质上是由于它对CTB的低亲和力引起的, 而不是因为所使用的配体浓度小于这个相互作用的 K_D 。在所有其他情况下, 低亲和力配体的浓度为 $1-3 \times K_D$ 。在测量时, 在通过低 c 滴定法和置换滴定法所测量的热力学参数之间具有合理的一致。例如, GalGalNAc与CTB的低 c 滴定 ($c = 0.01$) 提供 $K_D = 8.3 \text{ mM}$, $\Delta H^\circ = -9.3 \text{ kcal mol}^{-1}$, $T\Delta S^\circ = -4.3 \text{ kcal mol}^{-1}$ 。

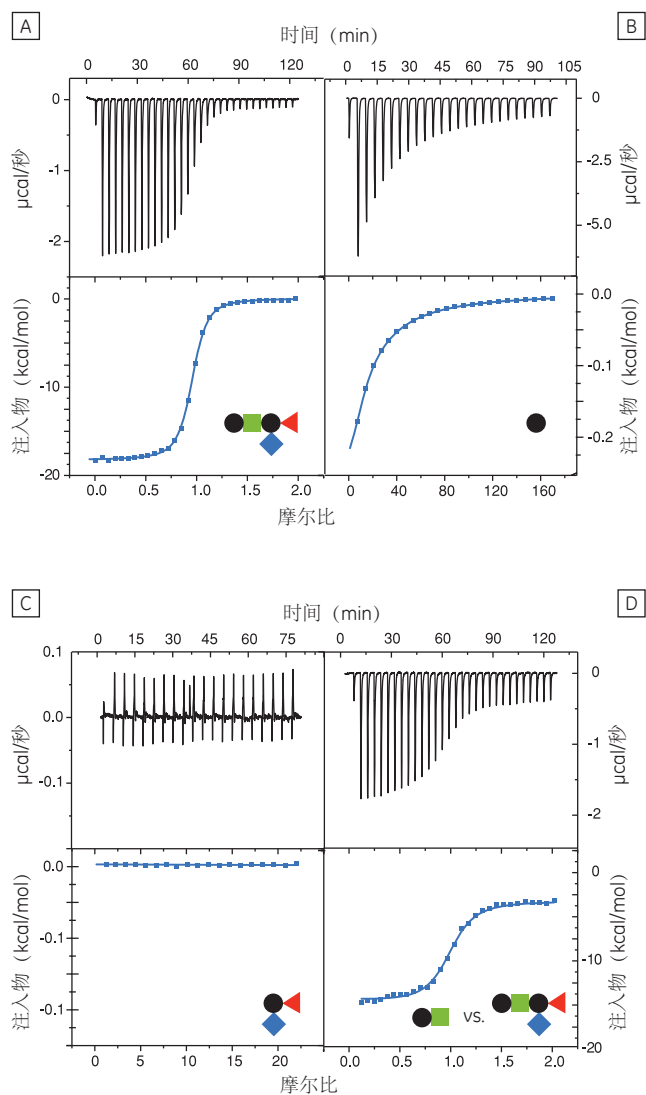


图9.CTB利用各种低聚糖的直接和置换滴定。(A) 10 μM CTB/110 μM GM1os; (B) 145 μM CTB/100 mM Gal β OME; (C) 265 μM CTB/30 mM Neu5 AcGalGlc; (D) 10 μM CTB/25 mM GalGalNAc/110 μM GM1os。

表1. 对于GM1os和配体片段的热力学参数总结。

Ligand	K_D	$\Delta G^\circ/\text{kcal mol}^{-1}$	$\Delta H^\circ/\text{kcal mol}^{-1}$	$T\Delta S^\circ/\text{kcal mol}^{-1}$	n
 GM1os	$43.3 \pm 1.4 \text{ nM}$	-10.04 ± 0.02	-17.45 ± 0.03	-7.45 ± 0.03	1.00
 GalβDMe	$14.8 \pm 1.6 \text{ mM}$	-2.50 ± 0.07	-9.02 ± 0.48	-6.53 ± 0.48	0.94
 GM2os	$2.0 \pm 0.2 \text{ mM}$	-3.67 ± 0.09	-4.35 ± 0.48	-0.69 ± 0.48	0.99
 GalGalNAc	$7.6 \pm 0.8 \text{ mM}$	-2.89 ± 0.08	-10.15 ± 0.43	-7.27 ± 0.45	1.06
 Neu5AcaOMe	$210 \pm 100 \text{ mM}$	-0.92 ± 0.28	-10.70 ± 8.60	-9.77 ± 8.34	1.06

表1中的结果显示对于GM1os的 ΔG° 比对于任何两种可以被加在一起以形成GM1os的互补片段配体的 ΔG° 总和高得多。该结果表明在二价GM1os配体重的有效整合作用。此外，通过比较对于GM1os和GalGalNAc二糖的 ΔG° 表明，唾液酸残基影响几乎一半的完整配体的自由焓变化，尽管它对受体有极其低的亲和力。关于这些结果的更完整的讨论以前已经由Turnbull等发表（17）。

结论

ITC是一种用于研究低亲和力相互作用的非常有用的技术。置换（竞争）滴定法非常适合研究存在高亲和力竞争性配体时的系统，而且低亲和力配体通过匹配它对受体的 K_D 对于至少一个浓度是可溶的。另外，可以在低 c 值下进行直接滴定，超出传统的实验窗口，只要小心设计实验以记录具有良好的信噪比水平的结合等温线的适当部分。在所有情况下， ΔH° 值的有效性是取决于配体和受体浓度的准确测量。

致谢

本文由利兹大学的化学学院的结构分子生物学中心的W. Bruce Turnbull博士所撰写。所描述的工作是与S. W. Homans教授和A. H. Daranas博士合作进行，并受到授予W. Bruce Turnbull的Wellcome Trust International Prize Travelling Research Fellowship的支持。

参考文献

1. Mannhold, R. et al., eds., Protein-ligand interactions: from molecular recognition to drug design Wiley-VCH, Weinheim (2003).
2. Balzani, V. et al. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 3348-3391 (2000).
3. Freire, E. *Drug Discovery Today: Technol.* 1 295-299 (2004).
4. Holdgate, G. et al. in *Biocalorimetry Vol 2* (Ladbury, J. E. and Doyle, M. L., eds.), John Wiley, Chichester, pp 59-79 (2004).
5. Ladbury, J. E. *Biotechniques* 37, 885-887 (2004).
6. Breslow, R. et al. *Pure Appl. Chem.* 72, 333-342 (2000).
7. Jencks, W. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4046-4050 (1981).
8. Erlanson, D. A. et al. *Med. Chem.* 47, 3463-3482 (2004).
9. Mitchell, T. and Cherry, M. *Innov. Pharm. Technol.* 34-36 (2005).
10. Huth, J. R. et al. *J. Methods Enzymol.* 394, 549-571 (2005).
11. Fernández, C. and Jahnke, W. *Drug Discovery Today: Technol.* 1, 277-283 (2004).
12. Wiseman, T. et al. *Anal. Biochem* 179, 131-137 (1989).
13. Indyk, L. and Fisher, H. F. *Methods Enzymology* 295, 350-364 (1998).
14. Zhang, Y. L. and Zhang, Z. Y. *Anal. Biochem.* 261, 139-148 (1998).
15. Sigurskjold, B. W. *Anal. Biochem.* 277, 260-266 (2000).
16. Christensen, T. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 7357-7366 (2003).
17. Turnbull, W. B. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 1047-1054 (2004).
18. Daranas, A. H. et al. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 11870-11876 (2004).
19. Turnbull, W. B. and Daranas, A. H. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14859-14866 (2003).
20. Dam, T. K. and Brewer, C. F. *Chem. Rev.* 102, 387-429 (2002).
21. Fukuta, S. et al. *Infect. Immun.* 56, 1748-1753 (1988).
22. Picking, W. L. et al. *Biochim. Biophys. Acta* 1247, 65-73 (1995).
23. MacKenzie, C. R. et al. *J. Biol. Chem.* 272, 5533-5538 (1997).
24. Cai, X.-E. and Yang, J. *Biochemistry* 42, 4028-4034 (2003).
25. Schön, A. and Freire, E. *Biochemistry* 1989, 28, 5019-5024 (1989).
26. Merritt, E. A. et al. *J. Prot. Sci.* 3, 166-175 (1994).

以ITC技术导航激酶抑制剂的抑制机理研究技术

Geoff Holdgate

引言

表征人源 激酶组的研究以及现有的激酶晶体结构在过去几年中的激增已经引起人们日益关注以激酶作为潜在药靶 用于许多治疗领域中的药物干预。

自20世纪80年代后期，制药行业开始对针对ATP位点的激酶感兴趣，大多数激酶抑制剂被开发出来。然而，Gleevec™药物的开发，它引起的结构重排导致Abl激酶采用失活的构象，这为制药行业重新注入了活力，并为处理激酶抑制产生创新的观点：包括在ATP位点之外的结合以及尝试阻止激酶激活。

为了根据新的观点表征化合物的作用机制，需要经常进行详细的酶动力学研究。而ITC技术不仅提供了一种化合物与目标蛋白结合的完整的热力学属性，还可以对化合物结合不同的酶形式的亲和力测量值进行比较，例如游离酶、酶-底物复合物、酶-产物复合物、激活或失活的酶等。

蛋白激酶作为治疗目标

在过去的几年中随着临床验证的激酶抑制剂的出现，蛋白激酶抑制剂的地位已经有些改变。因此，对于激酶信号通路的抑制在肿瘤和炎症领域中是用于疾病治疗的公认治疗方法。

目前有超过250种激酶可用于测试，因此抑制剂作用方式的快速表征是十分必要的。

ITC技术概述

ITC能测量多个结合相互作用的特性，包括一个实验中的亲和力（Kd）、配体结合位点数（n）和结合反应的焓（ ΔH ）。这种技术十分快速，而且无需荧光标记，并可以与无催化活性的蛋白质一起使用，这些蛋白质在酶动力学检测中妨碍研究。

ITC实验通常包括在恒温条件下针对目标蛋白滴定测试化合物，利用ITC仪器测量结合期间所释放或吸收的热量。

ITC可以在以蛋白激酶为重点的药物发现中以多种方式使用。这些包括蛋白质结构的表征和制备（不仅是对于模型配体的正确亲和力方面，而且对于正确的化学计量方面，也可以估计功能蛋白的量，无需催化活性）；

检测法评估；提供生物学活性的分子间复合物的鉴定（ITC能够提供关于另一种化合物的存在是否影响测试化合物活性的信息）。这正是本应用指南将关注的ITC的应用。

目标蛋白质量控制

尽管不是必要的，但在进行机制研究前进行目标蛋白的质量控制研究是有用的。这应该采用验证蛋白质的特性、纯度、浓度、功能和稳定性的形式。

微量热法可以被应用于这些重要领域中的两个方面。通过比较一种已知配体的滴定所获得的亲和力和化学计量关系与一系列目标蛋白的文献报道值，ITC已经被用于验证测试蛋白的功能。差示扫描量热法（DSC）是一种相关微量热技术，已经被用于验证蛋白质具有明显高于实验温度的熔融温度 T_m 。通常，孤立的激酶结构域只能部分稳定，具有的 T_m 值大约在40°C，（图1）。在着手进行详细的机制研究前应用诸如此类的技术表征目标蛋白从长远来看可以节省时间和成本，有助于避免由于较差的蛋白质质量所导致的假的或误导的结果。激酶结构域的低熔融温度可能表示较低稳定性，这对于对改进的纯化步骤、保存或检测条件是十分需要的。

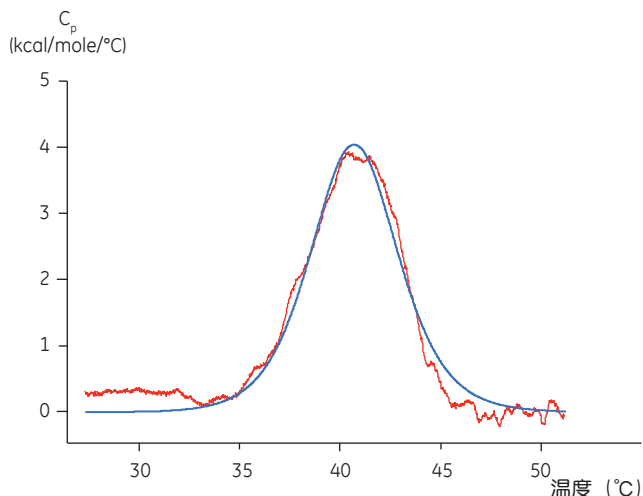


图1.在配体结合研究前利用DSC技术研究蛋白质稳定性。蓝线是对未折叠模型的最佳拟合的曲线。

对作用机制的理解

关于另一种配体的存在是否影响测试化合物的生物学活性的信息对药物发现是至关重要。第二个配体可能对测试化合物的活性没有影响，也可能直接或间接地与化合物的结合竞争，或可能为化合物发挥它的作用所需要。理解测试化合物的作用机制可能在不同于测定IC₅₀值的底物浓度下解释或预测细胞活性是有用的。它也能够提供关于3D结构相关性的深刻见解，对于不同的分子间复合物的结构可以被解析。关于机制的信息也可以被用于设计随后的检测法，它可以针对一种特定的分子间复合物。最近，激酶抑制剂优先结合或诱导激酶蛋白的无活性构象机制已经变得十分清楚。测试化合物对于每种蛋白形式的结合亲和力的比较对于决定是否继续进行化合物结合蛋白的活性或无活性形式的研究也是有价值的。这种类型的决定将影响随后所涉及激酶药物发现的过程。

机制的阐明

正如所有在治疗上重要的酶一样，激酶不仅仅只是化合物干预的单一分子目标。在催化循环中，激酶结合蛋白质底物、ATP、中间产物和产物，（图2）。这些不同形式的酶也可能以许多不同的构象存在。因此，不同形式的酶针对不同的化合物，而且许多不同的生化检测法可以偏向不同形式的酶。ATP的生理浓度大约为2 mM，意味着ATP通常能够非常有效地与化合物竞争结合ATP的位点。因此搜索在ATP之前或之后结合的化合物，即所谓的非竞争性化合物，或那些只在ATP之后结合的化合物，即所谓的非竞争性化合物，对于激酶药物的发现是有吸引力的方法。然而，许多著名的激酶抑制剂针对酶的ATP位点，且被期望与ATP竞争结合酶。其他化合物可能针对变构位点，预计不显示与ATP的这种竞争。表征化合

物作用的机制可以确定是否存在ATP，或的确是蛋白质底物，提高、降低或没有影响测试化合物的亲和力。这种性质的研究在分子水平理解SAR是十分宝贵的，且对于搜索新的药效结构至关重要。

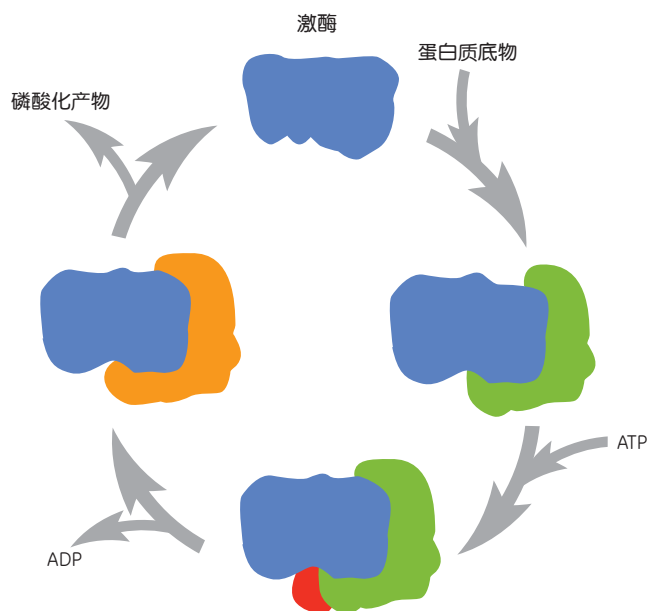


图2.假定的蛋白质激酶催化循环。在这个简化的示意图中，酶在催化循环中结合底物和产物，因此在磷酸基团转移反应中至少有四种酶形式。这些不同的酶形式的每一种都将是动态的，且可以进入不同的构象，说明每种激酶可能代表多种化合物干预目标。ITC至少可以测量化合物与这些孤立的酶形式中的一些形式的结合亲和力，有利于理解抑制剂结构-活性关系（SAR）。

酶动力学检测法通常不是为了反应途径上发生的特定的酶形式而配置，因此关于最大亲和力的有关酶形式的信息有时候很难直接获得。ITC通过测量对不同的预设酶形式的结合亲和力可以克服这个限制。结合游离酶是最简单的方法，但是根据催化机制可以安排ITC条件以探测其他酶形式，例如酶-蛋白底物、酶-ATP、酶-ADP或酶-磷酸化产物复合物。非可水解ATP类似物的使用在探测结合酶与两种底物的三元复合物的潜在化合物中也是有价值的。

对于一种蛋白激酶目标，进行表征ATP对测试化合物的结合的实验。对于一种测试化合物在存在和不存在100 μM ATP时使用MicroCal™ VP-ITC进行ITC滴定，对于ATP代表大约60 × Kd（图3）。

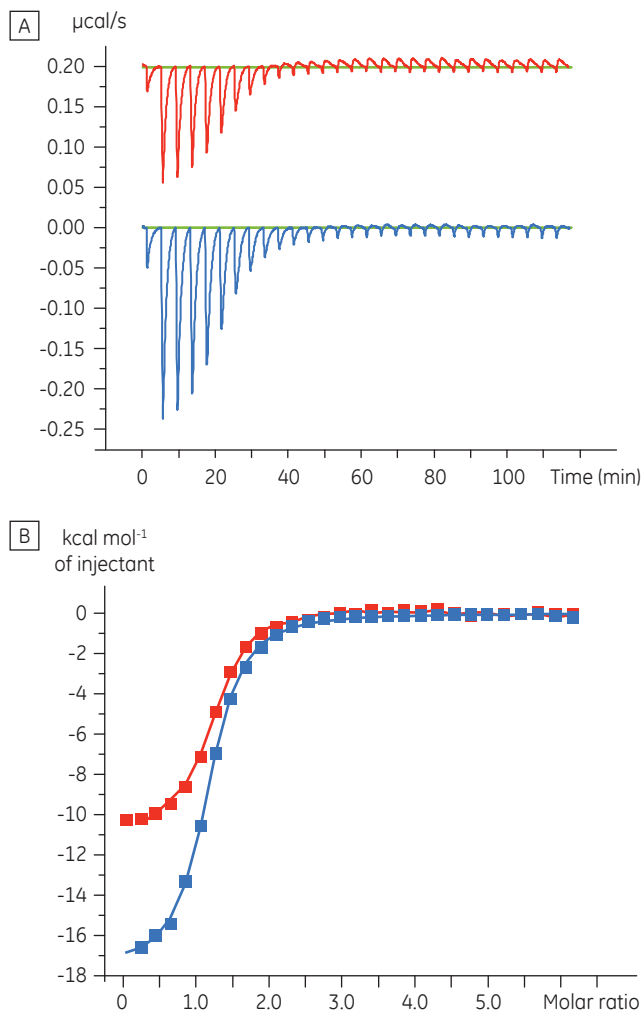


图3. 非竞争性抑制剂结合。在不存在（红线）和存在（蓝线）100 µM ATP时测试化合物对蛋白激酶的滴定。在不存在ATP时的参数值为 $K_d = 0.19 \mu\text{M}$, $\Delta H = -17.4 \text{ kcal/mol}$, $n = 0.9$, 在存在ATP时参数值为 $K_d = 0.17 \mu\text{M}$, $\Delta H = -9.4 \text{ kcal/mol}$, $n = 1.1$ 。

ITC结果清楚地显示，当检测池中包含蛋白和ATP时，化合物结合激酶的亲和力没有变化。焓值表明尽管对亲和力没有影响，但是对结合的焓有显著影响。因此这些结果表明，化合物在关于ATP结合方面是非竞争性的，而在存在ATP时结合模型可能有些变化。这不仅强调了ITC在表征化合物结合的详细机制中是有用的，而且突出了这种技术不仅在亲和力而且在结合焓测量中的双探测性质。

在一个类似实验中，观察到对于不同的化合物结合相同的蛋白激酶关于ATP的无竞争性动力学。在不存在ATP时 K_d 值大于50 µM（在标准ITC运行中是不可测量的），而在存在ATP时 K_d 值测量为0.7 µM（图4）。

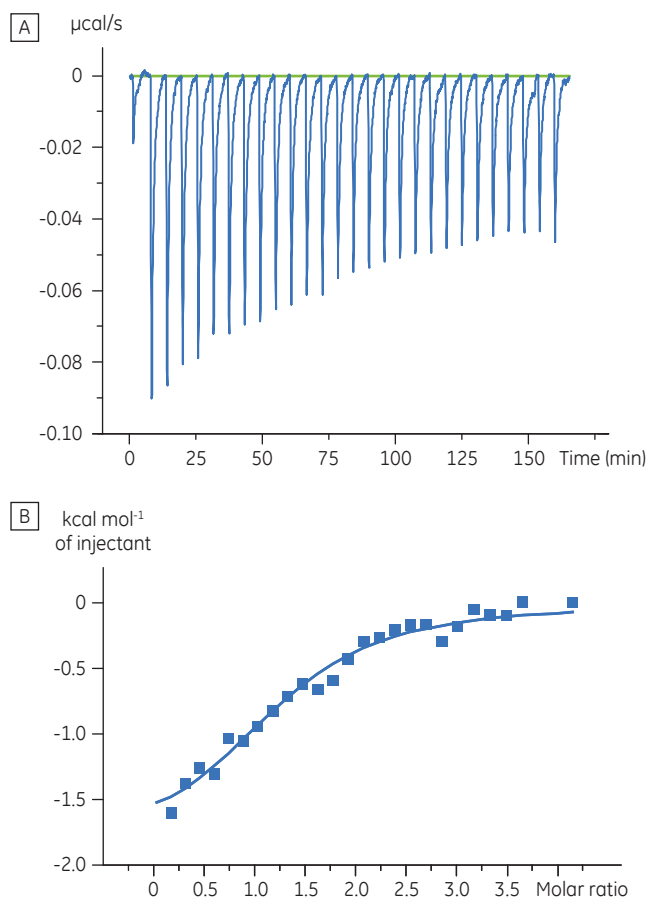


图4. 反向竞争性抑制剂结合滴定。测试化合物结合到蛋白激酶与ATP的复合物的滴定。参数值为 $K_d = 0.56 \mu\text{M}$, $\Delta H = -2.3 \text{ kcal/mol}$, $n = 1.4$ 。在不存在ATP时没有观察到结合。

能够直接监测与单个蛋白复合的结合的优点也显示在另一个实验中，其中怀疑化合物对一个信号通路中的两个连续激酶的复合物有高亲和力。ITC允许要研究的化合物单独结合上游激酶，也可以结合上游和下游激酶的复合物。对于化合物与复合物的结合，亲和力被证明有五倍的增加（图5）。

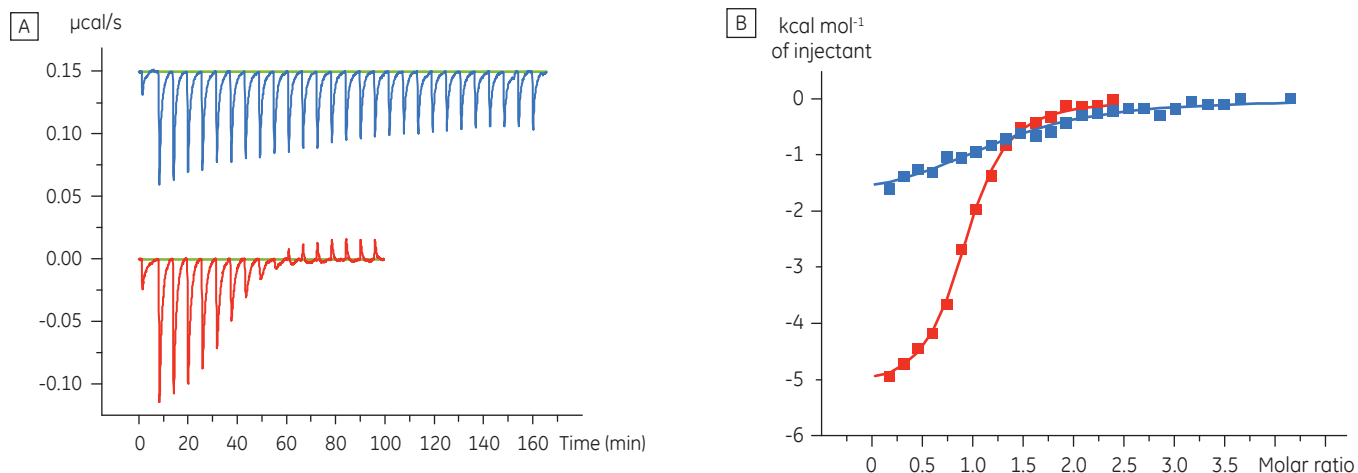


图5. 化合物结合上游激酶（红线）以及结合这个激酶与其下游底物激酶复合物（蓝线）的比较。对于与复合物的结合，证明亲和力有五倍的增加。

总结

量热法已经被证明在蛋白激酶抑制研究中具有十分宝贵的价值，促进目标蛋白质量控制检查以及有助于抑制剂结合机制的详细研究。更高通量和自动化的微量热仪器的出现为这些应用增加了价值，而向更少的试剂消耗方向的努力将确保量热法广泛应用在合理的药物设计过程中。

在IN Cell Analyzer 2200上利用高内涵分析研究药物对高尔基复合体的效果

关键词: IN Cell Analyzer 2000 高尔基体顺式反式高尔基体网络图像恢复去褶皱标准芯片CCD照相机荧光图像分析 IN Cell Investigator 高内涵分析细胞成像

对分泌途径至关重要，高尔基复合体积极地参与感应压力刺激的过程（1）。有报告称，当大于应激信号阈值时，高尔基体能够同时激活细胞修复和细胞凋亡的机制，使其成为适于癌症研究和未来治疗方式的潜在性药物目标（2）。微管能保持高尔基体的结构完整性（3），而微管干扰剂则广泛地用于肿瘤的化疗（4）。许多化合物和细胞处理在使高尔基体产生形态变化方面是很明显的。

于是，在各种条件下对高尔基体作表型分析能帮助找到新型的药物靶点，而且还能为解决功能性的问题提供宝贵的见解。对高尔基体结构作高内涵分析要求迅速、自动地从高分辨率图像中提取多参数的数据。最重要的是亚区室特性的鉴别和分割，尤其分析高尔基体时特别有难度，高尔基体的不同囊腔上的标记物靠紧并列。IN Cell Analyzer 2000的高内涵分析系统能够生成质量足够好的图像，适于高尔基体区室的鉴别以及高尔基体表型的特征化，而且适于更高通量的筛选应用（图1）。

在本应用说明中，区室标记物用来鉴别顺式高尔基体与反式高尔基体网络（TGN），并分析定位和通过测试化合物诱导的表面形状变化。根据需要运用图像复原方法（5），以使图像质量达到最佳化，并结合自动分析方案而提取可用于评估表型的各种荧光强度和形态学测量值。最后，从质量上评估以多孔板形式配置的试验，以便论证高通量筛选化合物的潜在效用，而这些化合物能够促进或拮抗高尔基体结构中的变化。

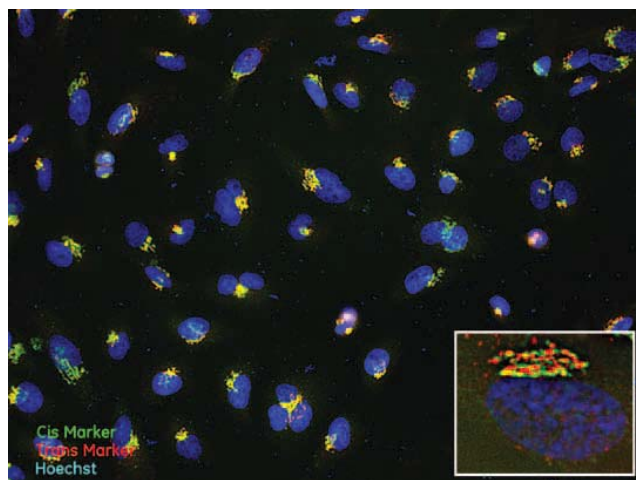


图1. 为在未经处理的海拉细胞中标记顺式高尔基体的GM130（绿色）和标记TGN的TGN 46（红色）显示标记物定位的伪彩图像。利用20x/0.45 NA物镜和二维去褶皱模式在IN Cell Analyzer 2000上采集的图像。利用20x/0.45 NA物镜和二维去卷积模式在IN Cell Analyzer 2000上采集的图像。插图：用100/0.9 NA物镜和一种三维去卷积模式采集的、经修剪之后的图像。

材料

采用的产品

带大芯片CCD照相机的IN Cell Analyzer 2000	28-9534-63
IN Cell Investigator软件, 单用户许可*	28-4089-71

*本应用的软件版本是1.5

仪器仅用于研究

其他所需材料	
海拉细胞	ATCC
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM培养基)	Sigma, D6546
胎牛血清	JHR Biosciences, 12103
L谷氨酰胺200 mM溶液	Sigma, G7513
青链霉素混合液, 100x	Invitrogen, 15070-063
诺考达唑	Sigma, M1404
布雷菲尔德菌素A (BFA)	Sigma, B7651
二甲基亚砜 (DMSO)	Sigma, D2650
甲醛溶液*	Sigma, HT50-1-2
磷酸盐缓冲溶液 (PBS)	Sigma, D8537
牛血清白蛋白 (BSA), 10%	Invitrogen, P2489
Triton™ X-100*	Sigma, T8787
TGN-38一级抗体, 家兔多克隆免疫	Santa Cruz, sc-33783
球蛋白G (200 µg/ml)	
鸡抗家兔德克萨斯红™	
二级抗体 (200 µg/0.5 ml)	Santa Cruz, sc-3925
GM130一级抗体, 山羊多克隆IgG (200 µg/ml)	Santa Cruz, sc-16268
驴抗山羊异硫氰酸荧光素二级抗体 (200 µg/0.5 ml)	Santa Cruz, sc-22024
Hoechst™33342核染料	Molecular Probes, H3569
µClear™培养板, 96孔, 黑色	Greiner Bio One, 655090

* Triton X-100和甲醛溶液被列为有害品。依照《化学品安全信息》和当地的实验室安全准则处理。

细胞生长培养基

以胎牛血清补充的DMEM (10% v/v)、L谷氨酰胺 (2 mM) 和青链霉素混合液 (1% v/v)。

方法

将海拉细胞接种入96孔µClear培养板, 然后在37°C下孵育一整夜。用测试化合物 (诺考达唑或BFA) 孵育4 h, 先将细胞用2%甲醛固定, 然后再用0.2%的Triton X-100透化。为进行免疫染色, 先给每个试孔添加一级抗体并在室温下孵育1 h, 然后添加二级抗体并在室温下再孵育

1 h。用家兔抗TGN-38一级抗体 (与人类同源基因TGN46交叉反应) 检测高尔基体反式网络结构 (TGN), 然后用德克萨斯红 (TR) 标记的家鸡抗家兔IgG检测。用山羊抗GM130一级抗体检测顺式高尔基体标记物GM130, 然后通过异硫氰酸荧光素标记的驴抗山羊IgG来检测。用Hoechst 33342核染料标记细胞核。

试验方案

1. 在1×10⁵细胞/ml的浓度下, 将100 µl/试孔的海拉细胞接种到96孔的µClear培养板, 然后在37°C下孵育一整夜。
2. 为作剂量反应测定, 在细胞生长培养基中制备0~ 450 µM的诺考达唑滴定和0~ 200 µg/ml的BFA滴定。
3. 为作Z'测定, 从96孔板的全部试孔中吸出培养基。向复制样品的试孔内添加100 µl的20 µM诺考达唑或100 µl的20 µg/ml的BFA, 并在37°C下孵育4 h。
4. 为作剂量反应测定, 从96孔板的全部孔中吸出培养基。添加100 µl的20 µM诺考达唑或BFA 滴定 (在步骤2制备), 并在37°C下孵育4 h。
5. 清除所有试孔的培养基, 然后添加100 µl的固定液 (2%的甲醛) 并在室温下孵育15~ 20分钟。
6. 清除固定液, 用200 µl的磷酸盐缓冲溶液冲洗试孔两次。
7. 添加100 µl的透化液 (磷酸盐缓冲溶液中0.2%的Triton X-100) 并在室温下孵育1 h。
8. 制备清洗液 (磷酸盐缓冲溶液中0.1%的牛血清白蛋白) 和封闭液 (磷酸盐缓冲溶液中1%的牛血清白蛋白)。
9. 清除透化液, 用200 µl的清洗液冲洗两次。
10. 添加100 µl的封闭液, 并在室温下孵育20分钟。
11. 清除封闭液, 用200 µl的清洗液冲洗。
12. 从4°C下的储存培养基中清除一级抗体。在12,000 g下轻柔地混合小瓶和微量离心管, 以清除任何聚合物。
13. 用清洗液按1: 24的比例稀释一级抗体, 以1: 1的比例化合, 然后向适宜的试孔添加100 µl的该化合混合物, 然后在室温下孵育1 h。
14. 抽出一级抗体的混合物, 然后用200 µl的清洗液冲洗三次。
15. 从4°C下的存储培养基清除二级抗体, 以12,000 g轻柔地混合小瓶和微量离心管2分钟。
16. 用清洗液按1: 37的比例稀释一级抗体, 以1: 1的比例化合, 然后向适宜的试孔添加100 µl的该化合混合物, 然后在室温下孵育1 h。
17. 抽出二级抗体的混合物, 然后用200 µl的清洗液冲洗三次。
18. 在磷酸盐缓冲溶液中以8 µM的浓度制备Hoechst 33342核染料。向每个试孔添加100 µl, 并在室温下孵育15分钟。
19. 抽出Hoechst 33342, 用200 µl的磷酸盐缓冲溶液冲洗两次。
20. 将试孔含有200 µl的磷酸盐缓冲溶液的培养板存放好, 并盖上黑色的培养板密封。

图像采集

所有图像都是通过IN Cell Analyzer 2000的高内涵分析平台采集的。为了检查高尔基体表型，我们选取了高倍放大的物镜（40x/0.6 NA至100/0.9 NA）。为了筛选配置，我们选择20x/0.45 NA的物镜以使细胞数最佳化，同时提供足够的分辨率便于特征提取。采用的滤光片组合为：350/50x和455/50m（Hoechst 33342核染剂）；490/20x和525/36m（高尔基体顺式标记物/异硫氰酸荧光素标记二级抗体）；579/34x和624/40m（高尔基体反式网络结构标记物/德克萨斯红标记二级抗体）。所有的滤光片组合均与QUAD 2多色反射镜组同时使用。使用标准芯片的CCD相机捕获图像。系统自带的去卷积模式对灵敏度、分辨率和对比度作了改进。为了作表型评估并达到最大的定量精度，我们选择了在轴向尺寸（Z）上采集连续剖面然后利用三维去卷积算法对所采集图像作后处理的成像模式（图2）。为作更高通量的分析，我们选择了二维去卷积模式，它只收集单个的Z剖面然后快速地将该二维图像去卷积，以最小的时间损失提高图像质量。

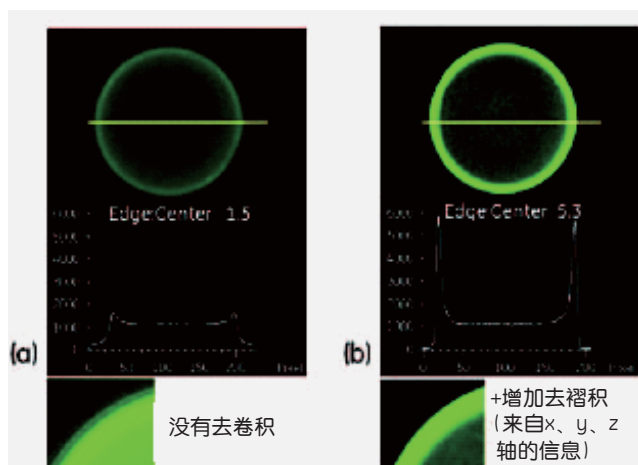


图2. 系统自带的去卷积性能提高了灵敏度、对比度和精度。图像：置于载玻片上的16.5 μm 直径钨珠用异硫氰酸荧光素（FITC，绿色）作荧光标记，然后借助于60x/0.95 NA物镜通过盖玻片成像，附带条件二者取其一：（a）应用三维采集和去卷积后处理，（b）不应用。相应的曲线图显示了沿一条水平中心线（黄色）穿过钨珠的荧光强度。所显示的“边缘：中心”比率得自两个边缘峰值的平均荧光强度除以两个峰值之间强度。插图已经从相应的钨珠整体图像作了修剪并放大到足以显示边缘的细节。

分析方案

利用IN Cell Investigator软件1.5版以及“开发人员工具箱”或“多目标分析（MTA）”模块，进行图像自动分析。“开发人员工具箱”内有一个用户定义的方案，专为测量总体平均值和逐一细胞的特征值而制订。为每一条信号通路都选择了主要测量值，它们就化合物对细胞数、细胞核形态以及各种高尔基体参数作了特征化描述（图6）。此外，对该算法还作了配置，以测量顺式高尔基体与高尔基体反式网络结构区室的重叠（定性的共定位）测量每个细胞共定位区域的总面积、每个细胞每一共定位区域的平均面积、红色信号共定位的百分率、绿色信号共定位的百分率、含有共定位信号细胞的百分率以及共定位信号的累积强度。

结果

用一个20x物镜的成像显示了顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物的典型的高尔基体定位，呈现出带状、非重叠结构的紧密并列（图1）。当利用高倍放大物镜使细胞以一种三维去卷积模式成像时，两个标记物定位到非重叠区室就更加明显（图1，插图）。高尔基体标记物表型可以利用面积和长度等空间测量值以及强度和对象统计数之类的测量密度加以特征化（6）。BFA之所以能抑制参与质膜转运的鸟嘌呤核苷酸交换因子，而且常常用于剖析高尔基体，是因为它对亚区室标记物的定位能产生差异作用。与文献报告（7，8）一致的是，BFA处理之后，假定的高尔基体结构蛋白质GM130定位到分散的带细孔的片段上，而高尔基体反式网络结构标记物则采取一种显著不同的定位方式，其信号分布范围很宽乃至遍及胞质，而且有时候集中在微管组织中心附近的核小泡内（图3）。

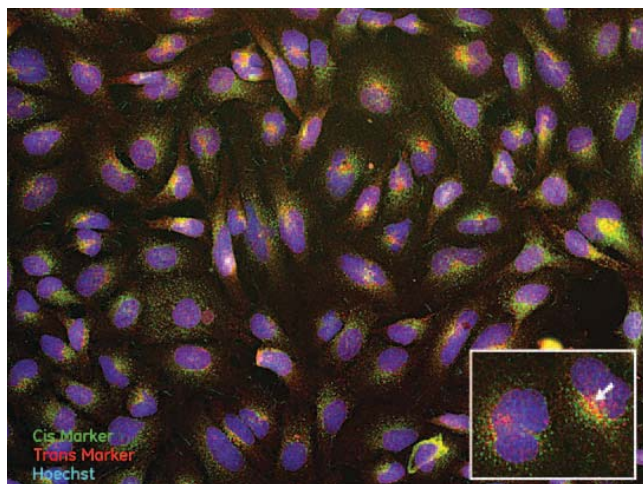


图3. 用20 µg/ml的BFA处理后标记物显示的海拉细胞内顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构的定位差异。融合细胞核（蓝色）、顺式高尔基体GM130（绿色）和高尔基体反式网络结构46（红色）的伪彩图像，将20x/0.45 NA物镜采集的图像用二维去卷积模式成像。修剪图像插图：用40x/0.6 NA物镜以二维去卷积成像模式采集；白色箭头表示高尔基体反式网络结构46的近核定位（红色）。

试验证明，干扰微管聚合作用的诺考达唑会将高尔基体的区室破碎成分散的、功能性的小堆栈，同时让亚区室定位到小堆栈各截然不同的区域（9）。图4和图5表明，IN Cell Analyzer 2000能够解决标记物显示的小堆栈内顺式、反式高尔基体网络结构在诺考达唑诱导后的差异性定位问题。

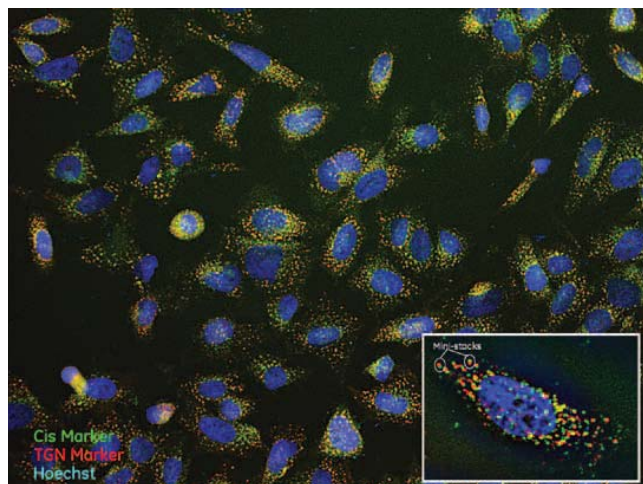


图4. 顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物定位到诺考达唑诱导的小堆栈各截然不同的区域。对海拉细胞用1.85 pM的诺考达唑处理，然后给其细胞核染蓝色，GM130染绿色，还有TGN46染红色。成像条件如图2所示。修剪图像插图：用100x/0.9 NA物镜以三维去卷积成像模式采集；小堆栈的样品加白圈显示。

从诺考达唑处理的细胞内观测到的顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物的碎裂方式类似显示，但共定位分析（图5）表明这些标记物重新分布到明显不同的位置上（顺式高尔基体与高尔基体反式网络结构的重叠<60%）。

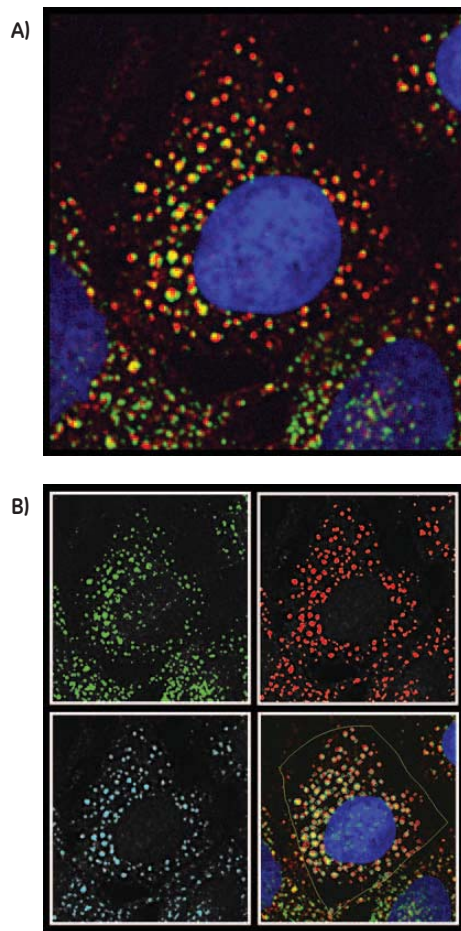


图5. 诺考达唑处理之后对顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物的共定位分析。（A）利用40/0.6 NA物镜以二维去卷积成像模式采集并修剪的图像经。对海拉细胞用1.85 pM的诺考达唑处理，然后给其细胞核染蓝色，GM130染绿色，还有TGN46染红色。（B）与共定位分析叠加结果相同的研究区，显示鉴别为顺式高尔基体（绿色重叠）高尔基体反式网络结构（红色重叠）、标记物重叠区域（青绿色重叠）和细胞体（黄色重叠）。

为完成诺考达唑和BFA的表型效应的特性化，我们考查了一批分析参数，有九个更突出的测量值如图6曲线所示。各结果显示，细胞数与核区随BFA浓度的递增而减少。这与关于BFA诱导的ER高尔基体囊泡转运的干扰可以导致细胞凋亡（2）的报告一致，反过来又与细胞坏死引起的核DNA浓缩的现象相关。在诺考达唑处理的细胞内没有观测到这些效应；即使有的话，这些参数也是趋向于相反方向。从剂量反应试验（图）得到关于顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物的囊泡计数曲线图显示了这两种药物的差异化效应，与图3和图所示的图像结果一致。

在诺考达唑处理的细胞内，顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物的囊泡数均见增加（图6A）。相反，当细胞用BFA处理时，顺式高尔基体标记物的泡囊数随着剂量的增加而上升，而高尔基体反式网络结构标记物的囊泡数却相对静止不变（图6B）。

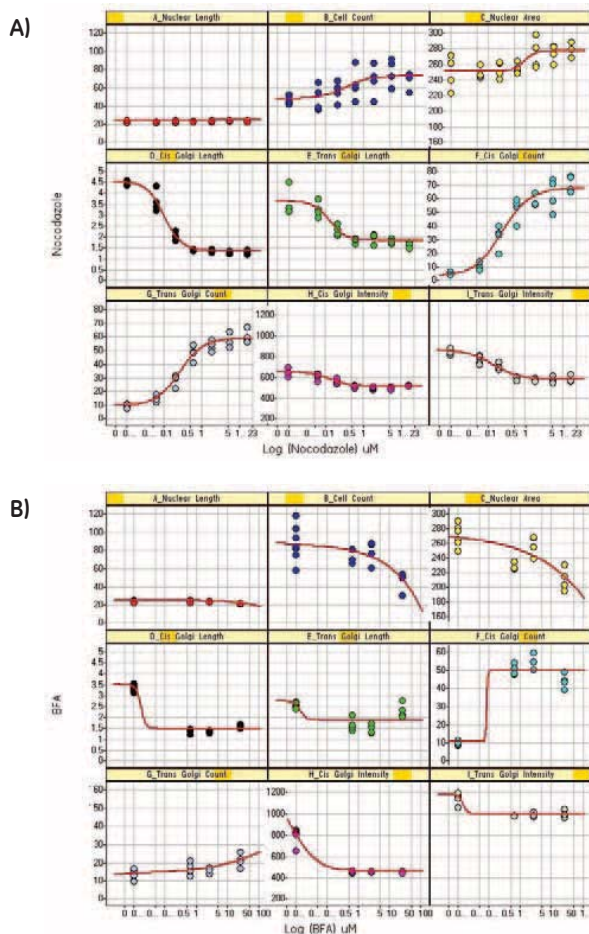


图6. (A) 诺考达唑和 (B) BFA对九个细胞参数的影响作用。曲线图是利用Spotfire™DecisionSite软件创建的，该工具实为IN Cell Investigator软件包的一部分。

有一项筛选试验是利用诺考达唑处理作为阳性对照和非处理作为阴性对照来设计的。通过用每种处理条件32个重复孔的96孔实验计算 Z' (10) 的结果，对试验质量作了评估 (图7)。有了对已处理和未处理的细胞群体的顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物绘制的囊泡计数曲线图，就为GM130 (顺式) 和TGN46 (反式) 的重新分布提供了可再现数据，其中 Z' 值大于0.5，表明该试验的稳健度足以应对筛选 (比如一次诺考达唑的拮抗筛选[11])。

诺考达唑诱导的顺式高尔基体和高尔基体反式网络结构标记物类似的重新分布模式结果，可以用来配置一项筛选试验，以对两个区室具有单模态和双模态作用的化合物进行区分 (图8)。TGN46囊泡数与GM130囊泡数的比率可以用作差异化分布的一个指标。在本例中，我们将此比率测量值称为“定位指数”，按 $(\text{TGN数} + \text{顺式高尔基体数}) / (\text{TGN数} / \text{顺式高尔基体数})$ 来计算。诺考达唑给出的平均定位指数是127，而对两种标记物具有差异化 (双模态) 影响的测试化合物BFA所给出的平均定位指数则是46。

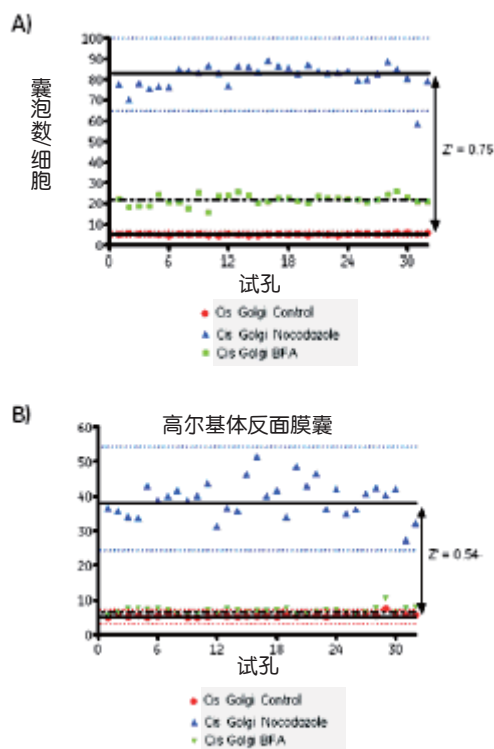


图7. 利用 Z' 测量值评估筛选试验的质量。每细胞平均囊泡数在绘制曲线时对照着未处理的阴性对照 (红色)、诺考达唑处理的阳性对照 (蓝色) 和作为测试化合物的BFA (绿色) 的试孔号。各个点表示每个重复孔的平均值，它们来源于每个试孔四个视野的分析结果。蓝色和红色虚线表示偏离平均值 ± 3 的标准差。实线表示阳性和阴性对照组的平均值 ($n = 32$ 个重复样品)。黑色虚线表示BFA处理的平均值 ($n = 32$ 个复制样品)。

(A) 分析GM130 (顺式高尔基体标记物) 分布所获结果。

(B) 分析TGN46 (高尔基体反式网络结构标记物) 分布所获结果。

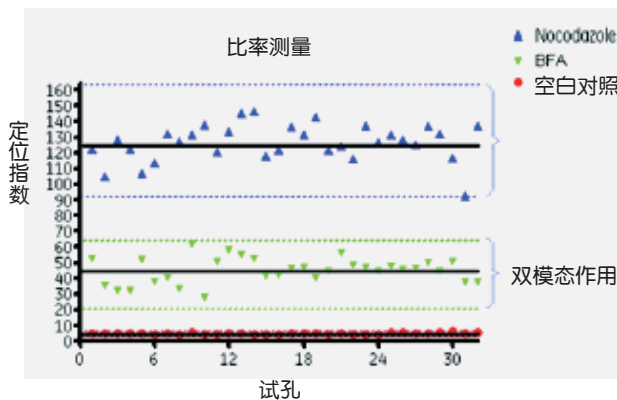


图8. 对高尔基体反式网络结构和顺式高尔基体的区室作药物处理的比率测量。如本文所述，定位指数是通过求出TGN泡囊数与顺式高尔基体标记物的比率而得到的。每个数据点都来自单个试孔获得的四个视野。黑色实线表示得自32个样品重复孔的平均值。虚线表示偏离各自平均值 ± 3 的标准差。蓝色三角形：诺考达唑阳性对照孔 (平均值=127，标准试验剂量=12)；红色圆形：未处理的阴性对照孔 (平均值=5.0，标准试验剂量=0.47)；绿色三角形：经BFA处理的试孔 (平均值=45，标准试验剂量=8.2)。

结果

高尔基体状态的形态学指示的量化要求使用高内涵分析方可实现。我们在此特别说明，类似IN Cell Analyzer 2000的高内涵分析系统能够生成质量足够高的图像以鉴别紧密并列的顺式高尔基体和TGN的不同区室。对大多数精确的定量分析而言，像三维去卷积这样的图像复原方法可以非常有效地提高解析能力，以分辨细微的结构并鉴别高尔基体的亚区室。对高尔基体标记物的高通量成像和分析允许评估药效的多参数特征化。对区室标记物作单独的或组合式的分析均可采用，二者能就顺式高尔基体和TGN的区室表型所受差异作用来筛分化合物。如此，便可在这方面提供有用的信息：鉴别主要作用于微管网络的因子和具有更多区室特效的因子。

2013年之后的新一代型号IN Cell Analyzer 2200，同样满足此种分析要求。

参考文献

1. Hicks, S. W. and Machamer, C. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*. **1744**(3), 406–14 (2005).
2. Wlodkowic, D. *et al*; ER-Golgi network – A future target for anti-cancer therapy. *Leukemia Research* **33**, 1440–1447 (2009).
3. Cole, N.B. and Lippincott-Schwartz, J. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 55–64 (1995).
4. Hong Zhang *et al*. Nocodazole-induced p53-dependent c-Jun N-terminal Kinase Activation Reduces Apoptosis in Human Colon Carcinoma HCT116 Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 43648–43658 (2002).
5. Wallace, W. *et al*. A Working person's Guide to Deconvolution in Light Microscopy. *BioTechniques* **31**, 1076–1097 (2001).
6. Liebel, U. *et al*. A Microscope-based screening platform for large-scale functional protein analysis in intact cells. *FEBS letters* 394–398 (2003).
7. Seeman, J. *et al*. Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* **407**, 1022–1025 (2000).
8. Holloway, Z. G. *et al*. Activation of ADP-ribosylation factor regulates biogenesis of the ATP7A-containing *trans*-Golgi network compartment and its Cu-induced trafficking. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **293**, C1753–C1767 (2007).
9. Cole, N. B. *et al*. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell* **7**, 631–650 (1996).
10. Zhang, D. H. A pair of new statistical parameters for quality control in RNA interference high-throughput screening assays. *Genomics* **89**(4), 552–561 (2007).
11. Drecktrah, D. *et al*. Phospholipase A2 Antagonists Inhibit Nocodazole-induced Golgi Ministack Formation: Evidence of an ER Intermediate and Constitutive Cycling. *Mol. Biol. Cell* **10**, 4021–4032 (1999).

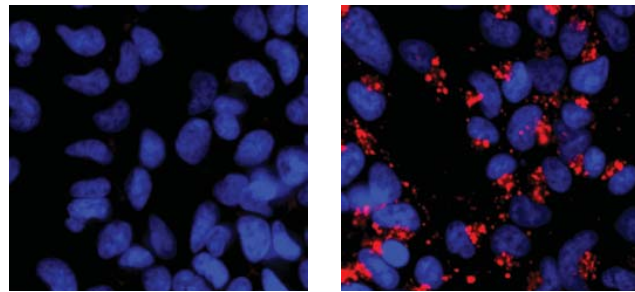
采用IN Cell Analyzer 2200成像和量化基于细胞的GPCR激活测定

关键词：IN Cell Analyzer 2000 · GPCR · 受体内化 · CypHer™5E · 荧光图像分析 · IN Cell Investigator · 高内涵分析 · 细胞成像

G蛋白偶联受体(GPCR)具有广泛的生理功能，涉及许多生物学和病理学过程。它们在关键的信号通路、多样化组织表达和细胞膜定位的特点使其成为治疗剂的理想目标。因此，GPCR代表新药开发的重大机会，目前已成为大约30%处方药的主要研究靶点(1)。使用激动剂活化这些受体的总会导致受体从质膜内化至细胞内的内体通路。通过高通量自动细胞成像和分析，能够揭示和量化该过程。

对于研究受体内化，目前存在一系列方法。这些方法主要衡量位于质膜的荧光信号与位于受体内化部位的荧光信号之间的表型差异，表现为细胞质内明亮的点状泡囊。通过若干方法可以将荧光引入研究系统，包括标记受体、配体或与受体有关的蛋白质。一种监控受体内化的新方法，使用对pH敏感、红色激发的荧光染料CypHer™5E，其在碱性pH下发出最弱荧光，在酸性pH下发出最强荧光。使用pH敏感感受器，成为一种信号增强的测定法，在未经处理的细胞中，位于细胞表面的受体发出最弱信号，而经过激动剂处理的细胞在内体区隔中发出强光，原因为诱导的受体内化。在更高通量筛选中，信号增强测定优于转位测定，后者更难分析，因为荧光信号从一个区隔移至另一区隔，而细胞总荧光强度未发生重大变化。

本测定使用结合CypHer5E的抗VSV-G抗体，检测在HEK 293细胞中稳定表达的标有VSV-G表位的β2-肾上腺素能受体。在激动剂受激后，CypHer5E抗体-受体复合体内化进入再循环内体区隔的酸性囊泡，此处可看到荧光信号(图1)。该应用以前在固定细胞、活细胞中以及筛选形式在IN Cell Analyzer上实施(2, 3)。在这里，我们提供数据，证明可以通过IN Cell Analyzer 2000监控受体内化，产生相关的生物学数据。来自比较基准试验的分析结果证明，本测定稳定，动态范围广。



(a) 使用异丙肾上腺素激发前

(b) 使用异丙肾上腺素激发后

图1通过IN Cell Analyzer 2000采集的图像，显示使用异丙肾上腺素激动剂受激之前(a)和之后(b)在HEK293细胞中表达的VSV-G β-2肾上腺素能受体。在细胞核(蓝色)和CypHer5E(红色)通道中采集的图像已经合并(对于经过处理和未经处理的图像采用一致的灰度设置)。使用Hoechst 33342对细胞核进行染色。使用激动剂进行激发后(b)，当内化至再循环内体区隔的酸性环境时，结合CypHer5E的抗VSV-G抗体发出红色荧光。

材料

使用的产品

IN Cell Analyzer 2000, 标准芯片CCD照相机	28-9534-63
IN Cell Investigator软件, 单一用户许可	28-4089-71
结合CypHer5E的抗VSV-G抗体, 250 µg	PA 45407
HEK293细胞系表达	
标有VSV-G表位的β2-肾上腺素能受体	(内部)

所需的其它材料

Minimum Essential Medium Eagle	Sigma, M2279
的培养基	
胎牛血清(FBS)	JRH Biosciences, 12103
L-谷氨酰胺(200mMol)	Sigma, G7513
MEM非必需氨基酸x 100	Sigma, M7145
Geneticin G418 (0.5 mg/ml)	Sigma, G7034
青霉素-链霉素, 100 x	Sigma, P4333
Trypsin-EDTA in HBSS	
w/o钙或镁	PAA, L11-004
异丙肾上腺素(激动剂)	Sigma I12760
Hoechst™ 33342	Invitrogen, H21492
µClear™板, 96孔, 黑色	Greiner Bio One, 655090
多聚赖氨酸, 5 mg	Sigma, P6407
甲醛溶液, 中性缓冲, 10%*	Sigma, HT5012
PBS	Sigma, D8537

* 甲醛溶液属于有害物质。根据MSDS和本地实验室安全指导方针处理。

细胞生长培养基

Minimum Essential Medium Eagle的培养基加上FBS(10%), L-谷氨酰胺, 以及非必需氨基酸。通过geneticin维持选择。

试验培养基

Minimum Essential Medium Eagle的培养基加上L-谷氨酰胺以及非必需氨基酸。

方法

为了诱导受体内化, 通过稳定表达标有VSV-G表位的β2-肾上腺素能受体的细胞系孵育结合CypHer5E的抗VSV-G抗体。通过激动剂异丙肾上腺素进行激发后, CypHer5E抗体结合物内化, 受体进入酸性内体泡囊, 可看到荧光信号。通过浸透细胞的DNA结合染色剂Hoechst 33342标记细胞核。

试验方案

1. 使用多聚赖氨酸预涂96孔微板; 在50 ml无菌PBS中配制多聚赖氨酸, 每孔加入80 µl, 在室温下孵育45分钟。抽出涂覆溶液, 以200 µl PBS清洗四次。

2. 在细胞生长培养基中培养HEK293 VSV细胞, 以75%至80%汇合传代。对于来自烧瓶的细胞进行胰蛋白酶化, 以新鲜的细胞生长培养基进行稀释, 从而获得 1.6×10^5 细胞/ml的细胞计数。
3. 将HEK293 VSV细胞放入涂有多聚赖氨酸的2 x 96孔微板中, 每孔有16 000个细胞(100 µl), 在标准组织培养条件下孵育48小时。
4. 制备结合CypHer5E的抗VSV-G抗体(2.5 µg/ml); 将500 µl无菌水加入250 µg冻干的抗小鼠VSV-G抗体中, 以10 000 rpm旋转3-5分钟。将上清液移至另一干净试管。对于200 µl抗体溶液, 加入40 ml测定培养基。
5. 在测定培养基中以3x浓度配制异丙肾上腺素激动剂的稀释液(最终浓度为1 µM)。据此配制双倍稀释系列, 获得从0至3 µM的12种剂量(最终为0至1 µM)。
6. 从所有微孔中取出培养基, 替换为含有2.5 µg/ml结合CypHer5E的抗VSV-G抗体*的100 µl测定培养基。在室温下孵育15分钟。
7. 对于±微板, 将50 µl 3 µM的异丙肾上腺素激动剂稀释液加至所选微孔, 在37°C下孵育30分钟。
8. 对于剂量反应板, 加入50 µl每种浓度的异丙肾上腺素激动剂, 在37°C下孵育30分钟。
9. 倒出测定培养基, 使用200 µl PBS清洗每个微孔中的细胞。
10. 在PBS中加入100µl 5%的甲醛溶液, 在室温下放置30分钟。
11. 使出固定剂, 使用200 µl PBS清洗每个微孔中的细胞。
12. 使用Hoechst 33342细胞核染色剂对细胞进行染色。

* 在成像前测定的所有阶段, 需要使CypHer5E抗体避光。

通过IN Cell Analyzer 2000成像

为了获得良好的统计结果, 对本实验, 我们推荐20倍物镜。该物镜能够以足够的分辨率捕捉来自数百细胞的数据, 从而对核内体进行检测。调整曝光也很重要, 旨在最小程度地检测细胞膜染色, 最大程度地检测囊泡结构。

1. 开灯。
2. 将自动双色片变换器调至**QUAD1**位置。
3. 输入**试验开发模式**, 创建新的**方案设计**。通过向导, 完成成像方案的生成。
4. 输入成像实验说明。
5. 在下拉菜单中选择Nikon™ 20x/0.45 NA物镜。
6. 在下拉菜单中选择µClear板。
7. 在**显微术**中选择波长数和像素组合选项。

8. 为所研究的荧光团选择激发和发射滤片组。对于本应用，选择滤片组：DAPI_DAPI(350/50x和455/50m)以及Cy5_Cy5(645_30x和705_72m)。
9. 进入**板/载片查看**，选择微孔用于采集。
10. 在所选微孔内点击，启动成像器。
11. 回到向导，在**聚焦**中选择聚焦策略**硬件自动聚焦**或**软件自动聚焦**。
12. 优化曝光设置和每种波长的聚焦位置。
13. 进入**采集模式**，对样本培养板成像。

分析方案

多目标分析模块用于检测和分析由于激动剂介导的受体内化而形成的包涵体(微粒)。分析方案使用细胞核染色剂识别各细胞，然后根据CypHer5E信号量化每个细胞的微粒。除了记录细胞群体平均微粒测量外，该模块还采集和报告对于图像中每个细胞的测量。细胞平均测量，例如每个细胞的微粒计数或每个细胞的总微粒面积，对于量化位于内体的CypHer5E是特别有用的标准。

结果

加入激动剂诱导红色荧光微粒出现在细胞核附近(图2)。CypHer5E定位于细胞核周符合受体-抗体复合体内化至再循环内体区隔。良好的测定结果需要优质图像，从而在分析期间实现精确的特征检测(分割)。通过IN Cell Analyzer 2000采集的图像亮度均匀，具有锐聚焦下的亚细胞特征，并且背景信号很弱(图2)。

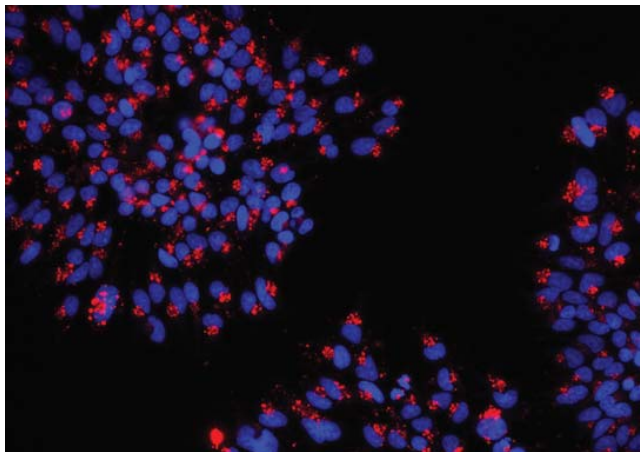


图2. 通过IN Cell Analyzer 2000采集的图像，显示使用异丙肾上腺素激动剂激发后在HEK293细胞中表达的VSV-G β2肾上腺素能受体；通过20x0.45NA物镜获得的细胞核(蓝色)和CypHer5E (红色)融合色图像。显示使用标准照相机获得的整个视野。

通过多目标分析模块使用IN Cell Investigator软件分析图像组。图像质量使得能够有效分割细胞核以及再循环内体区隔(图3)。

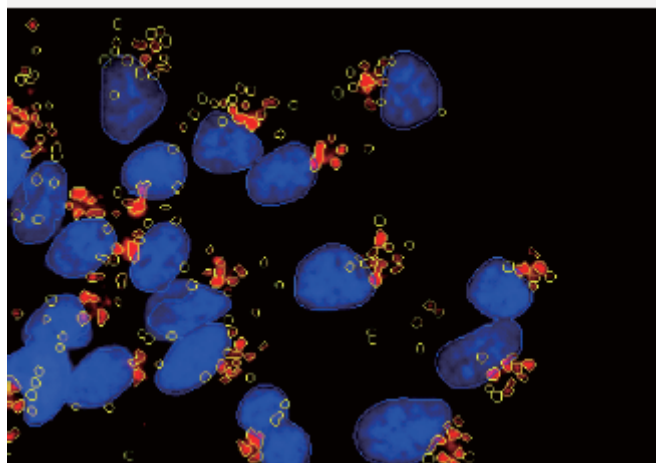
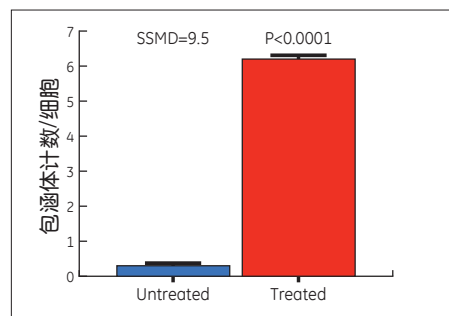
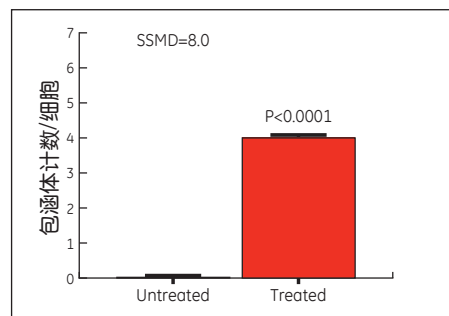


图3. 使用IN Cell Investigator工作站内的多目标分析模块外进行分析后在相应融合图像上的分割轮廓；细胞核(蓝色轮廓)；标有CypHer5E的内化抗体(黄色轮廓)。

根据分析程序，报告每个细胞的平均微粒计数。以激动剂处理和未处理的细胞数据显示清晰的依赖激动剂的内化反应(图4)。测定产生9.5的SSMD(信号窗口)，表明测定良好，适用于高内涵筛选(4)。



(a)



(b)

图4. HEK293细胞，表达以标有CypHer5E的抗VSV-G-mAb±异丙肾上腺素孵育的标有VSV-G的β2-肾上腺素能受体；数据来自(a)IN Cell Analyzer 2000和(b)IN Cell Analyzer 1000，显示每个细胞的平均微粒计数，在未处理和已处理的细胞群中测量。错误柱形条显示标准差，n=44，每个处理重复的分析图像数。

使用合成儿茶酚胺异丙肾上腺素进行剂量反应滴定，产生S形特征曲线，具有EC50值，类似于以前报告的数值(5)(图5)。

如图4和图5所示，与IN Cell Analyzer 1000相比，通过IN Cell Analyzer 2000进行的测定一直提供更广泛的动态范围。动态范围的改善和更高的SSMD数值表明方案更优。

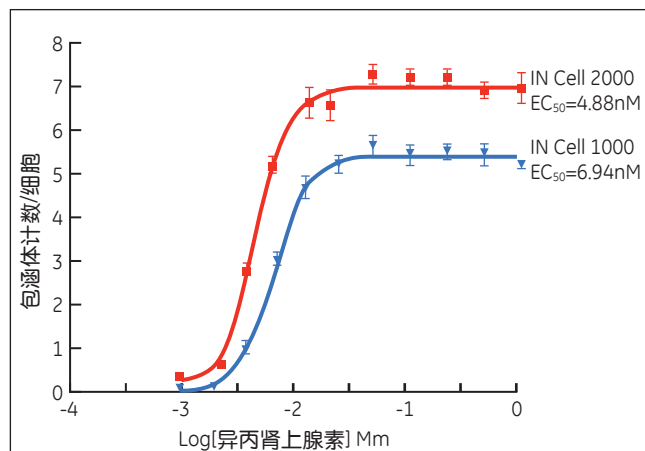


图5. 来自HEK293细胞的剂量反应曲线，这些细胞表达VSV-G β -2肾上腺素能受体，通过浓度不断增加的受体内化激动剂异丙肾上腺素进行激活。数据点代表每个细胞的平均微粒计数， $n=8$ 个重复微孔(每个微孔三个视野)。错误条显示IN Cell Analyzer 2000和IN Cell Analyzer 1000的 $n=8$ 个重复微孔的标准误差。

结论

高内涵GPCR测定是功能研究和药物发现的重要工具。在本文中，我们提供使用IN Cell Analyzer 2000进行受体内化高内涵分析的方案。使用CypHer5E pH敏感染料提供信号增强测定，容易检测内体荧光的增强。这种高内涵成像系统在特征分辨率方面提供优质图像，促进细胞内精细微粒结构的分割，实现更优测定效果。通过IN Cell Analyzer 2000和附带的IN Cell Investigator分析软件已经实现对于受体内化的自动高通量亚细胞描述，并且使用荧光示踪剂可以实现方便可靠的测定，用于GPCR筛选。

2013年之后的新一代型号IN Cell Analyzer 2200，同样满足此种分析要求。

采用心肌细胞进行多重标记活细胞毒性试验的高内涵分析

在药物开发的过程中，心脏毒副作用的后期检测会大幅度地增加方案的费用，还会明显地延迟上市时间。如果在投产之前无法检测心脏毒性，就会构成严重危及患者健康的风险。随着大量的药品因意料不到的对心血管的有害影响而代价昂贵地退出市场，对体外心脏毒性检验更为适当和随时可用的细胞模型的需求越来越大。为了满足这一需求，GE医疗集团现已提供分化自人胚胎干细胞的心肌细胞。为了探究GE医疗集团所产的心肌细胞在基于图像的毒性筛选试验中的实用性，我们用一组测试化合物对这些细胞做了系列试验，包括那些带有已知或疑似心脏中毒倾向的化合物。通过对试验结果的高内涵分析（HCA），我们得以鉴别心毒性化合物并根据它们的表型概况加以相互区别。

引言

GE医疗集团所产的心肌细胞属于一种生物性相关的、工业规模来源的生理性相关的细胞，适用于药物开发和毒性检测程序。由核型正常的人胚胎干细胞分化而来，心肌细胞已经通过电生理学、流式细胞术和亚细胞成像测定了特征。从冷藏保存状态恢复之时，心肌细胞形成有收缩性的表达心脏相关转录因子的单层细胞、结构蛋白（图1）和功能性离子通道。

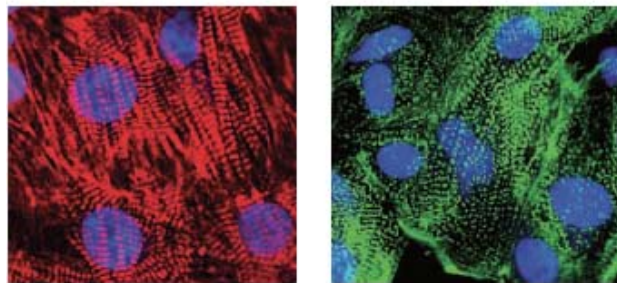


图1. GE医疗集团所产心肌细胞表达诸如肌钙蛋白I（左）和 α -放线素（右）等心脏标记物。通过免疫细胞化学方法检测结构蛋白；细胞核用Hoechst™33342（蓝）作对比染色。

心脏毒素会以各式各样的方式影响细胞行为和表型，包括干扰线粒体的呼吸、损害质膜的完整性以及触发细胞凋亡通路。通过同时逐个细胞地监测多种毒性指标，高内涵分析能提供一种灵敏而稳健的捕获细胞表型微小变化的方法，这些变化可能表现出毒性，但采用电生理学的试验或者更为常规的体外试验不容易检测出来。

在本实例中，采用一个多重标记试验就测试化合物对GE医疗集团的心肌细胞造成的影响做了检验，该多重标记试验混合使用了四种荧光探针。这些探针能同时测量与质膜完整性、钙动员、核表型和线粒体状态有关的细胞参数。活细胞自动成像与分析产生了大量的细胞测量结果，可用于监测多方面的细胞行为与功能。通过快速收集复制的细胞样本和对照组的详细信息，生成了测试化合物的表型概况，从而论证了利用GE医疗集团的心肌细胞所做的高内涵分析能够提供有关检测与鉴别有心毒性倾向的化合物的大量信息。

方法

试验

心肌细胞以每个试孔40,000个细胞的单位接种到涂覆Matrigel™ (BD公司产) 的96孔经组织培养处理的μClear™ 培养板 (Greiner Bio-One) 上, 此前采用了GE医疗集团“心肌细胞用户指南 (28-9805-86 AA)”中所述的培养板涂层和细胞制备的方法。接种之后, 将复制的培养板置于37°C下孵育48h。然后更换试验培养基 (用B27 [2% v/v] 补充RPMI 1640), 将接种后的孵育继续进行到6天, 其间按GE医疗集团“心肌细胞用户指南”所述方法隔天更换一次试验培养基。心肌细胞在37°C下孵育24~72 h, 测试化合物则按0~300 μM的最后浓度在试验培养基中制备。在试验培养基中制备一种探针溶液, 以便提供1 μM的Hoechst 33342 (分子探针)、20 nM的四甲基苾丹明 (TMRM) (Invitrogen)、1 μM的Fluo-4 AM (Invitrogen) 和1 μM的TOTO-3碘 (Invitrogen) 的终浓度 (该试验孔内) 分别在24 h、48 h和72 h的时点上, 通过明场显微镜评估了细胞的毒性形态学征象。当针对某一特别设定的化合物以更高的剂量点观察到毒性证据时, 增加混合探针, 在成像之前再做一小时的细胞孵育。

图像采集

图像分析与数据显示细胞的实时图像采集, 该系统配置了大芯片的CCD摄像头和一个40x/0.6 NA的物镜。QUAD 2多色反射镜组与下列激发 (x) 和发射 (m) 的滤光片组合一起使用: 适于Hoechst 33342的350/50x、455/50 m; 适于Fluo-4 AM的490/20x、525/20m; 适于TMRM的579/34x、624/40m; 以及适于TOTO-3的645/30x、705/72m。对于每一种治疗条件, 使三个复制试孔其中每个的四个视野都得以显示图像。

图像分析与数据显示

图像自动分析在IN Cell Investigator软件上进行, 采用了“开发人员工具箱”或“多目标分析 (MTA)”模块。编写了分析方案来报告总体平均和个体的细胞测量值。采用GraphPad Prism™4 (GraphPad软件) 对数据进行了分析和显示处理, 以便画出剂量反应曲线。对于主要成分分析 (PCA)、阶层式数据分组、轮廓图和多维散点图, 我们使用了Spotfire™DecisionSite™工具 (Tibco软件公司) 通过集成到IN Cell Investigator软件接口访问该工具。这样的工具能够解释对细胞计数、细胞核表面形状和各种线粒体参数的化合物作用加以特征化的主要手段。

试验结果和讨论

在本试验中, 我们采用高内涵分析的目的是检查六种化合物有何影响, 据报告称它们会影响到心肌功能、线粒体状态或存活率。根据已公布的文献资料, 可以预计某些化合物具有急性细胞毒作用, 而其他化合物则与更为长期的暴露接触相关的心脏病理有关。有一种化疗剂叫阿霉素, 据知会诱导急性的心脏毒性, 而且已由美国食品药品监督管理局签发了关于心血管毒性的黑框警告。有证据表明, 阿霉素急性的心脏毒性包括通过一条Bax介导通路 (3) 导致的心肌细胞程序死亡 (2)。这个过程还涉及一个p38 MAP依赖活化酶的氧化应激机制 (4)。如图2A中的剂量反应曲线图所示, 阿霉素的毒性可随时通过我们的试验做检测, 该试验据报在质膜完整性上减少了剂量依赖性, 同时伴有核区、线粒体外形 (1/形状因子) 和胞内钙质浓度的剂量依赖性的变化。该群体 (半数中毒浓度TD₅₀) 的诱导半数最大质膜完整性的中毒剂量是1.6 μM, 与其他模型系统在文献资料中报告的值处于同一数量级 (5)。

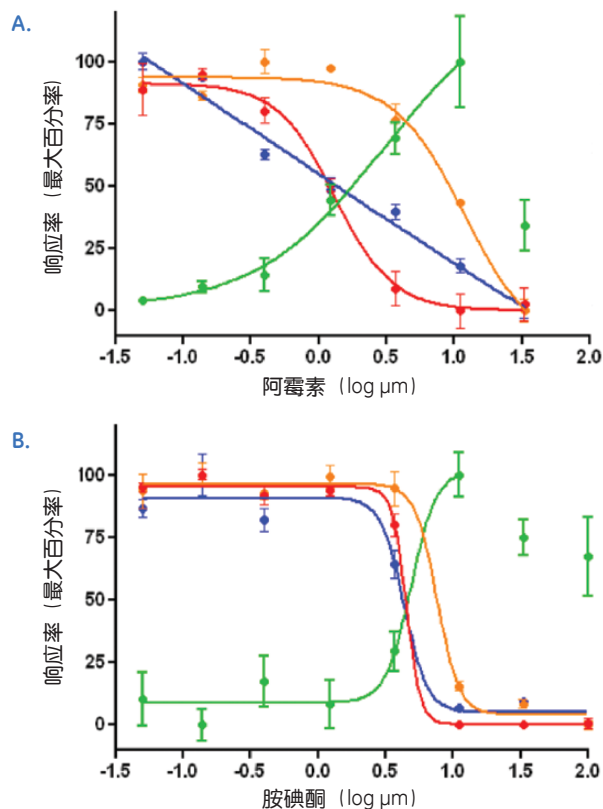


图2. GE医疗集团产心肌细胞暴露于浓度递增的阿霉素 (A) 或胺碘酮 (B), 前后共计24 h。剂量反应曲线就所有情况下核区 (Hoechst 33342, 蓝色)、钙离子动员 (Fluo-4 AM, 绿色)、线粒体状态 (TMRM, 橙色) 和质膜完整性 (TOTO-3碘衍析, 红色) 的最大反应百分率画出曲线图。通过非线性回归法 (平均值±抽样鉴定值, 样本数=3个复制试孔) 分析数据。

抗心律失常药往往对许多细胞类型都有直接的毒性作用，其中包括心脏细胞（6，7）。胺碘酮属于Ⅲ级抗心律失常药物，具有多通道的阻塞作用。如同阿霉素一样，胺碘酮也有美国食品药品监督管理局就其心血管毒性签发的相关黑框警告。因为它的中毒-治疗范围（8）很狭窄，所以难以给药。用小鼠H9c2的心脏细胞做试验的结果表明，胺碘酮具有一种促凋亡的作用，它在包括半胱天冬酶2和9（9）在内的机制介导下发生。与介导阿霉素诱导的细胞程序死亡的机制相反，有证据表明，胺碘酮的作用通过一个不依赖Bax的过程介导的，该过程不涉及自由

基的产生（6），线图并未充分利用所收集的全部信息。化合物影响作用之间的细微差异可能在图2中所考察的四个细胞参数的基础上难以鉴别。考虑在每种治疗条件下测量更大数量的细胞，这样的化合物轮廓可能更为稳健，而且在鉴别差异影响方面更为灵敏（10）。HCA影像分析方案应用到本试验中，它从每帧图像中的每个细胞上提取了54个不同的测量值。虽然解释包含54条剂量反应曲线在内的化合物轮廓是不切实际的，但我们的确可以利用各种强大的模式检测方法对整个数据集作更为深入的分析。这样的方法通常会包含主成分分析（PCA）或分组方法，要么就是两者一并用于本试验。

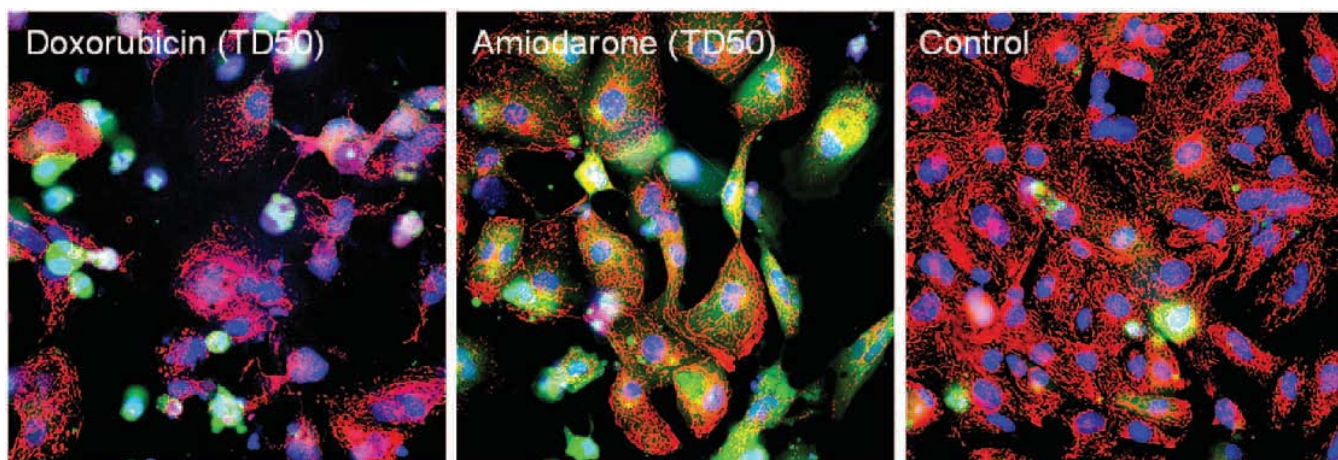


图3. 一个多重标记细胞毒性试验揭示了细胞表型上的显著差异。用阿霉素、胺碘酮或二甲基亚砜对GE医疗集团产心肌细胞处理24 h即止，然后就线粒体状态（TMRM，红色）、钙动员（Fluo-4 AM，绿色）、DNA/细胞核状态（Hoechst 33342，蓝色）和细胞存活力（TOTO-3碘，无显示）进行染色。对细胞用IN Cell Analyzer 2000进行成像。

尽管其确切的作用机制仍不清楚。剂量-反应分析（图2 B）表明，胺碘酮以正好高于典型治疗剂量的 $4.5 \mu\text{M}$ 的半数中毒浓度，诱导了质膜完整性的损失，这一剂量趋向于 $0.75 \sim 3 \mu\text{M}$ 的范围（ $0.5 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ ）（10）。胺碘酮还影响到核区、线粒体外形和钙质疏松，但药效显然不同于通过阿霉素治疗所产生的。

对用相应的化合物（图3）处理细胞的具有代表性的图像进行检查，结果证实：由这两种药物诱导的细胞表型出现显著不同的差异。

正如本实例的讲解那样，细胞成像可能不仅要鉴别具有潜在心毒性倾向的化合物，而且还要区分不同的有毒化合物并根据它们的反应曲线按相似性分组。虽然四色毒性试验的高内涵分析从试验中获得了大量逐个细胞的数据，但图2所示的常规的剂量反应曲PCA是一种性能优异

的工具，适于简化错综复杂的多参数高内涵分析数据，从而揭示化合物影响作用的总趋势和差异。此法包括精确地转换大量的多元数据组，以便导出数量上更容易管理的不相关变量，即所谓“主要成份”。在本试验中，利用PCA分析将来自每种治疗条件的54个细胞参数简化为三大主要成分。主要成分的多维曲线图（图4）使我们得以对所有的数据一目了然，还能就测试化合物突出显示一些分组和剂量依赖性。显而易见，三种测试化合物（阿霉素、胺碘酮和抗霉素A）诱发了明显不同的细胞表型，特别是采用更大剂量的情况下。如同阿霉素一样，抗霉素A涉及通过线粒体超氧化物的产生介导的心肌毒性（11）。由阿霉素诱导的表型在整个浓度范围内以依赖剂量的方式形成，而抗霉素A和胺碘酮看来似乎诱发了一种阈值型的响应。

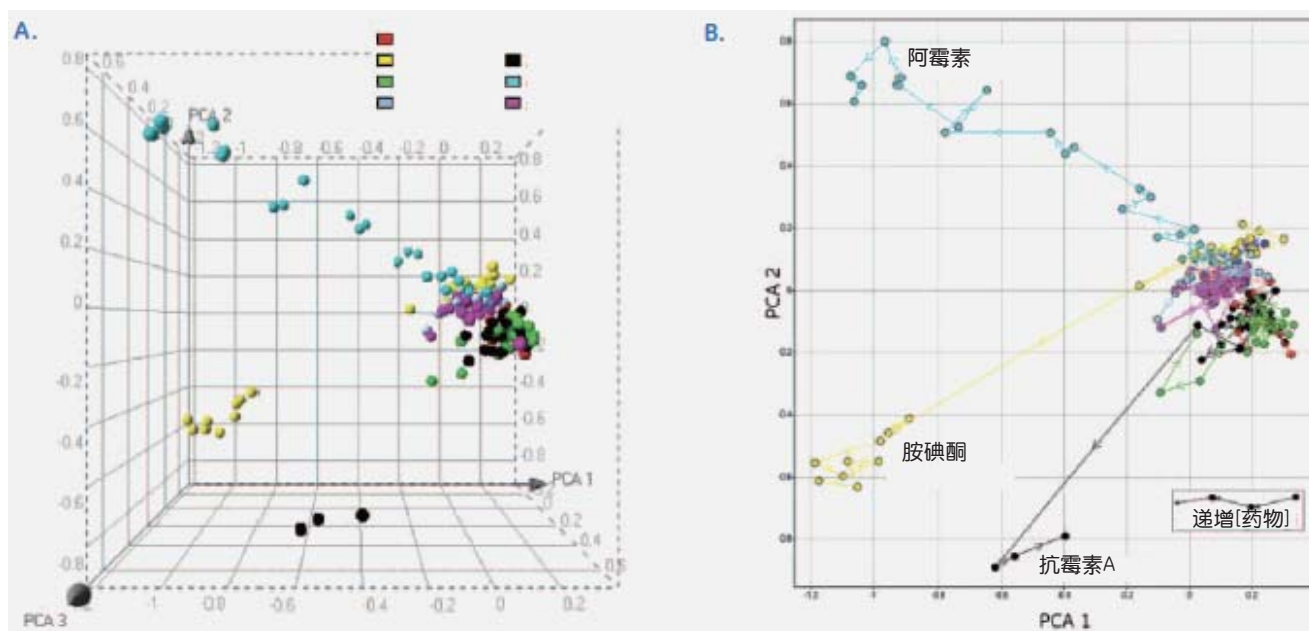


图4. 对六种化合物试验的PCA分析揭示了化合物作用的总体差异。(A)：在每个轴上画出一主要成份的曲线；(B)：前两个主要成份分别在x、y轴上画出曲线，以箭头连接各点以显示药物的递增浓度。在两条曲线上，数据点按化合物标色，如图中关键点所示。

相比之下，双氯芬酸、齐多夫定（又称AZT）和硝苯地平都具有PCA轮廓，它们与DMSO对照组更为相近，表现出动态范围更小的响应。虽然所有这些化合物均在某方面与有害的心血管影响相关，但有文献资料表明它们的破坏作用可能是累加的、渐增的，急性细胞毒素比阿霉素、胺碘酮和抗霉素A的更低，而急性细胞毒素会触发细胞凋亡途径。包括双氯芬酸在内的非甾体抗炎药（NSAIDs），都是非特异性地抑制环加氧酶，也均与心脏毒性有关。长期采用双氯芬酸治疗与导致充血性心力衰竭有一定关联，其机理迄今尚未确定。尽管作为2004年撤销环加氧酶抑制剂罗非昔布（Vioxx）的结果针对非甾体抗炎药发出了黑框警告，但相对大量的试验仍未发现使用双氯芬酸（12）与心血管危险的增加有关联。抗逆转录病毒药物齐多夫定尚未涉及急性的心脏毒性，但与作为长期治疗用药的结果而出现的心肌病有关（13），而心肌病跟线粒体呼吸机能的衰退是分不开的（14）。硝苯地平是一种L型钙通道阻滞剂，用于治疗心绞痛和高血压症，它会导致低血压和心动过速，而且在临床试验中还与冠脉疾病患者致死率的略微上升相关（15）。但是，硝苯地平并未收到针对心血管毒性的相关黑框警告，也没有涉及直接的心肌毒性。

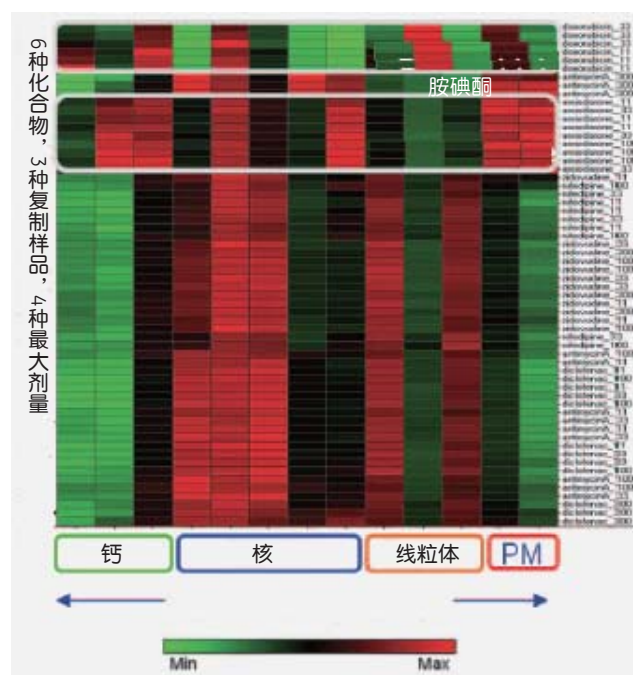


图5. 对来自六种化合物的四种最大剂量所做的层次聚类分析（样本数 = 每种治疗条件3个复制试孔），以源自荧光指示剂Fluo-4 AM（钙动员）、Hoechst 33342（核表型）、TMRM（线粒体状态）和TOTO-3碘（膜完整性）的13个细胞参数为根据。

为了以另一种能够进一步洞察性认识基于主要成份的参数的方式检查试验结果，通过层次聚类分析法对每种化合物的数据作了分析并显现为热力型数据地图（图5），图中的每一行由对应某种特定治疗条件的归一化反应值构成，并与每组细胞组分相对应。虽然所有的治疗条件和细胞条件都纳入了聚类分析中，图5仍将分析的重点放更为急性的毒性作用上来，该图只显示四个最大剂量的试验结果以及从总共54个细胞参数中挑选出来的13个细胞参数子集。如图中所示，这些参数与钙动员、线粒体状态、核表型和质膜完整性有关。据热力型数据地图显示，复制样品倾向于具有与剂量不同的同一化合物类似的轮廓（即其聚集状态）。这个观察结果表明，以多个参数为基础的轮廓测量可能会提供一种相对稳健的鉴别细微的化合物作用的方法（10）。虽然根据任何单一的参数都难以有把握地区别两种化合物，多种参数的综合仍能构成可复制的“标记图”，由其反映受特定药物影响的各种细胞路径和过程。正如以上所讨论的那样，只要研究认为阿霉素和胺碘酮通过不同的路径和机理诱导细胞凋亡，就可能得到两种化合物的截然不同的表型

轮廓。诚然，如该热力型数据地图所显示的那样，用阿霉素治疗诱发了多参数的标记图，明显地不同于由胺碘酮诱导的标记图。

从层次聚类分析以及对图像的检查结果看，细胞核及线粒体参数出现了响应于一些化合物的显著变化。为使关于这些参数的依赖剂量的反应值达到更好的可视化效果，我们创建了如图6那样的平行轴轮廓图，图中每一条垂直线都表示一个轴，在该轴上显示针对单个参数的相对反应值。在同一轮廓图上画出几种化合物的试验结果，就能更容易地直观显示测试化合物表型轮廓中的剂量依赖性及差异。胺碘酮和阿霉素的毒性作用在浓度低至1.2 μM 时的表面化趋于明显。当剂量超过3.7 μM 时（图A）这些由胺碘酮诱导的表型变化就变得可与阿霉素诱导的表型变化区别开了。相形之下，在整个剂量范围内细胞表型没有受到硝苯地平治疗的影响。通过在0~33 μM 的浓度下叠加生成的轮廓证实了这一点（图6B）。同样值得注意的是，复制样品的表型轮廓都很相似，表明这种轮廓测量分析方法是稳健的。

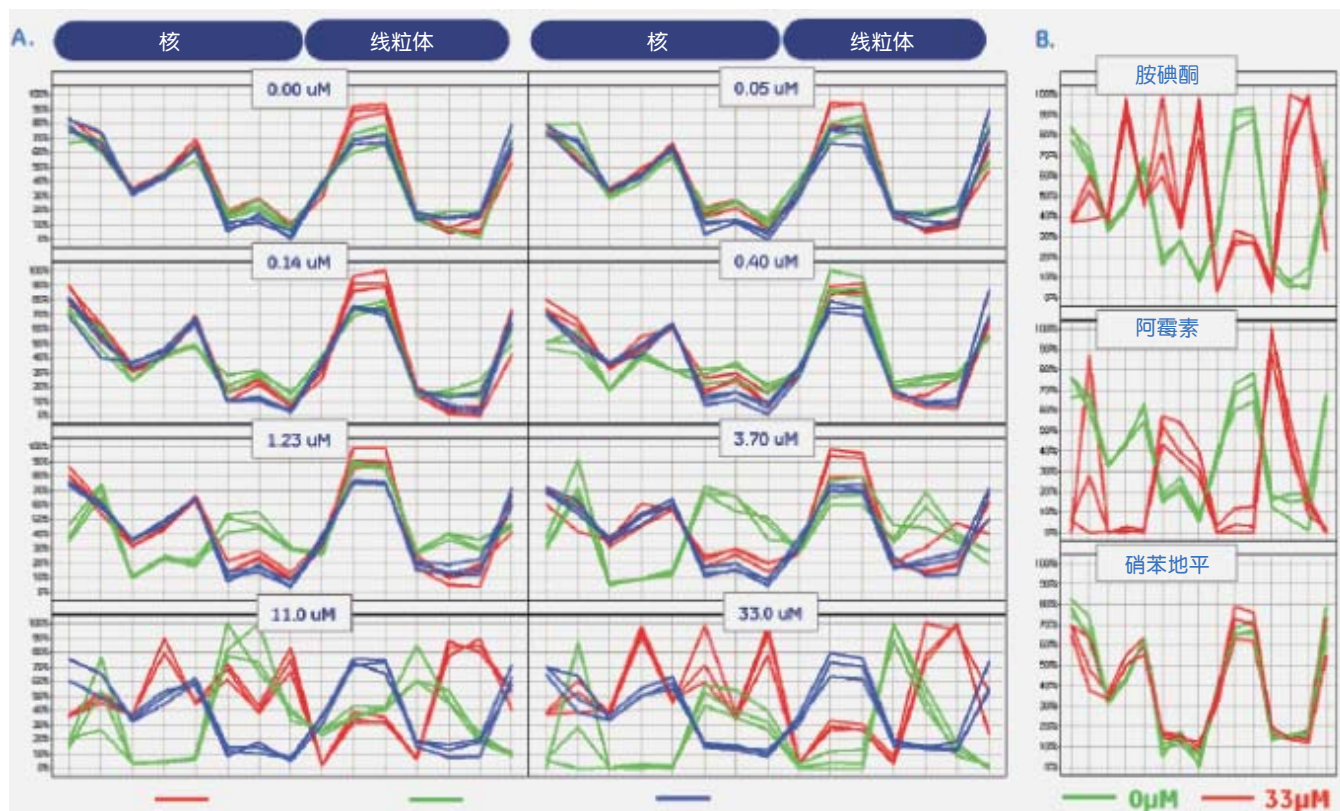


图6. 以细胞核和线粒体参数为根据绘制的轮廓图揭示了依赖剂量的化合物作用。(A) 每帧曲线图显示了在注明剂量下对胺碘酮（红色）、阿霉素（绿色）和硝苯地平（蓝色）的一组轮廓；(B) 针对胺碘酮（顶部）、阿霉素（中部）和硝苯地平（底部），就0 μM （绿色）和33 μM （红色）下的轮廓作了比较。对每种治疗条件都显示了三个复制样品。

结论

在本研究中，我们使用了GE医疗集团产的心肌细胞进行了活细胞毒性试验。尽管只检验了六种化合物以提出原则性的证据，这一方法仍可进行扩展，而且随时可以按高通量筛选的形式来配置。该试验是在In Cell Analyzer 2000上借助于高通量自动成像以活细胞形式完成的。对采集到的图像作高内涵分析，可立即鉴别更为急性的心毒性化合物。另外，高内涵分析已被证明是根据多参数的表型标记图对有毒化合物进行鉴别和分组的强有力方法。利用IN Cell Investigator软件可使用的各种模式识别工具，通过不同机理可能介导细胞凋亡的两种化合物可被彼此区别开，而其作用的剂量依赖性亦可被检验。用GE医疗集团产的心肌细胞作高内涵分析轮廓测量，可提供一个灵敏、稳健的方法，筛选有潜在的心毒性倾向的新化学个体，并对其毒性机理获得早期洞察性认识。

订购办法

产品	数量	编号
具有大芯片CCD摄像头的IN Cell Analyzer 2000	1	28-9535-10
IN Cell Investigator软件，单用户许可	1	28-4089-71
Cardiomyocytes (1E5)	1 × 10 ⁵ 心肌细胞	28-9774-35
Cardiomyocytes (1E6)	1 × 10 ⁶ 心肌细胞	28-9763-98
Cardiomyocytes (5E6)	5 × 10 ⁶ 心肌细胞	28-9763-99

参考文献

1. Product sheet: Cardiomyocytes. Relevant. Reliable. Confident. A new era in safety screening with human cell models, GE Healthcare, 28-9801-12, Edition AB (2010).
2. Arola, O.J. *et al.*, Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Research* **60**, 1789–1792 (2000).
3. An, J. *et al.*, ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity. *J. Mol. Med.* **87**, 401–410 (2009).
4. Wold, L.E. *et al.*, Doxorubicin induces cardiomyocyte dysfunction via a p38 MAP kinase-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Detection and Prevention* **29**, 294–299 (2005).
5. Filigheddu, N. *et al.*, Hexarelin protects H9c2 cardiomyocytes from doxorubicin-induced cell death. *Endocrine* **14**, 113–119 (2001).
6. Di Matola, T. *et al.*, Amiodarone induced cytochrome C release and apoptosis through an iodine-independent mechanism. *J. Clin. End. & Metab.* **85**, 4323–4330 (2000).
7. Isomoto, S. *et al.*, Effects of antiarrhythmic drugs on apoptotic pathways in H9c2 cardiac cells. *J. Pharmacol. Sci.* **101**, 318–324 (2006).
8. Greene, H.L. *et al.*, Toxic and therapeutic effects of amiodarone in the treatment of cardiac arrhythmias. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2**, 1114–1128 (1983).
9. Falik, R. *et al.*, Relationship of steady-state serum concentrations of amiodarone and desethylamiodarone to therapeutic efficacy and adverse effects. *Am. J. Med.* **82**, 1102–1108 (1987).
10. Freeley, M. *et al.*, A high-content analysis toolbox permits dissection of diverse signaling pathways for T-lymphocyte polarization. *J. Biomol. Screening* **15**, 541–555 (2010).
11. Mukhopadhyay, P. *et al.*, Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **358**, 203–208 (2007).
12. Solomon, D. *et al.*, Cardiovascular outcomes in new users of coxibs and nonsteroidal antiinflammatory drugs: high-risk subgroups and time course of risk. *Arthritis Rheum.* **54**, 1378–1389 (2006).
13. d'Amati, G., Kwan, W. and Lewis, W. Dilated cardiomyopathy in a zidovudine-treated AIDS patient. *Cardiovasc. Pathol.* **1**, 317–320 (1992).
14. Barile, M. *et al.*, Mitochondria as cell targets of AZD (Zidovudine). *Gen. Pharmac.* **31**, 531–538 (1998).
15. Poole-Wilson, P.A. *et al.*, Effect of long-acting nifedipine on mortality and cardiovascular morbidity in patients with stable angina requiring treatment (ACTION trial): randomised controlled trial. *Lancet* **364**, 849–857 (2004).

Whatman™指示型FTA™ DMPK卡

在药物研发阶段，微量干血点采样用于DMPK(药物代谢及动力学)研究明显有助于试验所用动物的减少、优化和替代(3R)。来自GE Healthcare Life Sciences的传统(非指示型)Whatman FTA DMPK卡在DMPK实验室中通常用于血液采集和储存。然而，药物研究可能还会涉及其它生物体液的研究，来支持毒物学和药代动力学/药效动力学(PK/PD)研究。非指示型FTA DMPK卡的白色对于无色生物体液，例如血浆、尿液和脑脊髓液(CSF)等较难显示，尤其是在样本干燥后。Whatman指示型FTA DMPK卡不仅具有传统FTA卡的优势，而且能够在涂敷后(图1)和干燥后(图2和图3)较好地显示无色样本。参见参考文献1了解使用干血点技术的信息。



图1. 通过指示型FTA DMPK卡能够快速简便地采集无色生物样本。

特性和益处：

- 方便显示样本：无色体液涂敷至卡上时以及干燥后试纸能够实现目视识别。
- 快速方便地采集生物体液：样本直接涂敷于纸板，无需使用另外的采集容器。
- 方便的室温储存和运输：样本可以在室温下储存和运输，无需冷却。

Whatman指示型FTA DMPK卡包括FTA DMPK-A、-B和-C卡。请参阅www.gelifesciences.com/dmpk上的FTA DMPK卡选择指南。Starter Pack包括所有三种卡，卡片打孔工具，以及小型打孔垫。参见订购信息了解详情。

方便识别无色体液

将样本涂敷至指示型FTA DMPK上时，置换了蓝色染料。该过程留下了颜色更浅的区域，从而容易在采集后(图1)和干燥后(图2和图3)识别无色样本，例如血浆(图2)、尿液(图3)和CSF(未提供)。图2显示将血液和血浆点至指示型卡后外观的差异；在实际中，血液将点至非指示型卡上。

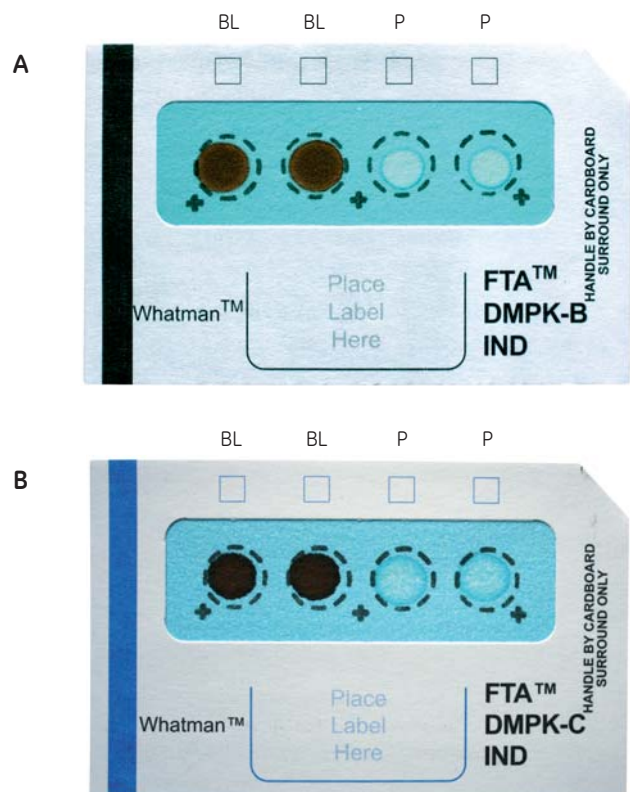


图2. 血液(BL; 15 μ l)和血浆(P; 10 μ l)的双重样本点至指示型FTA DMPK-B卡(A)和指示型FTA DMPK-C卡(B)上。卡片在室温下干燥2小时。

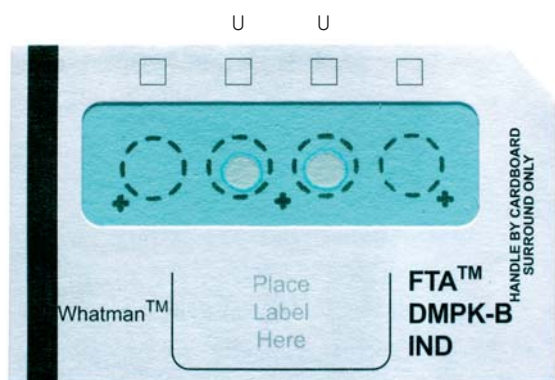


图3. 尿液(U; 5 μ l)的双重样本点至指示型FTA DMPK-B卡上，在室温下干燥2小时。

使用指示型与非指示型FTA DMPK卡进行回收测试

该实验旨在确定：

1. 涂至每片指示型FTA DMPK卡(-A、-B和-C IND)和表1. 用于回收测试的化合物的特征
2. 涂至不同类型的指示型和非指示型FTA DMPK卡的样本质谱反应的卡内变化差异。

将浓度为300 ng/m的氯胍、异丁苯丙酸或醋氨酚(表1)放入人体血浆中，生成三份样本。

表1. 用于回收测试的化合物的特征

结构	化学性质	Mr
 氯胍	碱性	253.7
 醋氨酚	中性	151.2
 异丁苯丙酸	酸性	206.3

每份添加了化合物的血浆样本(15 μ l; $n = 6$)涂敷至Whatman指示型FTA DMPK-A、-B和-C卡以及相应的非指示型卡。在指示型卡上，血浆点容易显示。卡片在室温下干燥2小时后，指示型卡上的血浆点仍然清晰可见。在每个点上打出3 mm孔，使用甲醇对3 mm圆片进行浸提，包含每种化合物的稳定同位素标记内部标准。使用API 3000 LC-MS/MS系统(应用生物系统)检测分析物。

指示型和相应的非指示型卡之间的差异

对于每种卡，根据内部标准，供试化合物的平均峰面积比响应值(PAR)使用以下公式计算：

加样化合物的平均响应值

相应内部标准的平均响应值

不同的化合物/卡型组合的PAR值与95%置信区间(CI)值如表2所示。指示型和非指示型FTA DMPK-A(图4A)、-B(图4B)和-C(图4C)卡的PAR结果以图表示。总的说来，使用指示型和非指示型卡时未发现显著的信号差异。

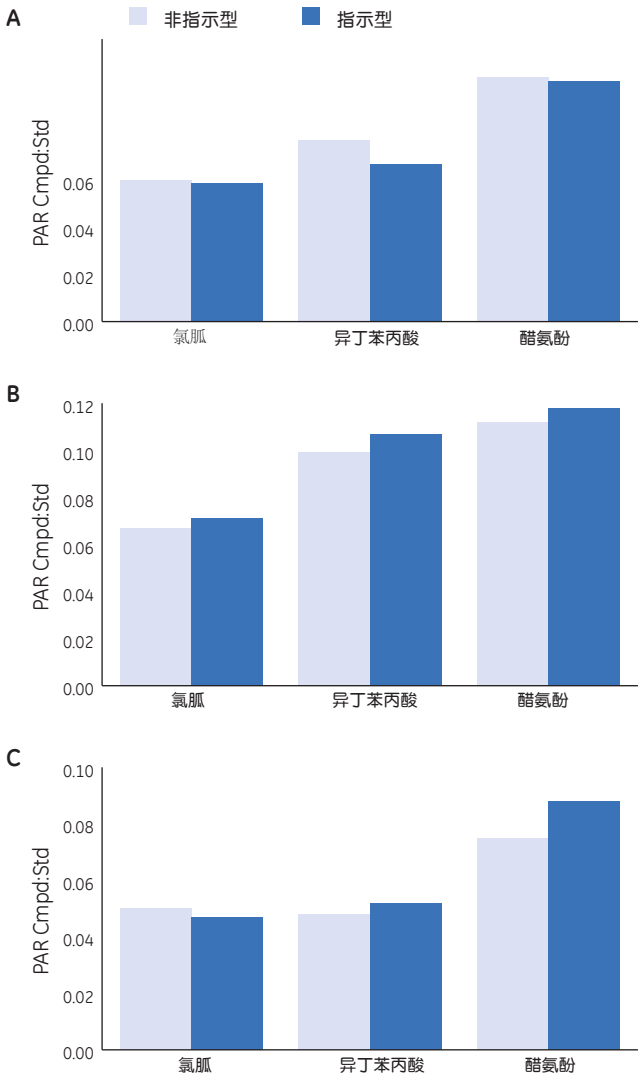


图4. 化合物的平均峰面积比质谱(MS)响应值与其同位素标记内部标准的对比。分析以下指示型和相应的非指示型卡：(A)FTA DMPK-A；(B)FTA DMPK-B；(C)FTA DMPK-C。PAR=峰面积比响应值；Cmpd=化合物；Std=内部标准。

表2. 指示型和非指示型FTA DMPK-A、-B和-C卡分析物的PAR和95%CI

	氯胍		异丁苯丙酸		醋氨酚	
	PAR	95% CI	PAR	95% CI	PAR	95% CI
FTA DMPK-A						
NON	0.060	0.0567–0.0625	0.077	0.0743–0.0802	0.104	0.1017–0.1068
IND	0.059	0.0552–	0.067	0.0657–	0.102	0.0990–
FTA DMPK-B						
NON	0.067	0.0619–0.0723	0.099	0.0929–0.1057	0.112	0.1058–0.1175
IND	0.071	0.0638–	0.107	0.0965–	0.118	0.1094–
FTA DMPK-C						
NON	0.050	0.0484–0.0509	0.048	0.0442–0.0524	0.075	0.0719–0.0774
IND	0.047	0.0450–0.0487	0.052	0.0482–0.0564	0.088	0.0819–0.0946

PAR=供试分析物的平均峰面积比响应值，基于内部标准；CI=置信区间；IND=指示型；NON=非指示型

卡内变化差异

每种化合物/卡组合的差异系数(CV)使用以下公式计算：
CVPAR(%)=标准差PAR / 平均值PAR × 100

表3包括两类卡上的一种化合物的一系列代表值。所有化合物/卡组合的CV如表4所示。数据显示，所有化合物/卡组合的CV低于10%。

氯胍	平均值	SD	CV (%)
FTA DMPK-C NON	0.0497	0.00117	2.36
FTA DMPK-C IND	0.0469	0.00175	3.74

SD=标准差；CV=差异系数；PAR=供试分析物的平均峰面积比响应值，基于内部标准；IND=指示型；NON=非指示型

表4. 所有化合物/卡组合的PAR的CV(%)

	氯胍	异丁苯丙酸	醋氨酚
FTA DMPK-A			
NON	4.60	3.68	2.32
IND	5.88	2.27	2.67
FTA DMPK-B			
NON	7.43	6.17	4.99
IND	9.10	9.52	6.67
FTA DMPK-C			
NON	2.36*	8.13	3.49
IND	3.74*	7.47	6.88

CV=差异系数；PAR=供试分析物的平均峰面积比响应值，基于内部标准；IND=指示型；NON=非指示型

* 参见表3了解用于计算CV的平均值和SD值。

来自GE Healthcare的Whatman指示型FTA DMPK卡即使在卡片干燥后也能实现无色生物流体的简捷显示。根据三种供试化合物的质谱分析，指示型和非指示型FTA DMPK卡表明，每种卡内的差异系数低于10%。另外，对于所有卡型，使用指示型卡和相应的非指示型卡获得的结果未现显著差异。

订购信息

Whatman指示型FTA DMPK卡，蓝色，用于无色样本

说明	数量	代码
FTA DMPK-A指示型卡	100/包	WB120222
FTA DMPK-B指示型卡	100/包	WB120223
FTA DMPK-C指示型卡	100/包	WB120224
FTA DMPK指示型Starter Pack	45/包1	WB120225

¹ 包括-A、-B和-C卡各15个，1台3 mm Harris Uni-Core™打孔器，一个小型打孔垫。

Whatman FTA DMPK卡，白色，用于血液或其它样本

说明	数量	代码
FTA DMPK-A卡	100/包	WB129241
FTA DMPK-B卡	100/包	WB129242
FTA DMPK-C卡	100/包	WB129243
FTA DMPK Starter Pack	45/包1	WB129248

¹ 包括-A、-B和-C卡各15个，1台3 mm Harris Uni-Core™打孔器，一个小型打孔垫。

参考文献

1. Barfield, M. and Wheller, R. Use of dried plasma spots in the determination of pharmacokinetics in clinical studies: validation of a quantitative bioanalytical method. *Anal. Chem.* **83**, 118–124 (2011).

订购信息

打孔和干燥附件

说明	数量	代码
Harris Uni-Core打孔器，3 mm	4/包，配备两个	WB100039
Harris Uni-Core打孔器，6 mm	2.5" × 3"切割垫 4/包，配备两个	WB100040
Harris Micro打孔器，3 mm	2.5" × 3"切割垫 1/包，配备一个 5.9" × 7.9"切割垫	WB100038
Micro打孔器的替换头，3 mm	1/包	WB100042
打孔垫，大型，5.9" × 7.9"	1/包	WB100020
Dry Rak (无Velcro™)，容纳11个卡	10/包	10537173
Dry Rak (配备Velcro)，容纳11个卡	10/包	10539521

储存和运输附件

说明	数量	代码
塑料Ziploc储存袋，4" × 6"	100/包	10548232
薄片障碍Ziploc袋，用于最大95 × 130 mm的卡片	100/包	10534321
干燥剂包，指示型，1 g	1000/包	WB100003
玻璃纸封袋，3.25" × 4.88"	100/包	10548236
生物危害标签，0.88" × 0.88"	1000/包	10534150



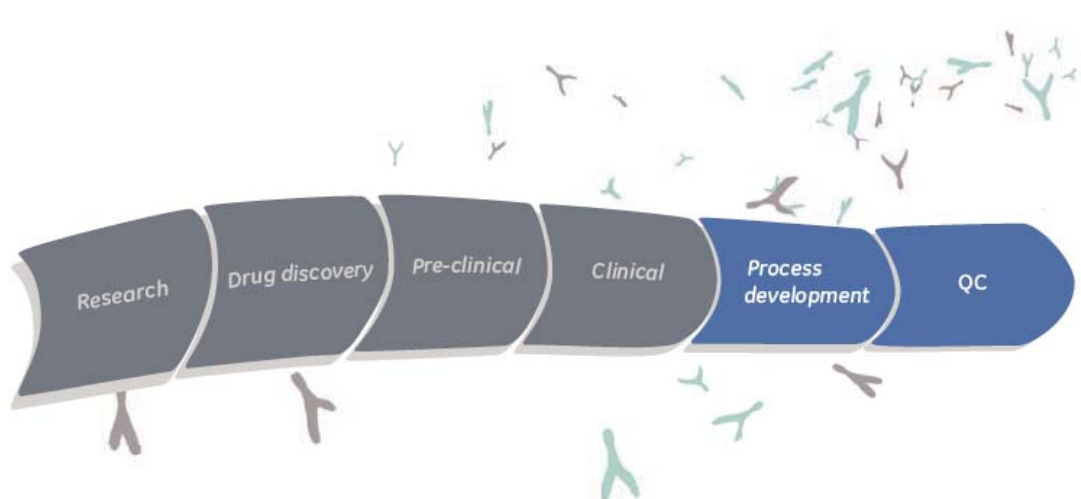
大分子应用专题



- 使用Biacore™非标记检测技术提升工艺开发和质量控制
- 用Biacore 4000突破解决筛选和表征重组抗体片段的瓶颈问题
- 采用微量热差示扫描量热技术对治疗性抗体的工艺开发进行更有效的指导
- 微量热ITC和DSC技术在生物制剂研发中的应用
- 结晶实验中使用AKTExpress™进行人源化WO-2 Fab 的多步骤纯化
- 从大肠杆菌获得重组胰岛素原的高通量筛选与工艺开发
- Biacore™系统开展免疫原性检测



使用Biacore™非标记检测技术提升工艺开发和质量控制



非标记相互作用分析-贯穿生物治疗药物的发现直至生产

以单克隆抗体和重组蛋白为代表的生物治疗药物正凭借其疗效高、药物发现相对较快等特点而日益重要。对生物治疗药物全面地分析表征是药物发现和开发过程中的不可或缺的组成部分。例如，在治疗性抗体的开发的所有环节都离不开对抗体进行高效地筛选、优化和表征；由大规模细胞培养（如CHO细胞）表达的蛋白在生产 and 纯化环节需要对宿主细胞蛋白等潜在污染进行监控；此外，监管部门也不断提高标准，要求对药物的安全性和有效性采取更高频次并且更加全面的分析。这些因素共同促成了在生物治疗药物从发现到生产的开发全过程中，有必要采用更为经济、有效的检测手段。GE Healthcare的Biacore™系统能够对生物治疗药物与药物靶点间的结合特征进行全面的分析表征，同时也可以应用于蛋白浓度的快速和高精度测定。

Biacore系统能够为上游和下游工艺带来哪些价值？

成功的工艺开发能够降低临床生产规模的运行成本，而工艺开发本身也必须对时间和成本进行控制。此外，还必须依据法规的要求，比如在由细胞培养表达的重组蛋白或单抗的整个生产过程中，要求必须使用经验证的方法对浓度进行监测。

Biacore系统提供了开放、自动化、非标记的检测手段，能够提供高精度和高可靠性的浓度测定结果与动力学表征信息。这些数据在筛选细胞株、优化纯化工艺和生产高质量的生物治疗药物产品中发挥着重要的作用。

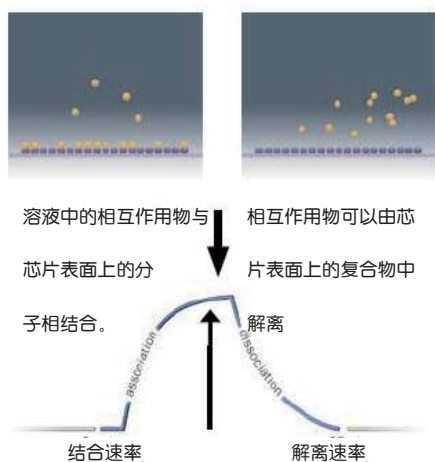
Biacore系统相较于其他技术的优势有哪些？

- Biacore系统按照GLP/GMP/GCP环境下工作的要求设计，并符合21 CFR part 11的法规要求。
- 无需标准曲线的浓度测定方法测定特定结合的活性浓度，而不仅仅是总浓度。
- 内置数据质量控制模块，对结果可靠性把关。
- 动力学表征数据应用于药效和稳定性研究。
- 自动化，无需标记。
- 快捷、简单的检测方法开发和方法转移。

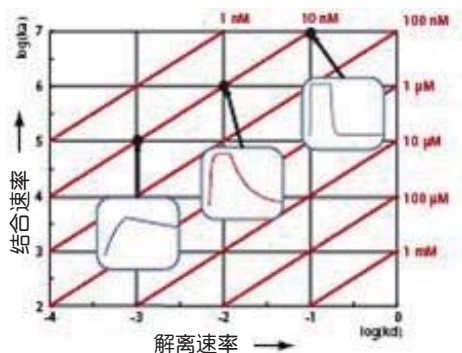
为什么结合动力学信息对于生物治疗药物至关重要？

动力学特征决定着药物在体内如何与相应药物靶点相互作用。生物治疗药物特定的动力学性质可以影响到药效的多个不同的方面，也会影响到生产工艺和条件的调整 and 选择。监控药物产品的结合特征正日益成为质控批次放行检测中的普遍内容。

- 结合速率呈现浓度依赖性，与药物使用剂量非常关联。
- 解离速率反映药物的在靶滞留时间，是决定药物药效的关键指标。



通过结合反应的实时图（传感图）能够了解特定结合的特征，并获得不同的结合动力学常数（结合与解离速率），亲和力和蛋白浓度等多种不同信息。



结合-解离图。在对角线上的三个蛋白具有相同的10nM亲和力，但结合/解离速率却相差几个数量级。模拟的传感图（框中的插图）反映了相应的结合特征。结合特征信息可以用于监测药物批次与批次间的差异。

为什么要采用Biacore系统进行浓度测定？

利用Biacore系统进行浓度测定的原理类似于现有的方法（如ELISA）。但在Biacore系统中，整个相互作用过程都能被实时监测和定量，这样既可以选择采用基于速率，也可以选择基于终点的不同测量方法。使用Biacore进行浓度测定的优势包括：

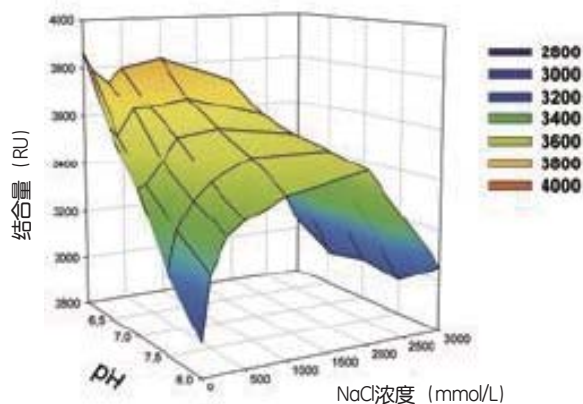
- 实时监测-无需二级反应，无需预先标记
- 内置的数据质量控制，对检测每一步进行质控
- Biacore的检测方法兼容混合样品，例如补液混合物、培养基上清。

Biacore系统在上游和下游工艺的应用实例

对单抗通用纯化工艺的条件优化。

抗体具有多样性，因此在开发纯化工艺时必须将多样性考虑在内。Biacore系统在确定、筛选、优化蛋白捕获条件和洗脱条件的任务中发挥了重要的作用。在下面的例子中采用不同的条件对IgG进行纯化，使用Biacore测定了不同纯化条件下的IgG结合量。

清洗步骤后结合的量（特异性结合容量）



上图展示了如何选择最佳的通用条件用于捕获各种不同的IgG。数据由诺和诺德（Novo Nordisk AS）公司友情提供。

使用Biacore对补液混合物、培养基上清、以及缓冲液成分中IgG浓度的测定

使用Biacore在不到5分钟的时间内就快捷、高精度地获得IgG的定量信息。Biacore系统实现了自动检测分析，并提供比ELISA更宽的检测范围，且检测间的差异性（CV）在3%以内。

人IgG ELISA

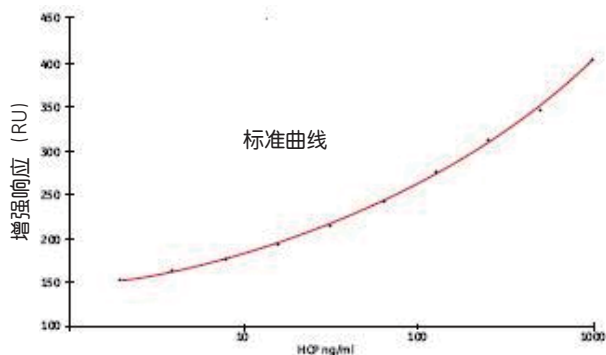
Biacore系统

样品	滴度	CV	重现性	滴度	CV	重现性
样品1: 97μg/ml	90μg/ml	6-8%	70-110%	86μg/ml	2.60%	87-103%
样品2: 965μg/ml	770μg/ml	15%	70-110%	769μg/ml	1.50%	87-103%
测量范围	2.5-20 ng/ml		100-12800 ng/ml			

采用ELISA方法和Biacore测定人源IgG浓度的比较。ELIS方法必须对样品进行稀释以落入标准曲线范围。数据由法国的默克雪兰诺 (Merck Serono) 友情提供。

HCP、杂质浓度的检测

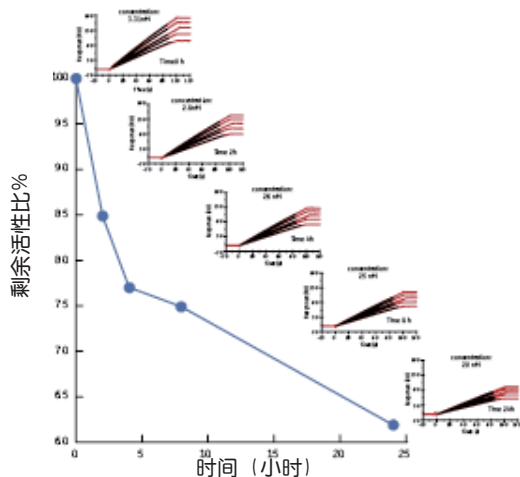
来源于宿主细胞的生物分子具有潜在的毒性。为了避免可能发生的不良后果，要求去除宿主细胞蛋白 (HCP)，并且在每个纯化步骤之后都要对HCP残留进行检测。Biacore系统能够灵活设计不同的检测方法，既可以选择不直接检测也可以选择间接检测形式，满足不同实验的要求。



标准曲线：用于检测来自CHO细胞的宿主细胞蛋白 (HCP)。

无需标准曲线的浓度测定 (CFCA)

获得药物准确的活性浓度至关重要，活性浓度数据可被用于评估治疗性药物的活性、稳定性、批次与批次间的一致性。Biacore T200提供了无需标准曲线的浓度测定手段 (CFCA)，能够在不具备标准品、或标准品不可靠时完成浓度测定。



在不具备标准品情况下，通过测定特定蛋白的活性浓度来评估某种压力条件下样品的稳定性变化情况。实验测定了目标蛋白IgE受体的α链的活性浓度。在不到8小时内，活性浓度的降低反映了活性的逐步丧失。数据由Resistentia Pharmaceuticals友情提供。

Biacore系统如何应用于生产和质量控制中?

在生产和质量控制的应用中，采用经验证的检测方法对从表达纯化多个环节的生物产品质量进行监控。由Biacore系统所提供的高质量、实时数据能够快速、可靠地对产品质量进行监控，并且缩短方法开发的时间。例如，用Biacore取代ELISA方法，可以显著地减少检测时间并加速整个纯化工艺。将动力学数据纳入QC监测中，可以独到地反映与生物产品的临床药效高度相关的结合活性高低。通过对每批产品的结合特征进行检测，并与参比样品进行比较，也可以容易地发现产品的批次间差异。

Biacore系统所提供的全面信息可以帮助决定是否需要提前终止一个生产批次或对培养条件进行调整。

Biacore系统提升上游和下游工艺

在工艺开发和生产中使用Biacore系统将使您能够：

- 在优化细胞株和纯化条件中缩短方法开发时间
- 即便不具备标准品，也可以获得定量数据。
- 提高分析效率和数据质量。
- 确保产品质量的一致性。
- 在不牺牲已有检测方法的性能水平的前提下，轻松地向外包合作伙伴转移内部开发的检测法。

用Biacore 4000突破解决筛选和表征重组抗体片段的瓶颈问题

抗体及其衍生物作为生物治疗药物、精确的诊断剂及生物学研究中的重要工具，变得越来越重要。因此，能够筛选和表征大量抗体并在研发中提供最佳候选药物的可靠的技术变得非常重要。

配有Biacore 4000抗体扩展包的Biacore 4000系统可用于高效筛选和表征治疗性和诊断性用途的抗体片段。十个装有含禽类scFv片段的粗细胞裂解液的96孔板可在20小时之内完成筛选和排序。对筛选中一组样品用2对2(2-over-2)动力学方法进行分析。这种方法为筛选高亲和力和理想动力学状态的片段提供了丰富的数据和快捷的筛选手段。在不同温度下的动力学分析为候选片段从亲和力方面提供了温度稳定性的信息。

使用预先优化的人Fab捕获作用试剂盒对鸡/人嵌合Fab片段进行筛选和表征可以在粗样品的初级筛选中实现准确的解离速率测定。这些实验将抗体片段的筛选提高到了了解更全面、更高效的新高度。

简介

高质量抗体是诊断分析的关键。对不同筛选平台中选出的重组抗体或片段（如scFv和Fab）进行二次筛选时，往往由于大量低质量的数据集而成为分析的瓶颈环节。本研究中展示了如何用配有Biacore 4000抗体扩展包的Biacore 4000系统实现对心血管疾病标记物(肌钙蛋白 I)抗体和癌症标记物（前列腺特异性抗原，PSA）抗体的快速筛选、表征及排序。作为高质量诊断性试剂，理想的抗体应该具有高度的特异性、高亲和性及温度稳定性。

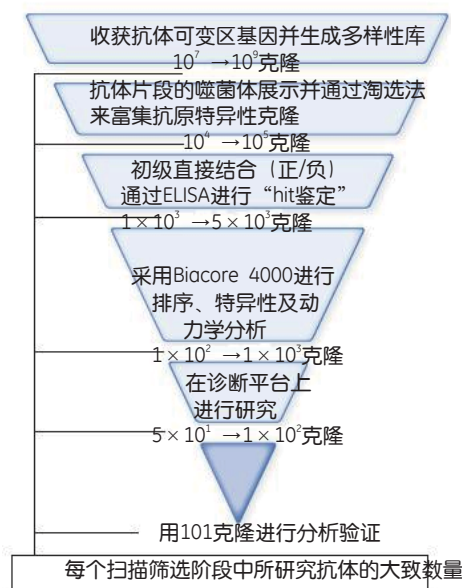


图1：筛选用于诊断的重组抗体的过程概览图。Biacore 4000用于二次筛选具有解决分析瓶颈问题的能力，并可提供高质量的结合、特异性及动力学方面的数据。

材料和方法

十个96孔板中含有禽源性scFv抗体片段（含HA融合标签）的粗细菌抽提物所组成的一个抗体组是通过噬菌体展示技术从一个有着10⁹个克隆的巨大免疫抗体库中筛选出来的。

Biacore 4000，Biacore 4000 抗体扩展包，传感芯片CM5，氨基偶联试剂盒，人Fab 捕获试剂盒，固定缓冲液（10 mM 醋酸钠, pH 4.2），及运行缓冲液（HBS-EP+）均来自GE Healthcare。肌钙蛋白I购自Life Diagnostics Inc，PSA来自Lee Biosolutions Inc。抗-HA抗体购自Affinity BioReagents公司。动力学常数排序和计算由Biacore 4000 评估软件完成。随后，数据导出到Microsoft™ Excel™或者Spotfire™中进行进一步分析。

根据稳定性 对scFv片段进行筛选

一个抗HA的多克隆抗体通过氨基偶联反应以约7000RU的响应水平被共价固定到CM5传感芯片的四个流动池的1、2、4、5号检测点上。十个含有来自原始细胞裂解液的scFv融合片段的96孔板经过离心并以1:4稀释之后被捕获到1和5位点上。肌钙蛋白溶液（50 nM）被注入到所有的位点上（图2）。通过这一分析设置，每个循环中都有8个不同的抗体片段被筛选出来。传感器表面可用20 mM NaOH进行再生，在使用了120个循环之后，反应界面依然不会有任何结合活性的损失。结合稳定性的排序根据抗原解离阶段的报告点（分别为稳定性-早期报告点和稳定性-晚期报告点）进行评估。

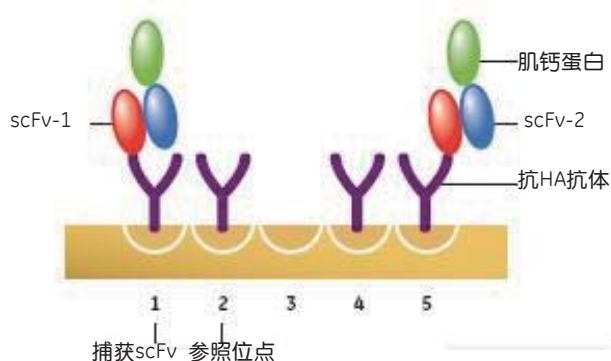


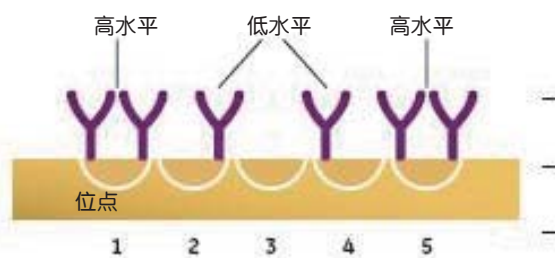
图2: 用于scFv筛选的Biacore 4000分析设置

scFv 片段的2-over-2动力学分析

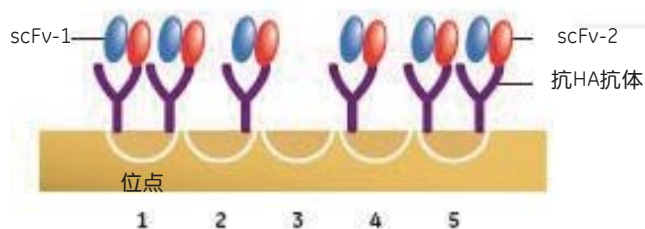
由上述筛选实验中筛选出的最佳10%结合物从最初的微孔板上转移到新的96孔板中并用2对2（2-over-2）动力学方法进行分析。Biacore 4000 抗体扩展包利用额外的位点寻址功能来实现2-over-2动力学分析方案。两种不同密度的捕获分子被固定在每一个流动池中一半的位点上（高密度的在位点1和5上，低密度的在位点2和4上）。这使得每个流动池的都可以捕获两种水平的抗体（图3）。2对2（2-over-2）动力学分析只需要三个循环：针对每种抗体只需测定2种抗原浓度外加一个空白对照。

两种水平的抗-HA抗体被固定：在位点1和5上为4000 RU，在位点2和4上为2000 RU。细胞裂解液中的scFvs按照1:4稀释并捕获在位点1+2和5+4上。在进行动力学鉴定时，每种scFv样品总共只需要50 μ l。浓度为25和100 nM的肌钙蛋白随后注入两个循环，接着又注入作为空白对照的缓冲液。通过对1-2和4-5位点上传感图数据进行综合的动力学拟合来进行分析。此实验分别在25 $^{\circ}$ C和37 $^{\circ}$ C条件下进行。

A) 两种密度的抗HA抗体被固定



B) 每个流动池的半面上捕获两个不同浓度的同一种scFv



C) 两种浓度的肌钙蛋白I与空白对照注入到所有的位点上

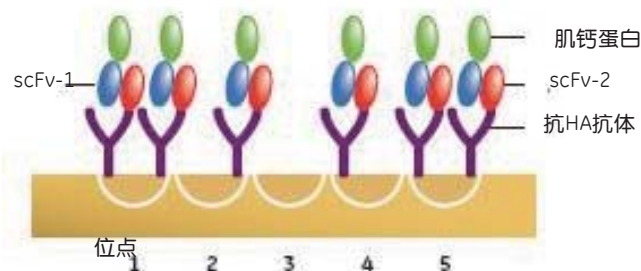


图3. 两种密度的捕获分子被固定在每个流动池的半面上。这可以在每个流动池的半面上捕获两种密度的scFv片段，并在其后注入肌钙蛋白I

利用解离速率排序筛选Fab片段

人Fab捕获试剂盒中的人Fab结合物通过氨基偶联反应以11000RU的响应水平共价偶联到传感芯片CM5的位点1、2、4及5上。192个Fab片段组成的抗体组被捕获到1和5上，使得每个循环可以有8个样品被筛选出来。50 nM的PSA溶液被注入到流动池中，接着进行缓冲液空白对照循环。反应界面用pH 2.1的甘氨酸盐酸（Glycine-HCl）进行再生。在用对照位点和空白循环进行双重对照之后通过将传感图拟合为1:1模型进行分析。

2 28-97777-72 AA

结果与讨论

根据结合稳定性筛选 scFv 抗体片段

用图2中所述的分析方案对一组960个对人心肌钙蛋白I特异性的scFv片段进行筛选。图4显示了来自120个样品的传感图，报告点用彩色框标记。

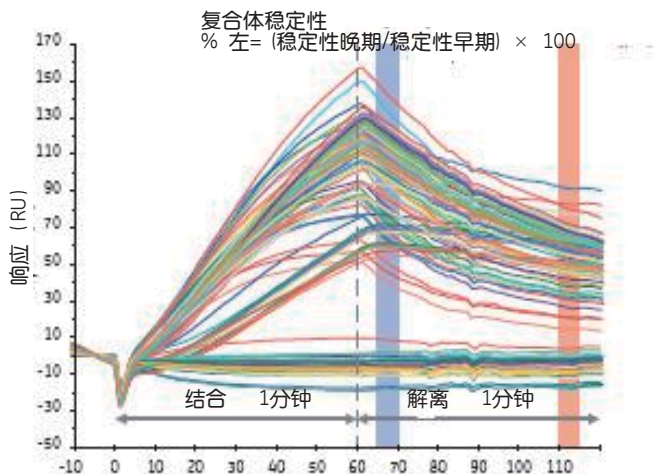


图4:显示用来排序的报告点的120个样品的报告曲线

图5显示稳定性-早期对稳定性-晚期报告点的散点图。这类图可根据结合的稳定性来对结合物进行排序。该图显示scFv的两个主要类型:靠近原点的非结合物以及斜线上较高处的结合物。具有最强结合稳定性及最慢解离速率的最佳结合物用蓝色方块表示。Biacore 4000可在18小时内即完成对总计960个样品的分析并按照结合稳定性进行排序。数据分析可在一小时之内完成。

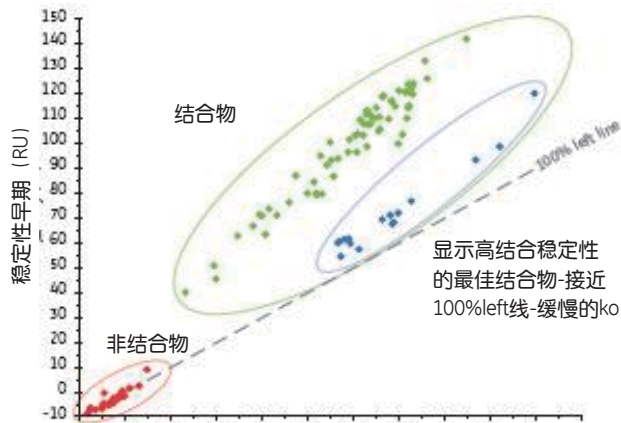


图5: 用来鉴定稳定结合物的稳定性-早期VS稳定性-晚期图(最佳结合物用蓝色方块表示, 绿色的结合物则为不稳定)。

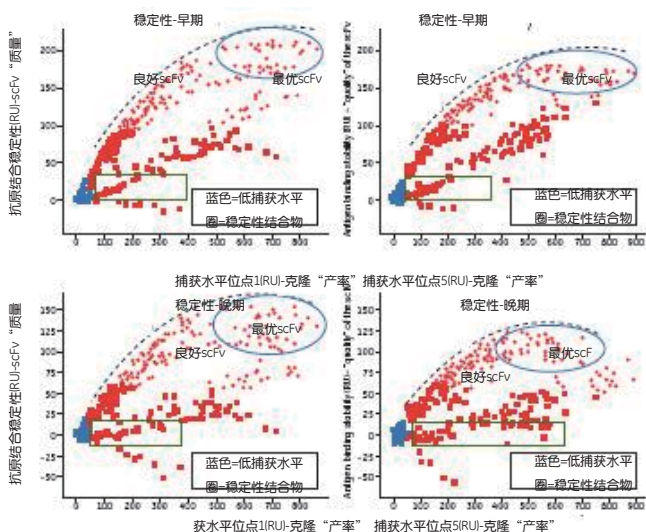


图6: scFv 筛选概况。抗原结合稳定性、稳定性-早期(上方)、稳定性-晚期(下方)、对位点1(左)和位点5(右)的捕获水平进行作图。显示了没有scFv(蓝色)的、有明显捕获的(红色)及有稳定抗原反应scFv(圆圈)的孔。绿色方框代表被捕获但是没有与抗原结合的scFv。最佳scFv克隆显示高的捕获水平和高的结合稳定性(蓝色圈)。

四个流动池中位点1和5上捕获的scFv的数量标在x轴上,代表不同克隆的捕获水平或表达水平。当scFv被捕获之后,将抗原注入到位置点上。抗原分离早期和晚期的响应水平标在Y轴上以表示捕获的scFv与抗原相互作用的质量。无意义的克隆和良好的克隆(靠近虚线)被区分开,最优的克隆同时显示出高的捕获水平和结合稳定性(缓慢的解离速率)。这是选择用于进一步研制的高质量抗体和抗体片段的重要标准,并应用在选择进行2-over-2动力学鉴定的scFv上。

2-over-2动力学鉴定

由于动力学特性对于治疗药物和诊断剂都有着重要的影响,因此,在研制过程中尽早得到动力学数据有助于进行更有根据的筛选。由于可以在一半时间内用明显更少的试剂和样品得到所需数据,因此,2-over-2动力学研究方法特别适用于在筛选期间来提供动力学方面的信息。通过对位点1-2和4-5各自的传感图数据进行联合的动力学拟合,使用Biacore 4000评估软件中的动力学评估工具进行分析。这一分析将不同反应界面密度和不同分析物浓度结合在一起。

为了研究结合作用的温度稳定性,所有的样品都在25°C(图7A)和37°C(图7B)下进行分析。两个温度下得出的动力学常数输出到spotfire中进行更进一步的分析。根据结合/解离速率的图形分析即可将温度稳定、高亲和力的scFv鉴定出来(图8)。

图8中所显示的抗体在纳摩尔水平具有高亲和力。然而,被鉴别出来的两组抗体表现出不同动力学特性。一组在温度升高的情况下以平行升高的结合率补偿解离速率的升高,因而显示出温度稳定性的亲和力;而另一组则在较高温度下显示出较弱的亲和力。由于该诊断平台的分析通常都在室温到37°C之间进行,应该使用在这两种温度下表现出相似特性的试剂。

在11个小时内测定将近100个样品的结合/解离速率及KD值。使用2-over-2动力学方法,具有温度稳定性亲和力的最佳候选物被迅速地鉴定出来并且可以进一步在诊断平台上进行检测。

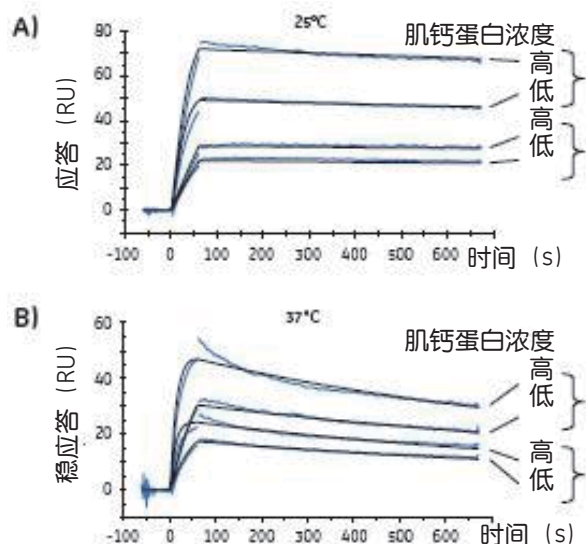


图7：用两种不同温度下2-over-2动力学分析数据重叠作图以研究A) 25°C及 B) 37°C条件下scFv/肌钙蛋白结合稳定性的实例。

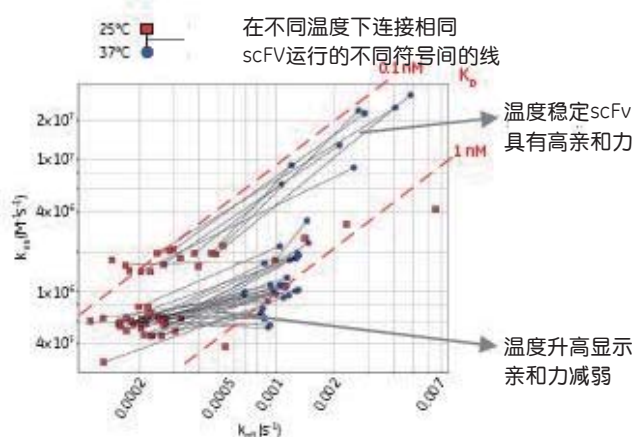


图8：肌钙蛋白特异性scFv抗体的结合/解离图。具有温度稳定的高亲和力的组可能是最适于在变化的温度下作为诊断分析的抗体。

结合PSA的嵌合Fab片段解离速率的排序

以用抗PSA的Fab片段建立另一个诊断性试验为目的，用人Fab捕获试剂盒捕获方法对一组192个Fab片段进行筛选来分析它们与PSA的结合。

尽管完整的动力学表征需要对一系列浓度的抗原进行分析，但在筛选期解离速率基础上将一个抗原浓度的分离阶段拟合成一个1:1模型可为抗体排序提供重要信息。这一解离速率排序方法可以替代报告点扫描和2-over-2动力学分析来筛选最佳候选抗体。

Fab片段分析最初是捕获通过HA融合的Fab片段而固定的抗HA抗体来进行的。然而，这种抗HA捕获的稳定性太低而无法实现准确的解离速率排序。而且，低表达克隆也由于抗HA抗体的捕获能力过低而无法被检测到。

为解决这一问题，可以使用人源Fab捕获试剂盒。使用这一试剂盒可实现稳定的配体捕获及较低的基线漂移，使得单一浓度的分析物可以获得可靠的数据并通过拟合1:1模型进行分析。可以实现快速的解离速率排序（图9）和初始HA标记捕获试验中漏掉的低表达水平克隆的鉴定。在11小时内完成所有192个样品的分析，选

出最好的20个抗体片段用于测序和进一步在诊断平台上的分析。

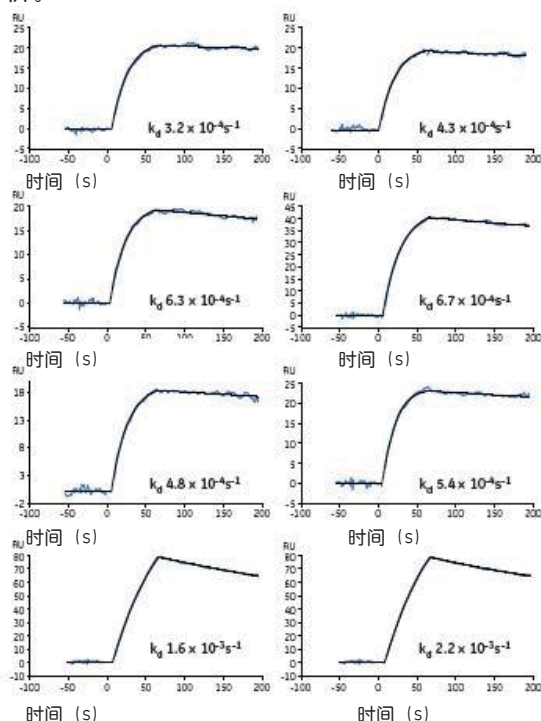


图9以上拟合传感图代表了几乎所有分析中的Fab的出现的解离速率范围。

结论

Biacore 4000的高容量性可实现对来自噬菌体展示组合抗体库的大量多样化的样品进行分析。960个样品在20小时之内可进行筛选并根据结合稳定性进行排序。此外，2-over-2动力学分析在11小时内可完成96个scFv的结合率、解离速率及亲和力测定。这些综合起来说明Biacore 4000的分析通量和数据质量足以解决筛选流程中的分析瓶颈问题。

粗制备样品无需进行纯化便可进行分析，节约了时间和资源。以基于捕获作用的方法减少了测试研发时间并实现在一次分析中对多个分析物或者抗体批次进行便捷的分析。

结果表明，动力学数据有助于进行可靠的抗体片段筛选。根据解离速率不同所进行的初级筛选和用于表征的快速结合速率/解离速率图（on/off rate map）成为抗体研制成功的关键。

订货信息

Product	Code no.
Biacore 4000	28-9643-21
Biacore 4000 Antibody Extension Package [†]	28-9664-57
Human Fab Capture Kit [‡]	28-9583-25
HBS-EP+ 10x	BR-1006-69

[†] Includes software CD containing Biacore 4000 Antibody Extension Software, license agreement with product key, and Certificate of Software Conformance.

[‡] Includes Human Fab Binder and Immobilization buffer for 30 Immobilizations and regeneration solution for 1000 regeneration injections.

Related literature	Code no.
Biacore 4000, Data file	28-9694-94
Biacore 4000 Antibody Extension Package, Data file	28-9694-95
Human Fab Capture Kit, Data file	28-9623-69

采用微量热差示扫描量热技术对治疗性抗体的工艺开发进行更有效的指导

测定pH值和离子浓度对蛋白质稳定性的影响，对于开发的可靠的蛋白质提纯步骤和制剂配方策略来说具有重要的意义。毛细管微量热差示扫描量热法（毛细管DSC）非常适用于提供此类信息，在开发治疗性蛋白质方面具有特别的实用价值。在此讲述的是对用作药物的两种抗体形式（IgG₁和IgE）的pH值/离子浓度稳定性的信息采用微量热差示扫描量热法（DSC）所做的研究。微量热差示扫描量热法（DSC）擅长考察、研究与多结构域蛋白质中不同的单结构域的稳定性，例如抗体。在此可以看到，IgE恒定的结构域片段（Fc）对低酸碱度/高盐分的环境比IgG₁ Fc更为敏感。这些结果表明，用于IgG抗体的纯化和制剂策略不适用于IgE的纯化和制剂。该应用指南显示了微量热差示扫描量热法（DSC）是如何用于指导抗体及其他治疗用蛋白质的开发研究的。

导言

γ 同种型免疫球蛋白——特别是人源IgG₁——的生产和纯化，对于诊断或治疗的应用来说目前已经常规化了。另一方面，基于IgE的疗法最近才刚刚开始兴起（1-3），尚未确定大规模生产、处理和配制IgE或IgE恒定区（Fc ϵ ）的标准方法。虽然对于IgE的生物化学和免疫调节功能已有较多掌握，但仍未弄清Fc ϵ 在耐热性或pH敏感度（2）方面是否与Fc γ 相似，也未弄清处理IgG的标准方法是否适用于IgE。

IgE对于宿主预防寄生虫和防御性炎症来说是很重要的。然而IgE通过其受体转导信号也是过敏性炎症的一个焦点（4）。IgE的恒定区是一个包含三个独特Ig折叠区域（C ϵ 2、C ϵ 3、C ϵ 4）重复对的同型二聚体，负责绑定其两个受体即Fc ϵ RI和CD23（又称Fc ϵ RII），见图1。

本应用指南主要关注微量热差示扫描量热法（DSC）的实用性，用以多方面指导IgG和IgE的生物制剂开发过程。尤其是差示扫描量热法（DSC）对于运输、纯化和配制IgG及制剂药品提供了颇有见地的指导。圆二色光谱（CD）对于此类研究发现的贡献与微量热采用差示扫描量热法（DSC）所能达到的鉴别水平上的比较：微量热差示扫描量热法（DSC）能够在多结构域蛋白质内的单结构域水平上研究蛋白质的稳定性，而这方面圆二色谱获得的数据透明度较低。

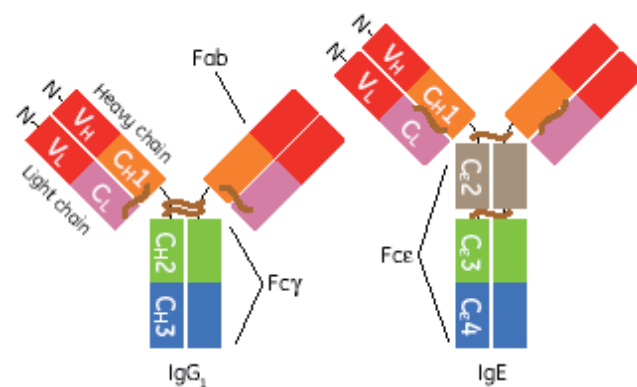


图1. IgG和IgE的示意图。

材料与方法

微量热差示扫描量热法 (DSC) 试验是在MicroCal™ VP-Cap DSC系统上进行的。提纯的Fcε、Fcγ和Fcγ-Cε2蛋白质的产生过程如前所述 (5)。全套的毛细管DSC试验以不同的酸碱度扫描超过400次,但在四个多月的时间内投入人力很少。只需大约三个工时便可准备好Fcε和Fcγ的试验,包括蛋白质浓度测量、稀释和平板的装调。试验的其余步骤就由MicroCal™ VP-Cap DSC自动完成了。详尽的说明见 (5)。

结果

Fcγ和Fcε的pH依存性去折叠

较宽的酸碱度/盐分稳定性对于多种工业环境亲合蛋白质纯化法而言,乃是一个先决条件。对极端的酸碱度或盐分环境耐受性较差,可能会产生聚集体或非功能性蛋白。Fcε对各种酸碱度/盐分环境的耐受性对于确定一个适当而可扩展的含IgE/Fcε蛋白质纯化计划是很重要的信息。为了研究酸碱度对于Fcε的二级结构的影响作用,在pH值取4.5至7.4的缓冲液条件下对该蛋白质进行圆二色谱扫描。在pH值取5.2和7.4之间,Fcε的抗体谱都相同:包含一个216与217 nm之间的最小值,表明有重要意义的β折叠和典型的免疫球蛋白IgG结构域。pH值为5时,Fcε抗体谱则向无规卷曲的方向转变(朝200 nm移动最小值);而pH值为4.5时,该抗体谱表示该蛋白质主要呈无规卷曲态 (5)。根据pH依存性去折叠,我们研究表明Fcε在pH 7.0和4.5之间其稳定性降低。

当pH值不同时,热变性由远紫外线圆二色谱进行监测。pH值为7.0时,所有三个结构域(Cε2-4)的去折叠都发生在一个转变中。pH值为6.0时,观测到一个同样的转变,尽管温度明显地下降了1°C。在pH值为5.2时Fcε的热诱导去折叠结果导致一个更宽的转变范围峰值温度下降了6°C。两种转变仅仅在pH值为4.8时才显而易见 (5)。

根据最初的圆二色谱结果,利用微量热差示扫描量热法(DSC)开始对Fcε和Fcγ进行详细的pH依存性的稳定性研究。经研究发现:Fcε和Fcγ的去折叠转变均为不可逆,且依赖于扫描速率(数据未显示),表明不可逆的聚集明显地影响到两种蛋白质的转变温度值(6,7)。不同于利用圆二色谱的测定对象,Fcε经显示在8.0以下的全部pH值测定中均含有两个独立的去折叠转变(见图2A)。其中之一的转变在低酸碱度和高盐分(氯化钠)的条件下变得不稳定,而另一个转变却没有。

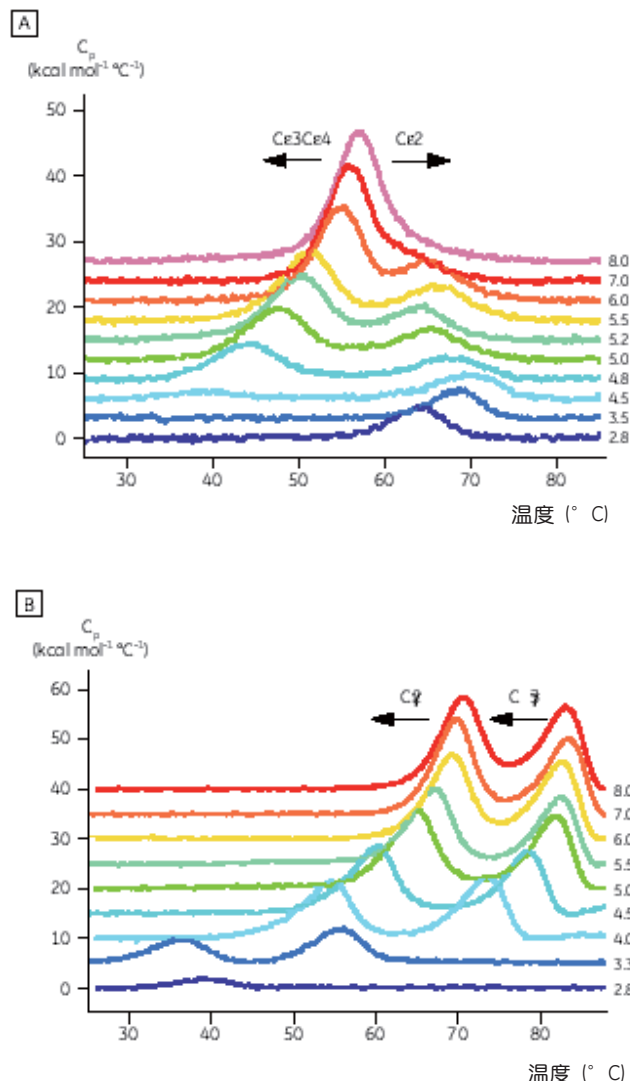


图2. 在15 mM氯化钠的条件下, pH依存性差示扫描量热法 (DSC) 对 (A) Fcε和 (B) Fcγ的扫描结果。获美国生化及分子生物学会准许复印。

根据利用圆二色谱获取的结构数据,涉及对pH值敏感的转变的结构域在pH为4.5的条件下完全去折叠,显示微量热差示扫描量热法(DSC)不仅对于掌握折叠区域的稳定性很重要,而且对其折叠状态也同样重要。经显示,Fcγ(来自IgG1)通过两个单独结构域的转变而发生去折叠;低温转变属于Cγ2结构域,高温转变属于Cγ3结构域(图2B)。Cγ2转变通过去糖基化对其耐热性(未公布的结果)的影响作用而得以鉴别,而Cγ3转变则通过其出奇之高的耐热性(8)来确认。两个Fcγ结构域显示均对pH值和氯化钠敏感。与Fcε不同的是,Fcγ结构域并未实质性地折叠,直至pH值降到3.0以下,说明为什么抗体需要在pH值低于3.5时从蛋白质A介质中洗脱,以及为什么阳离子交换层析法对IgG是一种适宜的纯化技术(图3)。

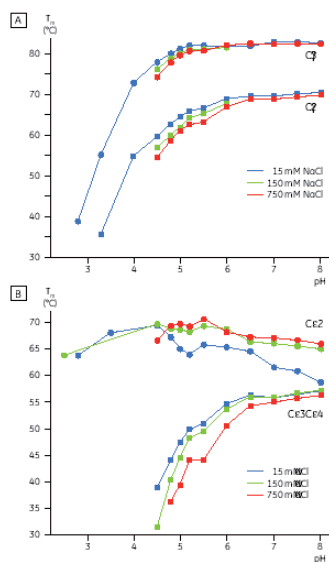


图3.A) Fcγ和 (B) Fcε结构域耐热性的pH依赖性由其温度值所表明。获美国生化及分子生物学会准许复印。

离子强度对于稳定性的影响

在高盐分的情况下，Fcγ的Cγ2、Cγ3结构域以及Fcε的Cε3、Cε4结构域都失去稳定性。我们观察到，相对于介乎5.0、7.0的中间pH值范围的15 mM氯化钠，750 mM氯化钠的T_m值发生了微小的变化（图3A）。这些稳定性的小小差异不太可能对该pH值范围内Fcγ的体外半衰期产生较大的影响，因为Cγ2和Cγ3结构域的温度仍然在60°C以上。借助于微量热差示扫描量热法（DSC）对Fcγ-Cε2融合蛋白质进行试验，对pH值敏感的Fcε结构域被确定为受体结合结构域（Cε3和Cε4）。Fcγ-Cε2和Fcε的结构域在pH值为2.5时仍然是稳固地折叠着（图4）。根据如上所述的试验，可知当pH值低于3.0时Fcγ结构域实质性地展开去折叠了，这确定了Fcε的Cε2结构域作为对pH值不敏感的结构域。这些结果由pH值为4.5的Fcε的有限的蛋白水解结果得以确认（5）。

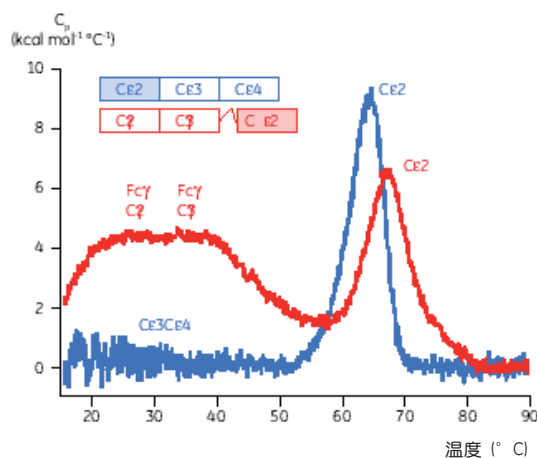


图4. 微量热差示扫描量热法（DSC）对Fcε（蓝线）和Fcγ-Cε2（红线）的扫描图，利用比照pH值为2.5的同一磷酸盐缓冲液的透析样品作参比。差示扫描量热法（DSC）曲线上方的是Fcε和Fcγ-Cε2蛋白质的示意图。获美国生化及分子生物学会准许，复印自（5）。

在高盐分的条件下，Fcε的Cε2结构域具有略好的热稳定性。在比15 mM氯化钠的量测温度高出7°C的条件下，Cε2在中间pH值和750 mM氯化钠溶液中作了特别的稳定化处理（图3B）。相比之下，当5 < pH < 6时，氯化钠有效地对Cε3Cε4结构域去稳定化（图3B）。在低盐分并且pH取值5.0的条件下，Cε3Cε4开始展开。在高盐分条件下，去折叠转变上移0.5个pH值单位，达到pH 5.5，排除了阳离子交换层析作为纯化IgE或含Fcε蛋白质步骤的可行性。

结论

在本研究中，Fcε显示了不寻常的pH敏感性，它会导致比Fcγ观测值高出2个pH值单位（即pH= 5.0）绑定受体的结构域能够去折叠。借助微量热差示扫描量热法（DSC）确定的Fcε的pH值/盐敏感性实验提供了对选择基于IgE蛋白质的纯化策略、装填程序和制剂配方来说很重要的信息，并表明无法用IgG的标准方法进行处理。Fcγ的pH值稳定性数据也意味着在标准的亲和纯化过程（例如最常见的对蛋白A介质的纯化策略）中IgG随时间变化的一个聚集的合理机制，该纯化包括低pH值的洗脱和保持步骤。

鸣谢

本应用指南由加州圣地亚哥Biogen Idec的Stephen Demarest博士友情提供。

参考文献

1. Zhu, D. et al. A novel human immunoglobulin Fcγ Fcε bifunctional fusion protein inhibits FcεRI-mediated degranulation. *Nature Med.* **8**, 518–521 (2002).
2. Zhu, D. et al. A chimeric human-cat fusion protein blocks cat-induced allergy. *Nature Med.* **11**, 446–449 (2005).
3. Belostotsky, R. and Lorberbaum-Galski, H. Utilizing Fcε-Bak chimeric protein for studying IgE-FcεRI interactions. *Clin. Immunol.* **110**, 89–99 (2004).
4. Gould, H.J. et al. The biology of IgE and the basis of allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 79–628 (2003).
5. Demarest, S.J. et al. An intermediate pH unfolding transition abrogates the ability of IgE to interact with its high affinity receptor FcεRIα. *J. Biol. Chem.* **281**, 30755–30767 (2006).
6. Sánchez-Ruiz, J.M. et al. Differential scanning calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin. *Biochemistry* **27**, 1648–1652 (1988).
7. Vermeer, A.W. and Noide, W. The thermal stability of immunoglobulin: unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys. J.* **78**, 394–404 (2000).
8. Demarest, S.J. et al. Optimization of the antibody C_H3 domain by residue frequency analysis of IgG sequences. *J. Mol. Biol.* **335**, 41–48 (2004).

微量热ITC和DSC技术在生物制剂研发中的应用

J.M.Woods, M.Puri, D.Doucet, T.Derrick, S.Morar-Mitrica和D.Nesta

Biopharmaceutical Technologies, GlaxoSmithKline R&D, 709 Swedeland Rd, King of Prussia, PA 19406 (USA)

摘要

使液体制剂中蛋白药物稳定的一个重要因素是适当的辅料（赋型剂）的添加，适宜的辅料浓度能够在延长药物保质期的同时确保患者的最高的用药安全。尽管过去十年间有许多文献报道了维持稳定性的一般准则，但是对于在存储期间辅料能如何提升蛋白药物的稳定性，其机制尚未完全明晰。为能合理优化蛋白药物的制剂，掌握有关蛋白质-辅料相互作用机理的知识十分重要。通过微量热研究技术来研究蛋白质-辅料间的相互作用，目前已被越来越多的应用于生物药物制剂的研发和优化过程中。通过使用微量热等温滴定量热仪（ITC）和微量热差示扫描量热仪（DSC）等技术，我们可以评估与相互作用有关的热力学参数，例如辅料-蛋白质的结合强弱，在辅料加入的情况下蛋白质去折叠的情况等，从而揭示研发最优制剂所需的重要机理信息。

这里我们列举两个ITC和DSC是怎样辅助蛋白药物制剂研发的实例。在第一个实例中，使用ITC揭示了聚山梨糖醇80（常用的表面活性剂，通过降低蛋白质的表面吸附和聚集以稳定蛋白性质）与蛋白质X（ProX）之间的相互作用。

使用单位点模型拟合ITC数据计算得出结合的亲和常数(K_A)= $1430 \pm 260 \text{ M}^{-1}$ ，结合焓 (ΔH)= $-6.3 \pm 1.1 \text{ kcal/mol}$ ，每个ProX分子结合位点数 (n)= 2.6 ± 0.3 。另外一个实例中，使用DSC和ITC产生的数据显示在抗菌防腐剂-苯酚存在的条件下，ProX在pH5.7时结构最稳定。因而在上述两个研究中，微量热技术探寻制备ProX最佳制剂方法方面提供了十分重要的信息。

简介

由于蛋白质内在的不稳定性，包括物理不稳定性（去折叠、聚集、吸附）和化学降解性（氧化、脱酰胺、分裂），以基于蛋白质的治疗药物的发展面临着巨大的挑战。蛋白质的不稳定可以导致蛋白质活性降低甚至可能产生潜在的免疫原性。为增加蛋白质的稳定性，可以尝试改变蛋白质所在溶剂的性质，包括选择缓冲液系统，调节pH值，添加辅料/添加剂，即研发最佳剂型。

选择适当的辅料并优化辅料浓度是蛋白质药物的制剂稳定性的一个重要因素，可以增加用药的安全性并延长药物的保质期。因而蛋白质药物制剂研发的一个重要环节是辅料的选择，它需满足以下条件：合适的溶解度，无毒，可维持蛋白质结构的完整，保证较长的保质期，以及保持产品的生物活性。这样的辅料包括氨基酸、盐、金属、表面活性剂、糖，多羟基化合物和聚合物。这些物质可作为稳定剂、表面活性剂、抗菌防腐剂或抗氧化剂。辅料的稳定作用通常是蛋白质的特异性并呈现浓度依赖性。在辅料选择环节，不仅要进行辅料浓度的优化，也要了解各种制剂组分间的相互作用。每种辅料的选择和辅料浓度的优化需要进行大量的制剂筛选和稳定性研究，是十分费时费力的工作。过去十年间文献报道了维持稳定性的一般准则(1)，但是在存储期间辅料是如何提升蛋白质药物的稳定性，其机制尚未完全明晰。了解辅料与蛋白质间的相互作用的机理，可以减少纯经验的筛选方法，从而理性研发和优化蛋白质药物制剂，减少蛋白质药物研发过程中的时间消耗和材料损耗。另外，掌握蛋白质-辅料间的相互作用的强度及种类的信息有助于预测蛋白药物在体内的表现。生物物理学分析技术在制剂研发的辅料筛选中发挥极其重要的作用。特别是微量热仪，被视为评估蛋白质稳定性和相互作用的最有效方法之一，其允许系统完全的热力学表征，检测过程的可逆性。微量热研究用于探索蛋白质-辅料间的相互作用，该相互作用已经越来越多的用于生物制剂的研发和优化。微量热仪的工作原理是通过检测结合、解离和/或去折叠过程中热能的改变，从而确定大分子相互作用的热力学和化学计量学。ITC主要用于确定热力学结合参数，例如结合亲和常数和解离常数，以及化学计量学，包括焓、熵以及等温条件下的吉布斯自由能。它也被用于在一定温度范围内的实验中确定结合过程的热容量改变。DSC数据提供蛋白去折叠过程的热力学参数，包括中点去折叠温度，焓，熵，吉布斯自由能以及去折叠过程的热容量改变。这些热力学参数常用于比较不同制剂中蛋白质的稳定性或确定特定辅料的相对稳定或不稳定的效果。本应用指南展示微量热仪如何通过探知辅料-蛋白质间的相互作用，辅助ProX制剂研发的一个例子。在这里将聚山梨糖醇80和苯酚作为ProX制剂缓冲液的可能的添加剂进行检测。聚山梨糖醇80是一种常用表面活性剂，可以用来预防蛋白质的非特异性吸附和聚集，之前的研究已经显示其与蛋白质的相互作用(2, 3)。它与暴露于蛋白分子表面的疏水区结合以阻止蛋白发生表面聚集(3)。

聚山梨糖醇80最常用量为0.002-0.1% (w/v)。苯酚作为制剂的抗菌防腐剂常需多次投放。苯酚有一定毒性，因而在制剂缓冲液中的使用应保证使用最小浓度。最常用量为0.3-0.5% (v/v)。

材料和方法

微量热差示扫描量热仪

实验使用MicroCal VP-Capillary DSC。取400μl不同样品及其匹配缓冲液置于96孔板中，样品在25°C-100°C条件下扫描，扫描速率为每小时60°C，每次扫描前平衡15分钟。数据通过Origin（第7版）软件进行分析，预先扣除缓冲液背景并校正扫描蛋白质的浓度。

微量热等温滴定量热仪

实验使用的仪器为MicroCal iTC200。在样品测量池中添加250μl浓度为10或25mg/ml的ProX。滴定注射器中预装40μl分别含有60mM苯酚或50mM聚山梨糖醇80的同样的ProX缓冲液。参比测量池中添加去离子水。每次实验中40μl滴定液以每秒0.5μl的速度注入样品池，每次体积为0.2-2μl。仪器所用设置如下：拌速度1000rpm，参考能量为每秒5-8μCal，信号响应模式设置为高，温度为25°C，初始延迟60秒。每次实验需扣除对照组缓冲液、滴定稀释度及ProX稀稀释度。ITC数据由Origin（第7版）软件分析。每种蛋白质样品透析所用缓冲液应与辅料溶液相同，以确保注射器和测量池中的缓冲液匹配。

结果与讨论

辅料与药品中活性成分发生直接结合可对该产品造成多方面的影响。最新研究表明药剂中一些常用辅料可能影响药物活性成分的药代动力学(4, 5)。辅料也可能改变蛋白药物的结构或生物学活性，导致药效的改变。除了在药代动力学方面或活性成分效力可能的改变，辅料/蛋白质间的相互作用也可改变保质期或药物的使用安全性。因此我们亟需认识掌握蛋白质与药剂辅料间的相互作用。如果可以检测出蛋白质和溶液辅料的直接作用（即可测定的结合），则应在蛋白药物制剂开发中考虑以下两个重要因素：第一，辅料与蛋白结合的结合强弱和可逆性，因为临床用药后这种结合可能阻碍或完全遮挡药物蛋白表面的某个重要活性位点；第二，未结合辅料的浓度，应足以满足所需溶液特性。下面将以ProX为例分别进行阐述。

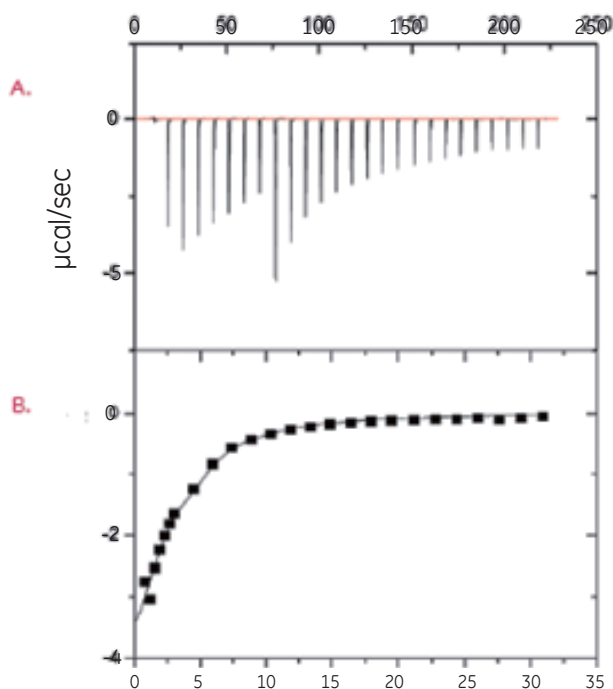


图1.(A) ITC检测的的差示能 ($\mu\text{cal/sec}$) vs 50mM聚山梨糖醇80滴入25 mg/ml ProX的时间。第9-12次注射体积较第1-8次注射多3.8倍。(B) 显示A部分注射物每次注射时的热量值

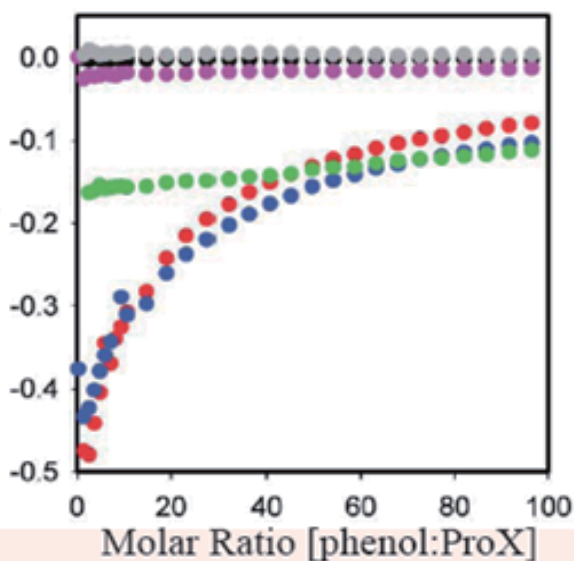


图2.使用ITC检测的每次注射热量vs苯酚摩尔比: 将浓度为60mM苯酚滴定到浓度为10mg/ml ProX中, 制剂缓冲液pH值分别为5.7 (红)、4.5(蓝)、3.5 (绿), 扣除对照组缓冲液背景/缓冲液 (黑), 苯酚稀释(粉红), ProX稀释 (灰)

ProX与聚山梨糖醇80的相互作用

图1显示了50mM聚山梨糖醇80注入25mg/ml ProX的ITC试验结果。原始数据见panel (A)。已扣除背景的每次注射结合热见panel B。Panel B数据表明聚山梨酯80与ProX之间存在可测量的相互作用。数据经单结合位点模型拟合计算得结合亲和常数 (K_A) = $1430 \pm 260 \text{ M}^{-1}$, 结合焓 (ΔH) = $-6.3 \pm 1.1 \text{ kcal/mol}$, 每个ProX分子结合位点数 (n) = 2.6 ± 0.3 。结合熵变 (ΔS) 为 $-6.7 \pm 3.7 \text{ cal/mol-K}$ 。由图1等温线可知, 当聚山梨糖醇80与ProX分子摩尔比接近10时, ProX上的聚山梨糖醇80结合位点饱和。聚山梨酯80在纯水中的临界胶束浓度 (CMC) 为0.012mM, 在蛋白溶液中则高达0.1mM (2)。图1所示ITC实验中聚山梨酯80浓度范围为0.1-7mM, 在第一次注射后其浓度便超过其CMC值。这是该实验的一个要点因为任何一个可测的相互作用, 蛋白都与表面活性剂的胶束结合而非单体。

在剂型研发中, 掌握结合参数相关知识可以帮助我们选取足以“饱和”并稳定蛋白质的最低结合辅料浓度。将药剂中辅料的浓度降到最小不仅可以降低成本, 而且能够减少患者服用添加剂的量。在这个特定案例研究中, 10倍于蛋白分子的聚山梨糖醇80即足以饱和此蛋白。另外, 了解结合参数也可以预测蛋白-辅料复合物的体内表现。ITC测出的结合常数偏小, 意味着药物进入体内经血液稀释后, ProX/聚山梨糖醇80复合物将解聚, 从而不影响蛋白药物的生物学活性。

ProX与苯酚的相互作用

苯酚用作ProX制剂的抗菌防腐剂。在这里我们使用ITC评估蛋白质与防腐剂间任何可测量结合的热力学。图2标记出60mM苯酚注入10mg/ml ProX时不同摩尔比下每次注射的热量, 缓冲液pH值分别为5.7, 4.5, 3.5, 图中数据均已扣除背景。ITC数据显示ProX在pH5.7和4.5时可与苯酚相互作用, 在pH3.5时无作用。由于结合反应复杂且往往有多位点参与, 故结果曲线无法适用于预定义的结合模型。

图3显示DSC显示1mg/ml ProX的热容量曲线, 所用缓冲液与ITC实验相同。相应的DSC数据显示, 在pH5.7且不存在苯酚的条件下, ProX在中点转换温度 T_{m1} , T_{m2} , T_{m3} 分别为59°C, 68°C, 85°C时, 即至少发生三次构象转换。中点转换体现出主要的构象去折叠。总去折叠焓 (ΔH_{unf}) 为270kcal/mol。在pH4.5时, 检测不到第一次转换, 主要构象改变的 T_{m2} 为55°C, T_{m3} 降低为73°C。 ΔH_{unf} 降低到216kcal/mol, 表示第三次相互作用力减弱。最终在pH3.5时, DSC检测不出任何明显的去折叠转换, 证明ProX是在酸性条件下的构象是完全去折叠的。

图3还显示DSC检测ProX在pH5.7并添加苯酚的缓冲液中构象打开的热谱图。苯酚增加 T_{m1} 1 °C, 增加 T_{m2} 2 °C, 降低 ΔH_{unf} 至195kcal/mol。但是存在或不存在苯酚时不改变ProX的三级结构（经生物物理表征数据测定如荧光检测，数据未显示）。总之，在蛋白结构的检测方面DSC与其他检测方法结果一致。但是DSC与其他检测方法所得的结果并非总一致。DSC显示出变化是由于维系天然蛋白结构稳定的力遭到破坏（例如范德华力，疏水力和静电作用力，疏水键等），以及暴露残基的水合作用。蛋白三级作用不稳定可以降低蛋白结构的紧密度，DSC可以在蛋白结构未发生改变时检测出来，在这方面其它方法是无法检测到的。

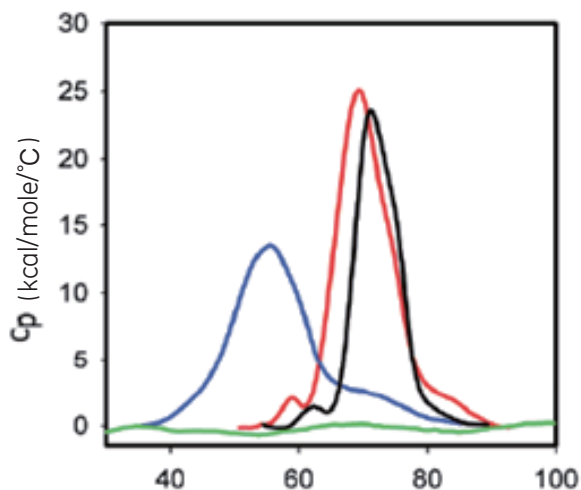


图3. 1mg/ml ProX 在不同制剂缓冲液中的热容量vs温度曲线（DSC检测）。缓冲液含有0.005% (v/v) 苯酚，pH5.7（黑），不含苯酚pH5.7（红），pH4.5（蓝），pH3.5（绿）。数据为扣除缓冲液背景/缓冲液扫描和转换之前及之后的基线。

ITC和DSC数据相结合揭示了苯酚-蛋白质间相互作用的重要信息。第一，苯酚可与折叠的ProX结合，无法与打开构象的ProX结合（图2）。由此可知ProX只有具备完整的三级结构，才有可与苯酚结合的位点。第二，由于蛋白功能需要其具备完整的三级结构，因而pH5.7被视为制剂的最优pH值。第三，如图2所示，在苯酚与ProX摩尔比高于50时，两者的结合完全饱和。第四，DSC检测（1mg/ml ProX，缓冲液pH5.7，含0.005% (v/v) 苯酚）得知，苯酚与ProX摩尔比定为38时，两者的结合接近但不完全饱和。第五，虽然上述摩尔比未能完全饱和结合位点，但足以增加ProX的热稳定性。

结论

ITC和DSC结果表明苯酚在pH5.7时结合折叠的ProX，聚山梨糖醇80也可与ProX结合，并揭示了其间的热力学特性。通过测定ProX与聚山梨糖醇80的结合常数，可知两者的相互作用力较弱。并由此预测在体内环境下，活性蛋白可以从稳定的辅料上解离，这意味着辅料对蛋白药物所有生物学功效的影响极小。基于ProX-苯酚滴定饱和曲线，为生产出抗菌能力强及热稳定性好的制剂，应选用高于饱和点的苯酚浓度。ITC和DSC的使用不仅能够确证辅料的结合，而且能够确定这两种辅料的最佳浓度（高于CMC的浓度并10倍ProX分子的聚山梨糖醇80；50倍ProX分子的苯酚）。

蛋白质产品制剂的生产要求安全与高效并存。添加合适的辅料可以达到安全有效的蛋白治疗药物，并增加产品的稳定性及保质期，这就需要我们了解蛋白质与辅料在分子水平的相互作用的知识。ITC和DSC的使用能向我们表征复杂蛋白质制剂中多种相互作用之一的蛋白质-辅料间的结合。

结晶实验中使用AKTExpress™进行人源化WO-2 Fab的多步骤纯化

L. Pearce¹, R. J. Hosse², J. Simon³, and O. Dolezal¹

¹ CSIRO Molecular Science and Engineering, Melbourne, Australia

² Roche Glycart AG, Schlieren, Switzerland

³ GE Healthcare, Uppsala, Sweden

ÄKTExpress 是一个适合自动纯化从大肠杆菌裂解物中得到的低表达的组氨酸标签蛋白的色谱系统。一个纯化法设计整合4种层析技术（亲和、脱盐、离子交换和凝胶过滤[尺寸排阻色谱法]），无需操作员干预。由此产生的蛋白质，人源化的WO-2 Fab 抗体片段，一天时间内就可以高度纯化，随后结晶过夜。这些结果表明，使用ÄKTExpress 将单个纯化方法纳入多步色谱技术，可以简化蛋白质纯化步骤。我们可以减少我们的蛋白质生产流程中的瓶颈，并在两天内将大肠杆菌裂解物中的蛋白质转换成蛋白质晶体。

介绍

阿尔茨海默氏症是老年痴呆症的最常见的形式。 β -淀粉样蛋白(A β)肽(氨基酸39-43)由淀粉样蛋白前体裂解产生，是淀粉样蛋白斑(1)的主要组成部分之一，因此也是阿尔茨海默氏病的免疫治疗的有效靶点。小鼠单克隆抗体，WO-2 (mWO-2 IgG) 与免疫抗原A β 肽(3EFRH6)结合。小鼠抗体片段(mWO-2 scFv 和 mWO-2 Fab)来自mWO-2 IgG 并与A β 肽(3EFRH6)抗原抗体结合，并在体外抑制纤维的形成和分解已沉积的淀粉样纤维(2)。为了克服潜在的人抗鼠抗体(HAMA)反应——HAMA 通常会妨害鼠抗体的药物治疗作用，我们设计了人源化的WO-2 Fab (hWO-2 Fab)。hWO-2 Fab 片段在大肠杆菌中表达，使用ÄKTExpress 进行多步纯化后结晶，解决了蛋白质结构(3)。与mWO-2类似，hWO-2 Fab 成功地抑制了淀粉样纤维的形成和分解已沉积的淀粉样纤维，是一种很好的阿尔茨海默氏病治疗药物。

材料和方法

基因结构、蛋白表达和纯化

为了构建人源化的WO-2 Fab，鼠源性WO-2 IgG 抗体的互补决定区(CDR)被嫁接到最匹配的人类生殖序列(VH, IGHV2-5*09 和 VL, IGK2-28*01)。在以前建造的大肠杆菌表达载体pGC-Fab 中，人源化合成的VH 和VL基因与相应的人类重链(CH1)和轻链(CL)基因片段融合，分别在CH1 和CL 的C-末端编码六组氨酸和FLAG™ (Sigma-Aldrich)的纯化标签(2)。如前所述，产物hWO-2 Fab 在大肠杆菌TOP10F' 细胞中表达(3)。使用冰冷的1×TES 缓冲液

(200mM 的Tris-HCl, pH 值8.0, 0.5mM的EDTA 和500mM的蔗糖)和0.2×TES 缓冲液从颗粒性大肠杆菌细胞中连续提取周质提取物(4)。周质提取物通过离心(4℃ 30分钟, 48 400×G)和0.45μm 滤膜过滤后澄清。上样前将咪唑(20mM)加入到裂解液中。

利用空气感应器启用ÄKTExpress 上样功能; 使用一种自动化的、整合四种不同层析步骤的方法进行纯化，从10L 升大肠杆菌培养液中纯化得到共900ml 的周质裂解液。

A) 亲和力IMAC

层析柱HisTrap™ FF crude, 5ml

结合缓冲液20mM 磷酸钠, 500mM 氯化钠, 20mM 咪唑, pH 7.4

洗脱缓冲液20mM 磷酸钠, 500mM 氯化钠, 500mM 咪唑, pH 7.4

流速5ml/min

梯度分级梯度, 50%、10CV 洗脱缓冲液

B) 脱盐DS

层析柱HiPrep™ 26/10 Desalting, 53ml

结合缓冲液20mM 醋酸钠, 20mM 氯化钠, pH 5.5

流速10ml/min

D) 凝胶过滤GF

层析柱HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200pg, 120ml

洗脱缓冲液1×PBS, pH 7.4, (50mM Tris-HCl, 150mM 氯化钠, pH 7.4)

流速1.5ml/min

胶块2ml

C) 离子交换色谱法(IEX)

层析柱HiTrap™ SP HP, 1ml

结合缓冲液20mM 醋酸钠, 20mM 氯化钠, pH 5.5

洗脱缓冲液20mM 醋酸钠, 1M 氯化钠, pH 5.5

流速1ml/min

梯度线性梯度, 0%-10%、50CV 洗脱缓冲液

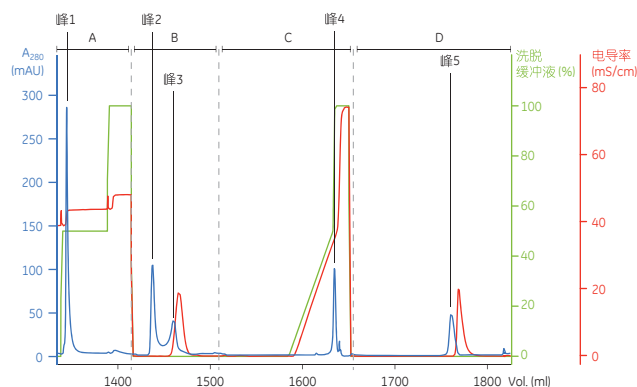


图1. hWO-2 Fab 的自动化四步纯化。四个纯化步骤分别为: A) IMAC, B) DS, C) IEX, 和 D) GF。5个目的峰如图所示，在结果和讨论部分进行描述。



图2. ÄKTAexpress 纯化后hWO-2 Fab 的典型结晶，使用20% PEG 3350 和 0.2M 硫酸钠进行结晶。

结果与讨论

在ÄKTAexpress 上进行纯化

为了纯化hWO-2 Fab，制备含重组蛋白的大肠杆菌细胞周质裂解液，直接上样到一个5ml的HisTrap FF crude 柱，通过固定金属亲和层析（IMAC）从污染的大肠杆菌蛋白中捕获hWO-2 Fab（图1）。清洗后，用分级梯度的250mM的咪唑洗脱捕获蛋白质，峰1（3.5ml，从峰前缘UV₂₈₀>50MAU下降，截止峰后缘>100MAU）收集到毛细血管样1。自动选择的峰值（最大）进入下一层析步骤（中间脱盐步骤），使用HiPrep 26/10Desalting 将缓冲液与pH 值为5.5的20mM 醋酸钠和20mMNaCl 交换，峰2 时回收（8.4ml，UV₂₈₀>20MAU）到毛细血管样2 和3。脱盐阶段的第二个峰（峰3）对应的分子量低于5000的降解产品。

将脱盐的hWO-2 Fab (pI 8.0) 进一步纯化加入HiTrap SP HP 1ml阳离子交换柱中，然后在梯度为超过0% 至50% 下使用50 多个柱体积（峰4；3.2ml；UV₂₈₀>30MAU）的20mM 醋酸钠、1M 氯化钠（pH 5.5）进行离子交换。峰被自动注入到HiLoad16/600Superdex200pg凝胶过滤柱，作为最终的精细纯化步骤。组分（峰5，UV₂₈₀>20MAU）被收集到96 孔微分收集板中贮存。hWO-2Fab 的产量确定为1.15mg(7.3ml at 0.16Mg/ml)。

结晶研究

使用Ultrafree™离心机(MWCO 10000，Millipore 公司) 将蛋白质浓缩至4mg/ml 以用于结晶研究。在联邦科学与工业研究组织合作的结晶中心（www.csiro.au/c3/）进行结晶。h-WO2 Fab 的典型晶体如图2 所示。最大尺寸为300μm。从生长在20% 聚乙二醇3350 和0.2Mol 硫酸钠中晶体中收集数据。晶体在聚乙二醇1500 与其他盐类中也会生长。所有晶体都生长在293K、SD-2 沉滴板（IDE X 公司, Santa Rosa, 美国）。液滴由150nl 蛋白和相当于50μL 结晶贮存液的150nl 结晶组成。在Australian Synchrotron 解决hWO-2 Fab 的结构，原子分辨率为0.22nm（PDB: 3AAZ）。

结论

ÄKTAexpress 色谱系统适合开发自动化的多步法，用来纯化大肠杆菌裂解液中低表达的重组标签蛋白。使用多步法可以对用于结晶研究的纯化蛋白质的质量提供更好的控制和可重复性。hWO-2 Fab 的最终产量是1.15mg，量虽然低（培养液0.1Mg/l）但是纯度高，并保留功能获刑。随后蛋白质过夜结晶。使用ÄKTAexpress 两天内就能将蛋白裂解液变为蛋白质晶体。

参考文献

1. Kang, J. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloidA4 protein resembles a cell-surface receptor. Nature 325,733-736 (1987).
2. Robert, R. et al. Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers. Protein Eng. Des. Sel. 22(3), 199-208 (2009).
3. Robert, R. et al. Germline humanization of aMurine Aβ antibody and crystal structure of the humanized recombinant Fab fragment. Protein Science 19, 299-308 (2010).
4. Instructions: Recombinant Phage SelectionModule, GE Healthcare, 27-9403-01, Edition AD (2003).

订购信息

产品	货号
ÄKTAexpress Single chromatography system	28-9089-36
HisTrap FF crude, 5 × 5ml*	17-5286-01
HiPrep 26/10 Desalting column, 1 × 53ml	17-5087-01
HiTrap SP HP, 5 × 1ml	17-1151-01
HiLoad 16/600 Superdex 200pg, 1 × 120ml	28-9893-35

从大肠杆菌获得重组胰岛素原的高通量筛选与工艺开发

本“应用指南”描述了在大肠杆菌中表达的重组胰岛素原从PreDicator™板筛选到400 mL中试级的完整纯化工艺开发流程。采用PreDicator 96孔预装过滤板、Assist软件和装填了1 mL填料的Tricorn™ 5/50层析柱来探索捕获阶段的最佳条件。高通量筛选迅速减少了候选层析填料类型，并为进一步研究所需的结合及洗脱条件提供了建议。当捕获阶段条件经过进一步优化和验证后，纯化规模被扩大400倍。放大平稳且可预测，最终目标产物的回收率和纯度分别达到96%和82%。此外，与柱层析法相比较，PreDicator板的筛选还节省了相当多的时间和样品。第二项研究（1）描述了胰岛素原经酶解获得的胰岛素的中度纯类似工艺流程。

引言

在工艺开发过程中引入高通量方法能提高效率。减少下游纯化开发步骤所需的时间和样品用量，就可使收益有所提高。如今，GE Healthcare Life Sciences提供了多种产品来提升工艺开发的效率。

PreDicator 96孔板（预装填BioProcess™层析填料）适用于纯化条件和填料的高效、高通量初次筛选。Assist软件简化了实验设置以及数据管理和评估的过程。

筛选设定的条件随后可用HiTrap™或HiScreen™预装层析柱进行验证和优化。带有缓冲液制备和DoE（实验设计）支持功能的AKTA™ avant 25层析系统，简化了在层析柱上的优化，并可通过如HiScale™16/40的层析柱，将工艺放大到中试级水平。采用AKTA avant 150系统和AxiChrom™层析柱，规模还可进一步的放大。

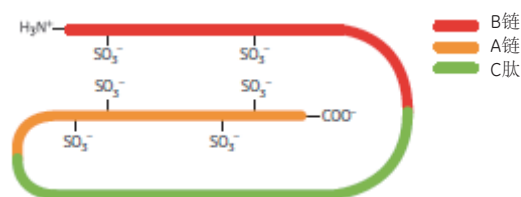


图1. 胰岛素原分子简图

本应用指南描述了通用电气医疗集团的工艺开发平台，目的是探索一种捕获重组胰岛素原的稳健方法（图1）。PreDicator板和Assist软件用于确定适用于捕获阶段的层析填料类型及可能的结合和洗脱条件（2）。根据筛选结果，Capto™ MMC（一种多模式阳离子交换填料）能够直接与不经稀释的样品结合，被选为最有希望的填料。以筛选实验中发现的结合及洗脱条件为起点，在装填了1 mL填料的Tricorn 5/50柱上进行了捕获步骤的优化。稳健的捕获方案一旦建立，工艺可从Tricorn放大到HiScreen预装填柱。进一步成功地以Capto MMC装填的HiScale 16/40柱（柱床高度20 cm）再最终放大到AxiChrom 50/300柱（柱床高度19.5 cm，装填柱的床体积400 ml）。

材料和方法

用PreDictor板筛选

只要可能，PreDictor板的实验可以采用全自动方案在Tecan™Freedom EVO™-2 200 Robotic系统上完成。样品处理之类更为复杂的方案则手动执行。整个实验的液体除去工作都是通过抽真空或离心完成。所有实验采用大肠杆菌表达的胰岛素原。该样品由巴西的贝洛哈里桑塔市的BIOMM公司供货。胰岛素原溶液在亚硫酸分解的作用下防止二硫键的形成。该悬浊液中含有8 M的尿素，在重组的胰岛素原中浓度大约为10 mg/mL，而在全部蛋白中则为18 mg/mL。样品的电导约为14 mS/cm。PreDictor实验按图2的解说步骤进行。实验步骤可详见参考文献之3。实验的条件“实验结果与讨论”中可见。

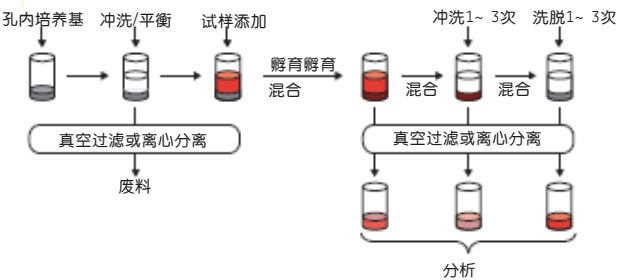


图2. PreDictor板孔内批实验工艺流程简图。在柱实验中采用同样的步骤，即平衡、样品添加、清洗和洗脱。试孔内的灰色部分是层析填料；红色（红色和粉红色）描述蛋白质溶液的不同浓度。棕色是结合了样品的填料。

分析

在PreDictor的结合实验中，载量是通过分析流穿组分来测量的。在洗脱实验中，对首次洗脱的组分进行了评估。所有实验都对初始样本进行了分析。所有分析通过阴离子交换层析Mono Q™5/50 GL柱完成（图3）。

层析柱：Mono Q 5/50 GL (1 mL)
试样：利用已冲洗注射液注入25 μ L的试样
缓冲液A：100 mM的盐酸，1 mM的依地酸钠，在8 M尿素中的pH值为2.5
缓冲液B：缓冲液A + 1 M的氯化钠
流速：1 mL/min
洗脱：步骤1，0%的B，4倍柱床体积
步骤2，16%的B，3倍柱床体积
步骤3，26%的B，3倍柱床体积，线性渐变到50%的B，3倍柱床体积；
步骤4，对4倍柱床体积采用100%的B，对4倍柱床体积采用0%的B
实验系统：AKTAmicro™
探测：280 nmUV-1监测

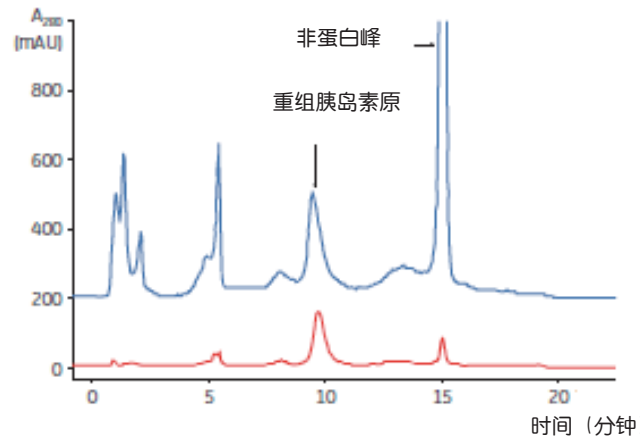


图3.粗样（蓝色曲线）和洗脱部分（红色曲线）的叠加分析色谱图。胰岛素原浓度是通过对9~ 10分钟滞留时间洗脱峰求积分，并通过其表面积与粗样表面积的比例关系而测定的：
浓度试样 = 浓度未加工样本 $\times$ 峰面积试样/峰面积未加工样本
每种条件下流穿或第一次洗脱组分的胰岛素原浓度数据被带入Assist软件中，生成实验评估的响应曲面图。

层析柱实验

层析柱实验包括优化、动态结合载量实验、稳健性实验和规模放大。采用Capto MMC多模式填料在适和柱尺寸的层析系统上来完成。表1概要地列出了这些实验的层析柱、系统、试样和纯化条件。

表1.工艺开发中Capto MMC层析柱实验的摘要信息

实验	层析柱	Vc (mL)	系统	结合缓冲液*	试样量 (mL)	流速 (mL/分)
动态结合载量	Tricorn 5/50	1	AKTAmicro	A+150 mM 氯化钠	10	0.2
洗脱优化	Tricorn 5/50	1	AKTA avant 25	A+150 mM 氯化钠	2.5	0.2
稳健性实验	Tricorn 5/50	1	AKTA avant 25	A+150 mM 氯化钠	2.5	0.2
规模放大2 $\times$	HiScreen 4.7/10	9.4	AKTA avant 25	A+150 mM 氯化钠	24	1.9
	HiScale 16/40	40	AKTA avant 150	A+150 mM 氯化钠	100	8
	AxiChrom 50/300	400	AKTA avant 150	A+150 mM 氯化钠	960	80

*缓冲液A: 100 mM的盐酸，1 mM的依地酸钠，在8 M尿素中的pH值为2.5

所有的洗脱缓冲液均含有在8 M的尿素，全部实验仪器均用1 M的氢氧化钠在线清洗（CIP）然后储存在20%的乙醇中。在280、405和260 nm处进行检测。在初期洗脱实验中采用了盐/pH梯度，而在优化、稳健性和规模放大的实验中采用步阶洗脱方式。如同PreDicator实验中一样，样品分析按前面所述的Mono Q法进行。

实验结果和讨论

结合的筛选实验

通过结合实验对离子交换和多模式填料进行筛选。PreDicator板含有2 μ L或6 μ L的SP Sepharose™Fast Flow、Capto S、Capto MMC (2)。

通过在小体积填料（2 μ L和6 μ L）中加入过量的含有8 M尿素缓冲液的样品（200 μ L溶液，浓度2.5 mg/ml，相对于每个试孔的胰岛素原）进行结合研究，而实验所用到的粗样不超过15mL。对结合缓冲液的初始盐浓度和pH值经过研究了。表2概述了每种填料的实验条件。

表2.PreDicator板结合实验中填料和参数的摘要信息

实验	因素1	因素2
结合实验--CIEX筛选培养板	PH	氯化钠
Capto S, 2 μ L	3.4-5.0	0-300
Capto MMC, 6 μ L		
SP Sepharose Fast Flow, 6 μ L		
结合实验--Capto MMC, 6 μ L	3.0-7.0	0-300

在所有的结合实验中，采集和分析了流穿组分。通过与初始样本中未结合的胰岛素原相比较，表明了在这种条件下的结合能力。由Assist软件生成的所有填料的响应曲面图在图4中显示。

Capto S和SP Sepharose Fast Flow在低pH值（即3.4）且不含盐条件下的具有高结合能力。相比于其它两种填料，Capto MMC可在150 mM盐浓度和更高的pH值条件下结合。因为融合蛋白的初始样品具有接近的150 mM NaCl离子强度，所以该盐浓度下的高结合能力是Capto MMC一个优点。

于是，二次结合实验采用了Capto MMC和更宽的参数区间，意在揭示该填料的最佳结合条件。如图5的结果所示，当pH值等于5（或刚超过）以及氯化钠浓度为0~160 mM时，胰岛素原与Capto MMC达到最高的结合力（红色/橙色区）。决定继续采用Capto MMC并研究洗脱条件。

Capto MMC

结合力[液流/液流；有调节] (μ g/ μ L)

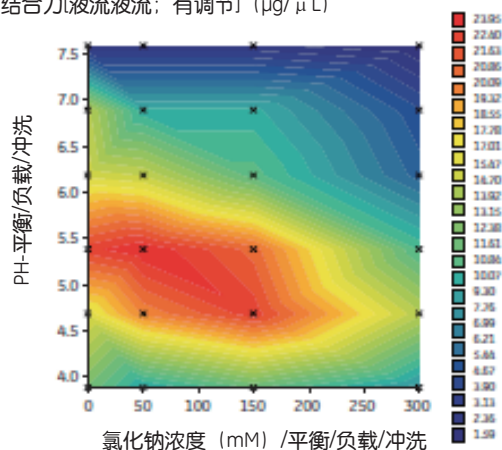


图5. 在Capto MMC上胰岛素原的结合响应曲面图是氯化钠浓度（0~300 mM）和缓冲液pH值（4~7.5）的函数。Assist软件用于数据可视化。

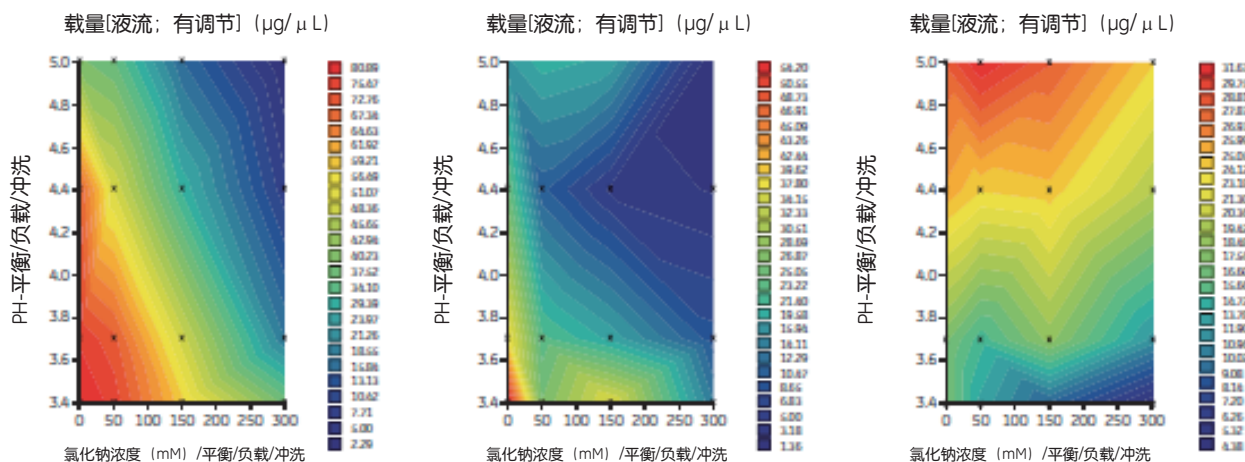


图4.与氯化钠浓度（x轴）和缓冲液pH值（y轴）相关的，分别针对SP Sepharose Fast Flow、Capto S和Capto MMC，由Assist软件生成的胰岛素原结合载量响应曲面图。所实现的载量范围在每个图的右边显示。黑十字表示内插结果之间的实际数据。

洗脱的筛选实验

具有50 μ LCapto MMC填料的PreDictor板被用于洗脱实验研究。为了却保有足够的上样量来检测目标分子，而不至于该填料超载。在上样步骤中用到的蛋白量为填料70%的载量，通过结合实验估计，即180 μ l的样品，相对于胰岛素原的浓度为5 mg/ml。洗脱实验是利用多种洗脱液组成：pH值为3.7~ 7.6和150~ 1000 mM的氯化钠。其评估过程同结合实验一样，但现在分析第一个洗脱组分。结果表明了在随后的层析柱验证工作中洗脱所需的条件。因为只分析第一个洗脱组分，所以我们无法期望在这一步能达到全收获率。实现的最高收获率达70%，pH值为7.5，氯化钠浓度超过600 mM（图6）。

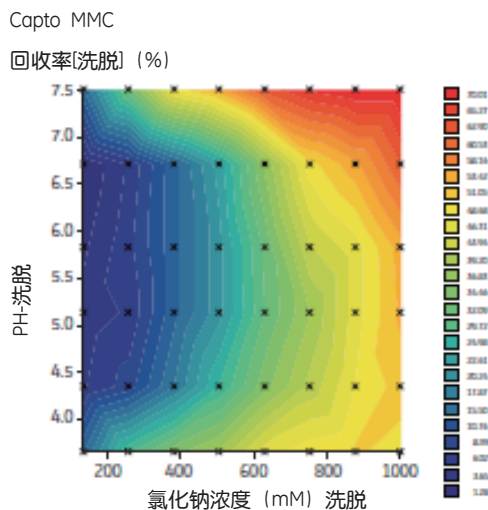


图6. 在Capto MMC上的胰岛素原洗脱，为氯化钠浓度（150~ 1000 mM）和缓冲液pH值（4~ 7.5）的函数。采集这些数据时使用了Assist软件。

在AKTA avant 25 上的Tricorn层析柱优化

在PreDictor板的高通量筛选实验结果显示，胰岛素原捕获的最佳条件为在Capto MMC上以pH 5和50~ 150mM的氯化钠浓度结合，随后在大于7的pH值和600mM以上的氯化钠浓度下进行洗脱。在DoE(实验设计)方案中将这此参数作为因子添加，通过装填了1 mL柱床体积Capto MMC的Tricorn层析柱进行捕获阶段的优化。因为150mM的氯化钠相当于初始样品中所发现的离子强度，显而易见将这一盐浓度作为结合的起始点，避免了上样前对样品进行稀释。结合缓冲液的pH值设为5.2，初始样品的pH值也作相应的设定。在第一次层析柱实验中，样品溶于含有8 M的尿素50 mM的乙酸钠，pH值为5.2缓冲液中。20mg胰岛素原（2 mL样品）被上到1 mL的层析柱上，再用7倍柱床体积（CV）以盐梯度150~ 1000 mM的氯化钠线性洗脱。

图7显示实验结果。在洗脱峰的峰顶采集的组分在Mono Q柱上进行分析，其结果得到的色谱可与粗样以及流穿部分的色谱作比较。

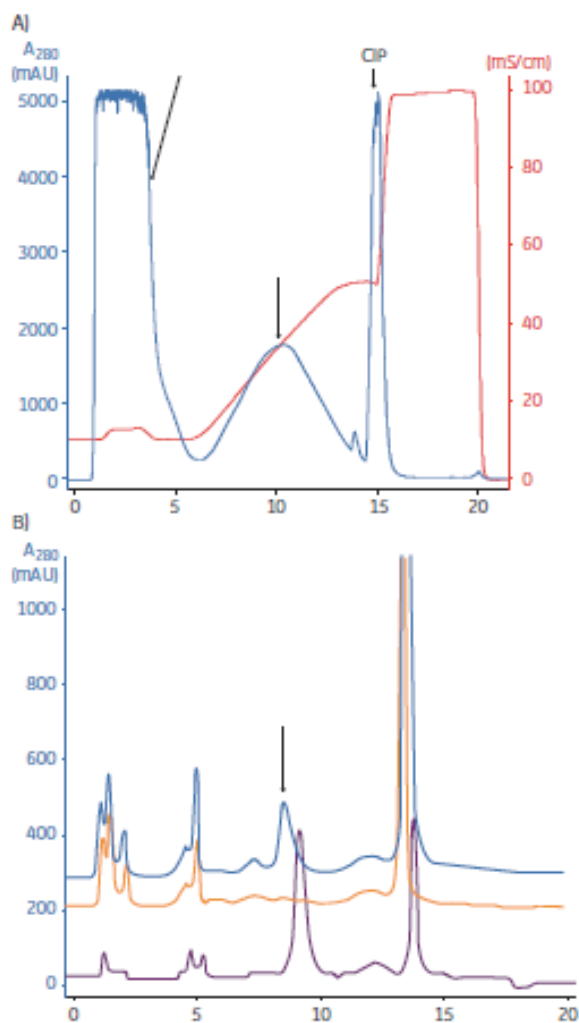


图7. A) 2 mL的粗样，pH值5.2，8 M的尿素，上样到一个装填了1 mL Capto MMC填料的Tricorn 5/50层析柱上，用7倍柱床体积以盐梯度150~ 1000 mM的氯化钠线性洗脱。B) 粗样、流穿（FT）和其中一个洗脱组分（当主要洗脱峰达到最大值时采集）通过相应的Mono Q分析。A) 和B) 中，在280 nm处进行检测。

流穿组分的分析（图6B）结果表明目标产物结合良好，流穿中未发现胰岛素原。非蛋白杂质似乎是弱结合，因为它出现在流穿组分中，而在洗脱组分中相应的峰值明显小得多。这表明了胰岛素原的捕获和纯化效果良好。不过，在线清洗的过程中出现了一个高峰值（图7a），表示只有高盐浓度不足以回收所有的胰岛素原。基于其他几种目标蛋白的经验表明，多模式填料常常要求高离子浓度之外更多的条件来达到有效洗脱的目的（4）。图8显示了当盐梯度补充以5.2~ 7.5的pH梯度时的捕获和分析结果。

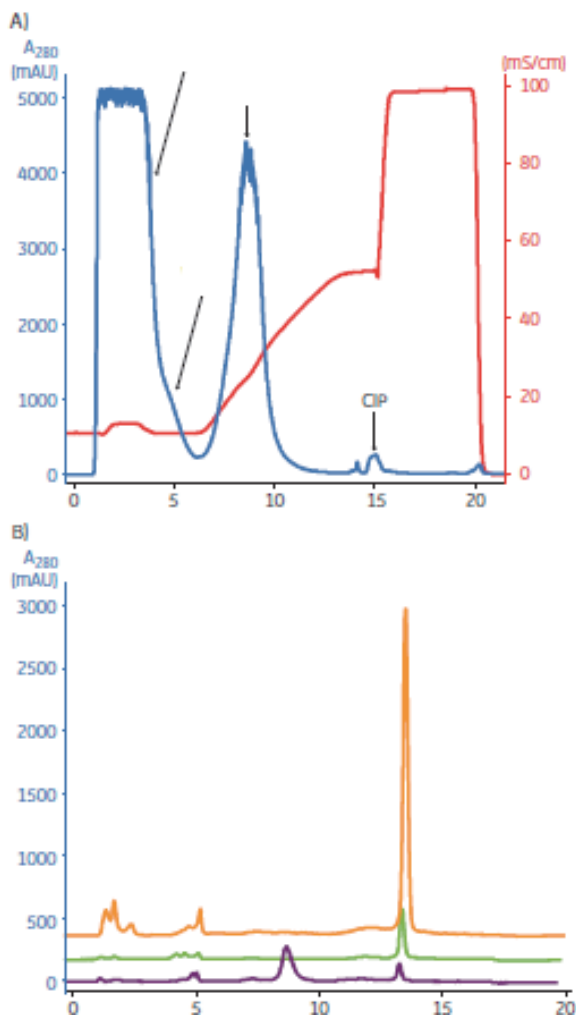


图8. A) 2 mL粗样，8 M的尿素，pH值等于5.2，上样到一个装填了1 mL Capto MMC填料Tricorn的层析柱上，并用7倍柱床体积在盐浓度150 ~ 1000 mM氯化钠和pH5.2~ 7.5双重梯度下线性洗脱。 B) 对流穿、清洗和主要洗脱峰的合并组分通过相应的Mono Q分析。 A) 和B) 中，在280 nm处进行检测。

将固定pH值（图7A）与pH值梯度（图8A）捕获实验的色谱图作比较，结果发现pH值和盐梯度组合给出了一个洗脱窄峰和一个高产率，当单独使用盐梯度洗脱时两者无一得以实现。

动态载量实验

可能的胰岛素原结合与洗脱条件一旦建立，注意力便转到动态载量（DBC）的测定上。用粗样超载层析柱，通过收集和分析组分以测定胰岛素原发生穿透的点。通过DBC实验数据，胰岛素原的上样量被定为25 mg（2.5 mL粗样，浓度约为80%的DBC），目的是使胰岛素原能准确完全结合在填料上。

洗脱优化

洗脱优化以步阶洗脱模式为目标，利用AKTA avant 25的缓冲液制备和DoE工具来优化洗脱条件。设立了一种全因子实验法，该实验法有三个基于两个变量（pH值和氯化钠浓度）的中心点，每个变量分为三个水平，旨在确定盐浓度和所需的pH值，以获得足够的纯度和产量（分别为80%和95%以上）。胰岛素原的峰面积以及分析色谱图中胰岛素原的面积百分比（纯度）被设定为响应值。详见表3。

表3.洗脱优化的设计变量和数值以及洗脱峰内胰岛素原的纯度数据

实验	氯化钠 (mM)	洗脱pH值读数	面积 (mAU × ml)	纯度 (%)
1*	450	7.1	196	76
2	150	7.1	181	79
3*	450	7.1	196	81
4	150	8	246	83
5*	450	7.1	187	82
6	750	8	251	84
7	750	7.1	241	82
8	450	6.2	69	71
9	450	8	250	84
10	150	6.2	37	53
11	750	6.2	116	78

图9显示，在收集的洗脱峰中，胰岛素原峰面积为pH值和氯化钠浓度函数。显而易见，胰岛素原的最佳洗脱是在高pH值下实现的，而氯化钠浓度增加到150 mM以上只产生了微小的影响。实现纯度也是在高pH值下达到最大。因此决定用pH 8和150 mM的氯化钠进行洗脱。

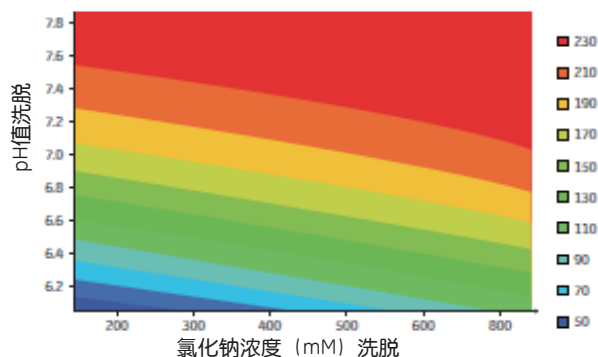


图9. 胰岛素原峰面积为pH值和以mM为单位的氯化钠浓度的函数的响应曲面图。R² = 0.989, Q² = 0.736。使用AKTA avant进行数据采集。

稳健性实验

为了完成工艺开发，在pH 8和150 mM氯化钠的优化洗脱条件下，在装填了1 mL Capto MMC的Tricorn 5/50层析柱做了稳健性实验。设计稳健性实验时采用了Plackett Burman的实验设计（5），它基于四个变量（两个批次的层析填料、两个批次的粗样、洗脱pH值7.8~ 8.2和2.3 ~ 2.7 mL的上样体积），全部洗脱缓冲液中氯化钠浓度均为150 mM。图10显示了来自与可变参数有关的洗脱峰的纯度数据（所有80%以上纯度）的系数图谱。很显然，未能发现具有显著统计意义的模型项。该实验中对所有条件下的收获率约为95%。

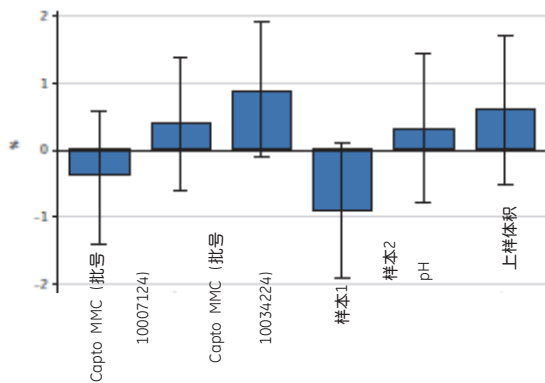
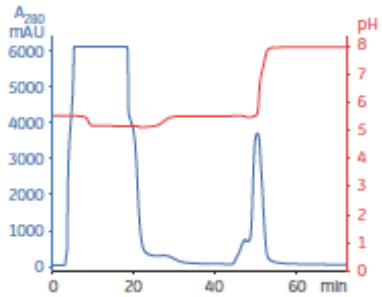


图10 纯度相关项的系数图谱，四个可变参数：填料批次（ $\times 2$ ）、样品批次（ $\times 2$ ）、pH值和上样量。

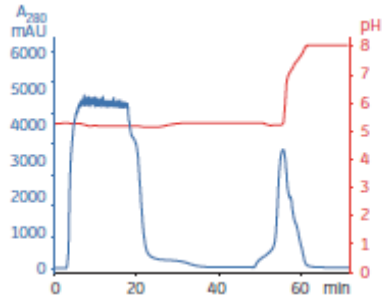
放大实验

通过增加层析柱的直径而保持滞留时间和上样量/mL填料等其他参数恒定不变，柱床高度为20cm的层析柱被放大9、40和400倍。其他条件类似于装填了Capto MMC的Tricorn 5/50层析柱在优化实验中使用的条件（在pH 5.2时上样，在pH 8时洗脱，两者均在150 mM的氯化钠浓度下完成。有两个HiScreen Capto MMC层析柱以串联方式连接，提供20 cm的柱床高度。此外，HiScale16/40层析柱（直径16 mm）和AxiChrom 50/300（直径50mm）各一，装填Capto MMC柱床高度分别达到20和19.5cm。在三个放大级别上都以240 cm/h（5分钟滞留时间）进行捕获实验。在Mono Q层析柱上分析了流穿组分和洗脱峰。结果和纯度数据（图11和表4）表明，胰岛素原纯化的捕获步骤从1 mL的Tricorn 5/50层析柱成功转移到了400 mL的AxiChrom 50层析柱。在400 mL规模测定，得到的胰岛素原纯度为82%，回收率则是96%。

A) HiScreen Capto MMC（两个层析柱以串联方式连接，柱床高度为20 cm），AKTA avant 25系统



B) 装填HiScale 16/40的Capto MMC（柱床高度为20cm），AKTA avant 150系统



C) 装填AxiChrom 50/300的Capto MMC（柱床高度为19.5cm），AKTA avant 150系统

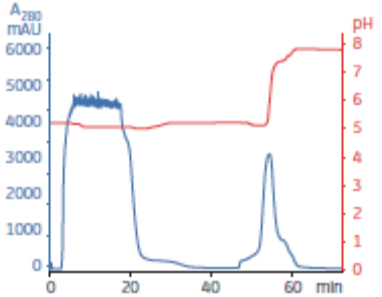


图11.在Capto MMC上以pH 5.2和150mM的氯化钠浓度上胰岛素原粗样时获得的色谱图，随后用pH 8在三种层析柱上进行步阶洗脱。A) HiScreen (9 mL)，B) HiScale (40 mL) 和C) AxiChrom (400 mL)。

表4.规模放大和纯度数据。所有的层析柱的上样量都为25mg的胰岛素原/mL填料

层析柱*	扩展因素	未加工样本负载 (mL)	胰岛素原纯度 (%)
Tricorn 5/50	1	2.5	83
HiScreen Capto MMC $\times 2$	9.4	23.5	86
HiScale 16/40	40	100	84
AxiChrom 50/300	400	960	82

*装填床总高度为20 cm，装填床高度是19.5 cm的AxiChrom 50除外完成工艺开发之后，对于上述工作的所用到的样品量以及实验天数作了估计（表5）。

表5.完整工艺开发在一人身上消耗的试样和时间

	时间	试样用量
PreDicator板筛选	7天	300 mg
层析柱实验（优化、稳健性和按比例放大）	10天	11 g

1 mL未加工样本含有10 mg胰岛素原目标分子

结论

采用PreDicator板和Assist软件的高通量筛选能迅速选择最适宜的层析填料并寻找最可能的结合及洗脱条件，以捕获在大肠杆菌中表达的重组胰岛素原。这样，就使得纯化工艺开发的开始既快速又有把握。根据这些筛选实验的结果，由于CaptoMMC能够与无需稀释的样品结合，成为了进一步开发的优选填料。在一个装填了1 mL Capto MMC的Tricorn层析柱内进行捕获阶段的进一步优化。优化基于筛选实验探索到的结合及洗脱条件的结果。一旦优化方案被证实具有稳健性，该工艺即从一个1 mL的Tricorn 5/50层析柱顺利地放大到一个400 mL的AxiChrom 50/300层析柱。该捕获阶段结果得到的纯度是82%，回收率则为96%。这样的结果显示了将高通量方法引入工艺开发工作流程中的重要价值。在PreDicator板筛选实验的实例中，填料和条件的筛选一共用了30 mL的粗样（300 mg目标分子）并在一周之内完成的。当板读取器上的紫外吸光值足以用于评估时，两天之内便可最终完成填料筛选。这里描述的筛选方法能在四周内快速开发出中试级纯化工艺（400 mL的AxiChrom）。

参考文献

1. Application note: High-throughput screening, process development, and scale-up of an intermediate purification step for recombinant insulin. GE Healthcare 29-0018-56.
2. Application note: *High throughput process development with PreDicator plates*, GE Healthcare, 28-9403-58.
3. Instruction: *PreDicator plates*, 28-9258-34.
4. Application note: *Optimizing elution conditions on Capto MMC using Design of Experiments*. GE Healthcare 11-0035-48.
5. Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practices. Joachim Ermer and John H. McB. Miller (Eds), p 149-150, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2005).

订购信息 相关资料

数据要求：

PreDicator96孔过滤培养板及“辅助”软件
AxiChrom层析柱--操作简单，性能优异
AKTA avant
HiScreen预装填料
Tricorn Empty--高性能层析柱
Capto MMC

编号

28-9258-39
28-9441-99
28-9573-45
28-9305-81
18-1147-36
11-0035-45

手册

离子交换色谱法与层析聚焦、原理及方法
以PreDicator板进行高通量工艺开发

编号

11-0004-21
28-9403-58

Biacore™系统开展免疫原性检测



介绍

免疫原性是指生物药物被注射到病人体内引起不必要的免疫应答的药物属性。由于影响药物的安全性和有效性，当开发新型蛋白药物时，免疫原性是必须考虑的重要方面。免疫原性测试需要在临床前和临床阶段进行。

美国食品药品监督管理局的《工业指南：治疗性蛋白免疫原性测试的方法开发》⁽¹⁾列明：免疫原性检测方法除灵敏度要求外，还必须能够检测所有抗体亚型，特别是IgM和IgG亚型。推荐的灵敏度是250到500ng/ml。免疫原性分析包括三个步骤：阳性药物的筛选、验证和表征。初步筛选中可能会产生假阳性结果，因此，在初步筛选后通常需要进行验证。经过对阳性样品的鉴定和验证后，就可以对初筛结果中的抗药抗体（Anti-Drug Antibodies, ADAs）开展全面的研究，包括其亚型（类或亚类）分析、结合稳定性、抗原表位特异性和中和能力，这些数据为深入研究免疫应答提供了宝贵信息。

Aarden等人⁽²⁾观察到IgG4是仅次于IgG1的由治疗性单克隆抗体（MAbs）产生的ADAs的主要亚型。IgG4一直与治疗性蛋白药物的高剂量注射和长时间暴露下所产生的免疫应答有关。由于IgG4型ADAs具有双特异性(bi-specific nature)，因此，其很难通过传统的桥联或均一的酶联免疫吸附法（ELISA）和增强性化学发光（ECLTM）方法检测。GE Healthcare提供了设计符合免疫原性分析流程通常所要求的，符合GLP/GMP管理规范的系统。本文中的实例展示了非标记生物物理相互作用分析方法是如何成功地应用于免疫原性研究流程的所有环节，并确保免疫应答的高可信度检测、验证和全面表征的（图1）。同时，本文也对Biacore系统和表面等离子体共振（SPR）技术的优势与传统技术进行了比较。

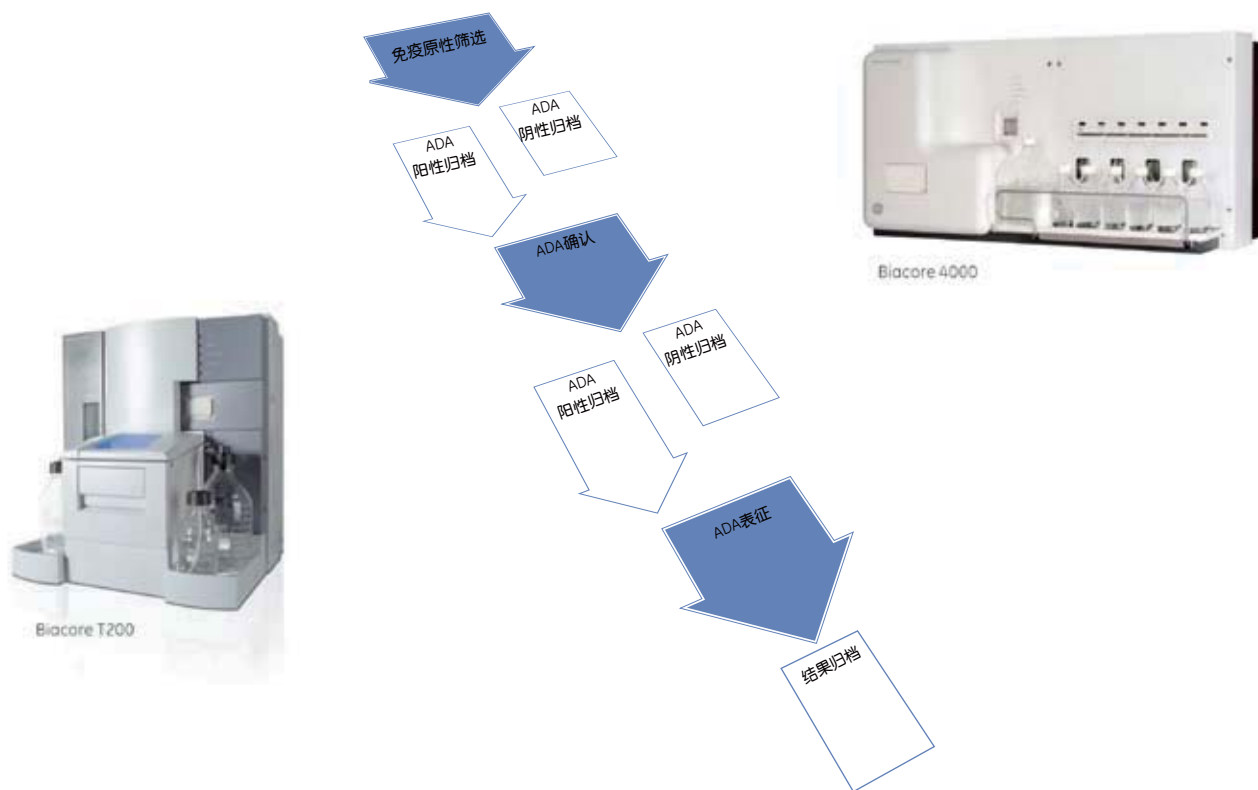


图1. 一个典型的用于免疫原性分析的多步流程，包括筛选以发现阳性样品、阳性样品的验证以及对确认的阳性样品的进一步表征。测试范围根据法规、药物类型和临床前/临床阶段的不同要求而不同。Biacore系统在整个工作流程中提供了宝贵的信息。

公认的灵敏度及对高、低亲和度抗药抗体的检测

一种经过验证的，基于Biacore 3000系统构建的，针对darbepoetin alfa和epoetin alfa的ADAs筛选方法的检测灵敏度分别可以达到100ng/ml和80ng/ml(3)。另一个研究报道称，Biacore对romiplostim和促血小板凝集素的ADAs的检测灵敏度分别达到400ng/ml和200ng/ml。除了达到法规要求的灵敏度外，Biacore系统还提供了宝贵的动力学信息，并同时能够检测高、低亲和度的抗药抗体。在下面的例子中，勃林格殷格翰公司（Boehringer Ingelheim）在对治疗用人源化抗体在临床I期多剂量研究中比较了Biacore检测法和桥联ELISA检测法。结果显示，Biacore T1001检测法相比ELISA检测法可以更早地发现阳性样品（图2）。这些早期免疫应答的ADAs抗体通常具有低亲和度，且具有快结合/快解离的动力学特征。尽管ELISA检测法的灵敏度相对较高，但由于考虑到需同时对早期和成熟期的免疫应答都做出检测的重要性，Boehringer Ingelheim最终选择了Biacore检测法作为他们免疫原性的筛选手段。

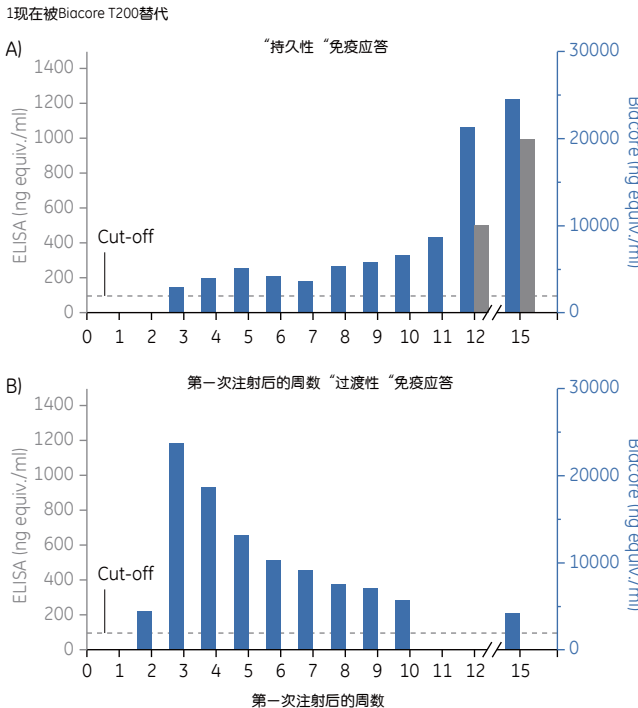


图2.优化的Biacore检测法在第一次注射（蓝色柱）两到三周后便能检测到“持久性”和“过渡性”的免疫应答，而桥联ELISA检测法只能在注射后12周后的“持续性”免疫应答阶段做出检测，但是“过渡性”的免疫应答阶段根本无法检测。

Biacore检测法可以检测低亲和度ADAs的优势也被Lofgren等所证实（5）。他们比较了桥联ELISA方法与Biacore方法对于全人源panitumumab（一种与EGF受体结合的单克隆抗体）的免疫原性分析。ELISA检测法对高亲和度的ADAs检测更加灵敏，但是Biacore检测法对于低亲和度ADAs的检测相比而言却灵敏得多。对于来自临床试验的样品，Biacore检测法比ELISA检测法可以检测到更多的阳性样品。此外，Biacore方法还利用中和抗体（Neutralizing Antibodies, NABs）发现了8种阳性样品，而这些样品在用ELISA方法检测时却被遗漏了。大量关于应用桥联ELISA检测法和Biacore免疫原性检测法对临床样品的检测结果的比较总结于表1。在所有的情况下，Biacore方法能够比ELISA方法检测到更多的阳性样品。一个可能的原因是由于使用Biacore检测法可以检测到那些低亲和度且快速解离的ADAs和IgG4（见下文）。Swanson等人展示了那些在Biacore方法中可以检测到而在ELISA方法遗漏的ADAs的临床意义（6）。来自8个患有抗体（Ab）介导的纯红细胞障碍性贫血病人的样品通过Biacore方法检测为阳性，但其中两个样品在ELISA方法中的检测结果却为阴性。

表1.利用ELISA和Biacore检测法检测的ADA阳性临床样品

药物	阳性数量 (ELISA检测法)	阳性数量 (Biacore检测法)
碘131嵌合型肿瘤	4/78	7/78
坏死单克隆抗体(7)		
生物治疗药物	19/62	15/62
Merck Serono*		
Panitumumab (5)	2 [†] /612	25 [‡] /612
重组人促红细胞	6/8 §	8/8 §
生成素(6)		

* 在2011年慕尼黑生物制品免疫原性会议上展示的酸解离检测法
[†] 其中一个被发现在基于细胞的检测法中具有中和效果
[‡] 其中八个被发现在基于细胞的检测法中具有中和效果
[§] 所有八个样品都来自具有抗体介导的纯红细胞障碍性贫血病人

Nechansky等人也观察到Biacore方法可以检测到显然更多的ADA样品数（8），并得出结论-表面等离子共振技术（SPR）是首选方法，这主要是由于Biacore能够检测低亲和度的ADAs，同时提供定量数据，例如结合和解离速率以及亚型的鉴别。

对ADAs抗体的自动带药筛选

药物干扰对于所有免疫原性检测法都是一个棘手的挑战，特别是那些用于治疗性单克隆抗体，药物经常以相当高的剂量给药，并拥有较长的半衰期。样品中所存在的药物能够结合ADAs，并阻止ADA与偶联（包被）在芯片上的药物分子结合，因此会产生假阴性结果。Biacore T200系统通过自动酸化解决了这个问题，它能够在存在过量药物的环境下对ADAs进行检测。样品通过酸化，使得药物-ADA复合物解离，然后在测定即将开始前被中和，从而避免重新形成药物-ADA复合物。自动酸化的优点是样品只需要被短暂酸化，且对于所有样品酸化时间都是固定的。

这种酸解离策略使得Biacore检测法在药物存在时也能够达到推荐的灵敏度。例如，不同浓度的抗rituximab抗体与浓度逐级增加的药物（rituximab）混合。在存在100倍过量（摩尔比）的rituximab的情况下检测到有0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的抗rituximab抗体（图3）。

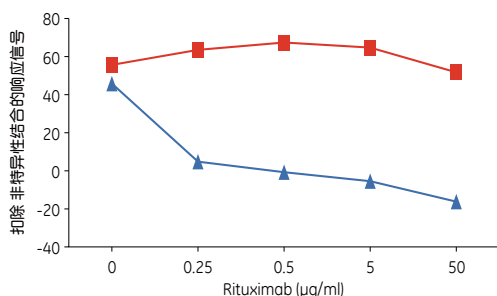


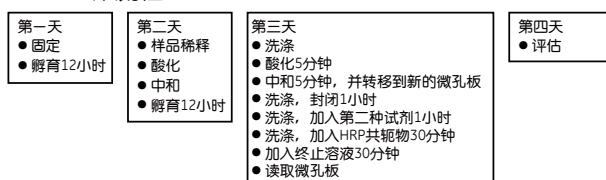
图3.使用(红色)或不使用(蓝色)酸解离策略在存在不同浓度rituximab下对0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的抗rituximab抗体的检测。

英国伯明翰大学的一个研究小组分析了来自SLE病人的临床样品中抗rituximab抗体和rituximab的水平(9)。在装有免疫原性模块的Biacore T100仪器中采用酸解离操作发现了样品中以前被rituximab所掩盖抗rituximab抗体。酸化分析也显示样品中rituximab的存在，而不采用酸化则不能检出其存在。在2011年慕尼黑生物制品免疫原性会议上，来自Merck Serono的Kramer博士展示了采用酸解离方法的自动化Biacore检测法的结果，并与基于ELISA的酸解离检测法

进行比较。当将69个临床样品进行比较时，相同的阳性样品在两种检测法中都被检出（部分结果被显示在图4中）。然而，Biacore T100检测法却发现更多的阳性样品，对于这种行为的可能的解释是Biacore检测法也可以发现那些具有低亲和度的ADAs，因为它们可能在ELISA的洗涤步骤被洗掉。

Merck Serono发现Biacore T100检测法可以实现卓有价值的自动化运行，节省劳动力成本和降低出错的风险。这在检测方法被转移到CRO公司时凸显巨大的优势。相比而言，ELISA检测法的步骤较为繁琐，包括多步手动移液操作，并且一般需要三天左右才能获得结果。

ELISA工作流程



Biacore工作流程

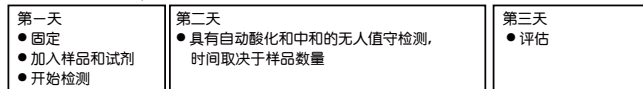


图5.Biacore和ELISA 免疫原性检测法工作流程

Biacore T100检测法可以将样品的制备工作量降至最低。与ELISA检测法相比，很少的手动操作为Biacore检测法提供了更高的精确度（表2）。

Kramer博士认为，“Biacore看起来是一种应用酸解离检测法的理想技术”，Merck Serono正在多个项目中使用Biacore系统开展基于酸解离的免疫原性筛选检测法。表2.具有酸解离的检测法批次间精确度比较。数据由Merck Serono友情提供

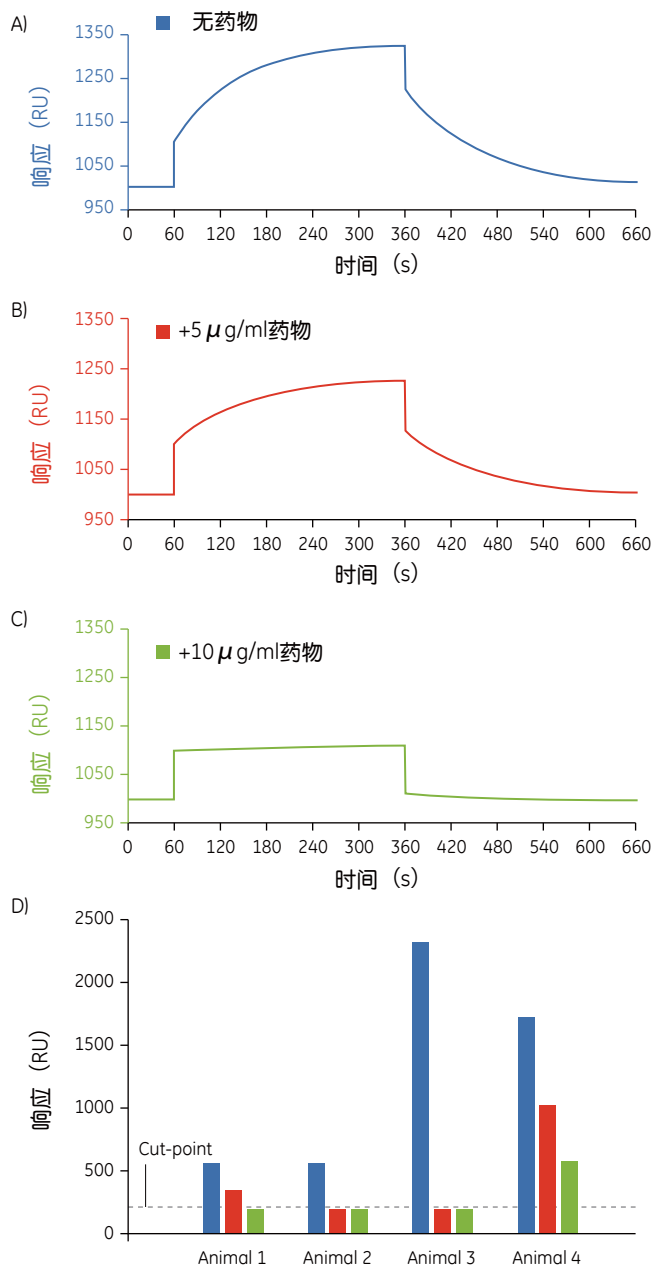
	ELISA, 百分比偏差	Biacore, 百分比偏差
低 阳性对照	26.4	11.5
高 阳性对照	26.0	14.7

选样时间	患者A		患者B		患者C		患者F	
	Biacore检测法	ELISA	Biacore检测法	ELISA	Biacore检测法	ELISA	Biacore检测法	ELISA
开始前								
168 h							●	
240 h							●	
312 h					●		●	
480 h							●	
648 h	●	●		●	●	●	●	●
816 h	●	●	●	●	●	●	●	●
984 h	●	●	●	●	●	●	●	●

图4.病人临床样品中ADAs的检测。

通过验证实验去除假阳性结果

药物竞争检测法通常被用于验证阳性响应是由于ADAs特异结合于药物，而不是与其他血清组分的相互作用。验证实验很容易在Biacore系统上进行；添加过量的药物到样品中从而抑制结合响应值，以证明响应是来自ADAs与传感器表面上的药物之间的特异结合（图6）。整个程序可以实现自动化。

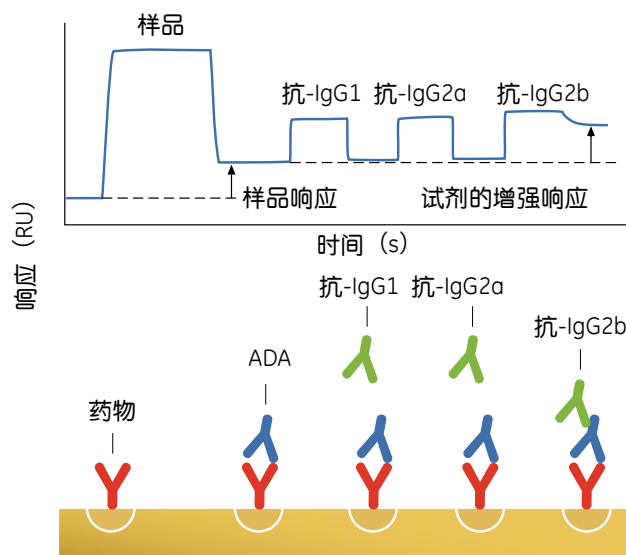


对ADAs的综合表征

在阳性样品的鉴定和验证后，可以使用Biacore分析进行全面的表征。竞争性配体结合分析、亚型分析（种类或亚型）、结合稳定性、抗原表位特异性和中和能力研究都为全面认识免疫应答的性质提供宝贵信息。Biacore T200提供专门的软件工具模块用于亚型分析和结合稳定性测试。

ADAs的亚型分析

ADAs的亚型分析提供了关于ADAs的免疫功能的信息，例如抗体Fc受体结合。亚型分析流程如图7所示。在Mytych等的研究中，含有抗darbepoetin alfa的血清ADAs的12个临床样品被用于开展亚型分析（3）。所有样品均分别对应某种特定的抗体亚型，四个主要的抗体亚型都被检测出来。大多数ADA阳性样品含有IgG和IgM类型。此外，还发现了三个样品呈现IgA阳性，一个样品呈现IgE阳性。



IgG4的检测

正如美国食品和药物监督管理局（FDA）所要求的，免疫原性检测法应该能够检测所有的IgG亚型（1）。IgG4是治疗性单克隆抗体的主要的一种ADAs亚型（2,6），部分IgG4可以通过抗体间的随机交换重组，造成抗体双特异性（图8A）。双特异性的ADAs在桥联或同源检测方式中无法检出（图8B），因而很难通过常见的ELISA或ECL方法检测的到。然而，IgG4在Biacore系统的直接结合模式中可以被检测到。

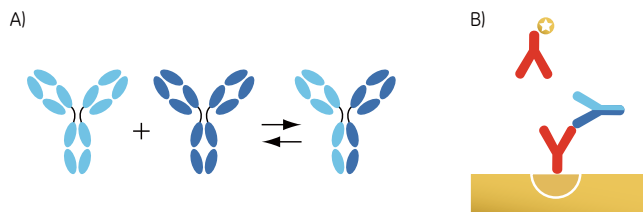


图8.双特异性ADAs在桥联ELISA检测法中不能被检测到。(A) 在人抗体之间自发和随机地发生交换,造成其中一些具有双特异性。(B) 双特异性IgG4在桥接ELISA中将不会被检测到,因为它们必须有两种药物分子与一个ADA的结合。

抗原表位特异性的测定

在研究免疫原性时, ADAs的抗原表位特异性的测定十分重要。根据FDA的建议 (1), 申请人应该研究在抗原上的哪些区域产生了免疫应答: “FDA建议申请人直接针对完整分子和内源对应物进行初步筛选试验。然而, 对于产品开发, 申请人应该研究导致免疫响应产生的特异抗原区域或“抗原表位”。这种测定方法对于融合分子可能尤为重要, 因为两个蛋白是通过基因或物理手段被“融合”在一起的。可以在筛选阶段就利用Biacore系统进行抗原表位特异性的测定。一个便捷的方法就是固定全长的药物在一个流动池 (Flow cell) 中, 同时固定药物的不同结构域在其他流动池中 (图9)。

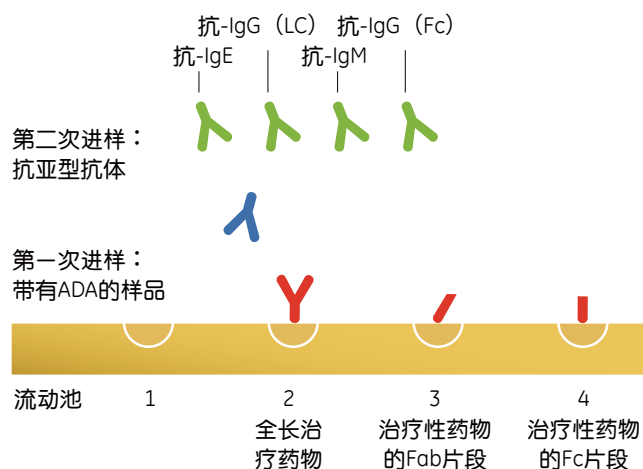


图9.同时进行抗原表位作图和亚型分析的检测方法。

交叉反应也可以采用相同的模式进行测定, 但是在每个流动池中固定不同的药物。为了评估抗darbepoetin alfa抗体是否存在潜在的对epoetin alfa的交叉反应, Mytych等开发了一种基于Biacore的双流动池生物传感器免疫检测法, 其中含有一个固定有epoetin alfa通道 (3)。这种免疫检测法被Amgen公司作为首选方法, 用于检测和表征人血清中的抗epoetin alfa和抗darbepoetin alfa抗体。

Stubenrauch等人开展的工作证明, 可以通过很少量的Biacore实验中获取丰富的信息 (10)。通过高效地利用这四个流动池, 可以对每个样品进行整合11种指标的完整的免疫原性检测, 包括临床样品中ADAs的应答、亚型、特异性和结合稳定性等信息 (图9)。这种方法可将来自药物的特异性应答与其他应答区分开来, 例如抗Fc片段的IgM类风湿因子应答。研究者可以跟踪特定的ADA形成的时间进程, 可以实现针对每个病人的ADA应答分析, 并与临床观察相关联。评估ADA结合稳定性一般来说, 在生物分子相互作用实验中, 解离速率是一种可以估计结合亲和度的指标, 抗体朝着更高亲和力方向上成熟通常会反映在更慢的解离速率上。Biacore系统能够通过评估抗体亚型和结合稳定性来监控ADA的成熟过程。阳性临床样品中的ADA集群可以通过ADA与固定于芯片的药物之间的结合稳定性来表征 (图10)。

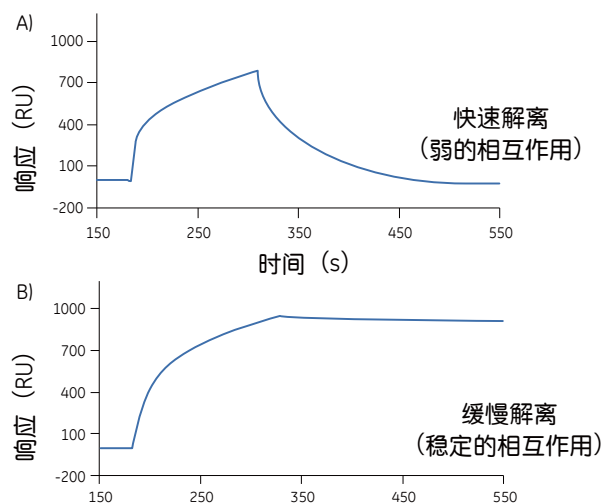


图10.Biacore表征阳性临床样品中ADA与到固定于芯片上的药物的结合稳定性。免疫应答成熟通常带来更慢的解离速率 (下图)。

评估ADA的亲和力或解离速率通常较难, 因为, 多数抗体是二价的和异源的。Biacore T200软件提供了专用工具, 可用来区分快速解离和缓慢解离的抗体组分造成的免疫响应。

Mytych等介绍了另外一种用于评估临床样品中ADA的解离速率的方法, 通过记录ADA开始解离前和解离40分钟后的响应信号来计算信号损失百分比。6个临床样品的结合信号在开始解离40分钟后降低大约68%和89%, 而高亲和度的阳性对照则几乎没有解离。

无需标记的竞争性配体结合检测法

作为ADA表征的一部分，确认为阳性的样品需要进一步检测中和抗体（Nab）的存在。NAb对治疗性生物药物有中和作用。常规的Nab检测法是基于细胞的方法，而这些检测法通常很繁琐，且重复性差。作为一种替代方法，竞争性配基结合（Competitive Ligand Binding, CLB）检测法会在有些时候被研究者所使用。根据EMA指南草案，对于单克隆抗体药物，CLB检测法通常作为首选方法，而不是生物检测法（11）。来自四个公司的案例研究已经证明，生物检测法和CLB检测法提供结果可比的NAb的检测（12）。ELISA或ECL等需要标记的检测方法很可能对NAb的检测产生不利的影响。Biacore系统上进行的CLB检测法不需要标记，并可以实现完全自动化。Biacore CLB检测法的原理如图11所示。

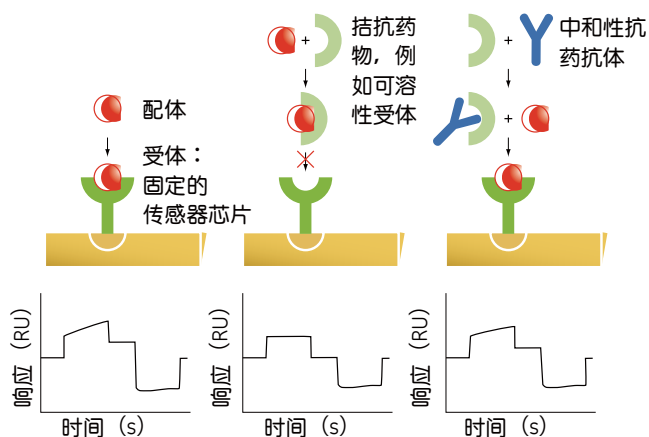


图11具有药物中和效果的ADA在CLB检测法中被检测。

检测（诊断）试剂的可靠鉴定和验证

经过验证和全面表征的试剂是保证任何检测方法的有效性的先决条件。Biacore系统提供关于检测/诊断试剂性质相关的详细信息，例如抗体-抗原结合的特异性、动力学和亲和力，这对于在方法开发过程中选择最优的试剂十分重要。对于某些需要二级检测试剂的方法（如二抗等），鉴定多种检测试剂彼此之间同时且独立地结合于各自抗原至关重要。这种鉴定可以在Biacore系统上很容易实现，通过使用成对的抗原表位作图功能自动的完成。除此之外，Biacore方法还能获得的动力学和亲和力信息，可以帮助研究者优化检测方法的性能，且不会增加对成本和其他资源的消耗。这些应用的例子包括Merck Serono公司，该公司的研究人员使用Biacore系统甄选最优的抗体用于磷酸激酶的检测，也用于分析抗体的生物素化修饰可能对桥联免疫检测方法的潜在影响。

致谢

有关方法比较、酸解离方法和验证的数据由德国默克雪兰诺（Merck Serono）公司的Kramer博士友情提供；免疫原性相关的筛选数据由勃林格殷格（Boehringer Ingelheim）公司友情提供。

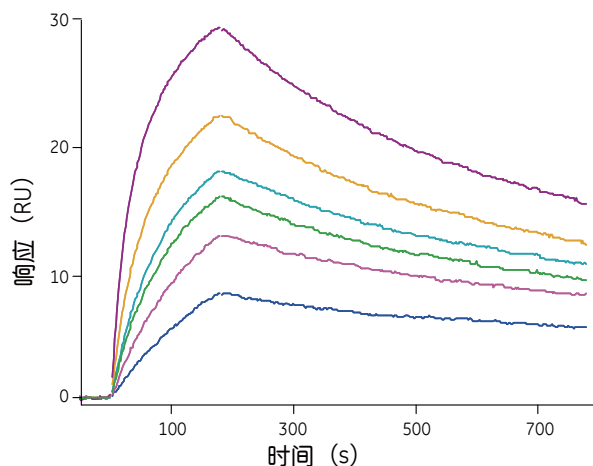
技术概述



利用Biacore系统的
结合强度和动力学

Biacore系统使用表面等离子共振（SPR）实时监测分子相互作用。无需标记，Biacore检测法提供关于分子相互作用的亲和度、动力学和特异性的信息。生物分子的活性浓度也可以被测定。相互作用分子中的一个被固定于传感芯片表面上，而其他分子以液体形式流经传感器表面。两者之间的任何相互作用通过靠近传感器表面的质量浓度的变化（折光率变化）而被实时检测，结合数据显示在传感图中，并对时间作图，响应信号用RU表示。复合物在相互作用过程中的形成和解离进程可以被实时观测，通过结合曲线的形状可获得的结合动力学信息（ k_a ， k_d ）。

可以在www.gelifesciences.com/biacore上找到更多信息



关于GE医疗集团

GE医疗集团通过提供革新性的医疗技术和服 务，开创医疗护理的新时代。我们在医学成像、信息技术、医疗诊断、患者监护系统、药物研发、生物制药技术、卓越运营和整体运营解决方案等领域拥有广泛的专业技术，能够帮助客户以更低的成本为全世界更多的人提供更优质的服务。此外，我们还和医疗行业领袖一道，正努力通过全球政策，打造成功的、可持续的医疗体系。

我们的“健康创想”愿景普及全球。我们不断通过创新在世界范围内推动降低医疗成本、增加医疗机会、提高医疗质量。GE医疗集团总部设在英国，是通用电气公司(纽约证券交易所：GE)下属的业务集团之一。GE医疗集团的员工分布于全球100多个国家和地区，致力于为医疗专业人士和患者服务。欲了解更多有关GE医疗集团信息，请访问公司网站 www.gelifesciences.com.cn

全国客服热线：800-810-9118
400-810-9118

GE医疗中国

北京办公室

北京市经济技术开发区
永昌北路1号
邮政编码：100176
电话：010-58068888
传真：010-67872812

上海办公室

上海市张江高科技园区
华佗路1号
邮政编码：201203
电话：021-38777888
传真：021-38777451

广州办公室

广州市天河区珠江新城花城大道87号
通用电气大厦10楼
邮政编码：510623
电话：020-38157777
传真：020-38157800

成都办公室

中国成都市高新西区西芯大道3号
创智联邦3号楼
邮政编码：611731
电话：8628-62722345
传真：8628-62722466



©2014-GE公司版权所有

GE公司有权在任何时候，在不另行通知的情况下，不负有任何义务地对上述规格和性能等进行更改，并有权终止该产品的供应。详情请与您当地的GE业务代表联系。

GE, GE Monogram, healthyimagination, imagination at work, 健康创想以及GE梦想启动未来是GE公司的注册商标
MyWorkshop No:DOC