

研究报告

抗 ErbB2 嵌合抗体 chA21 聚集现象的鉴定和分析

朱娟娟, 荣子烨, 江冰, 刘兢

中国科学技术大学生命科学学院 细胞免疫学实验室, 合肥 230027

摘要: 聚集现象是目前基因重组抗体面临的挑战之一。采用高效排阻色谱(HPSEC)、动态光散射(DLS)、SDS-PAGE 和间接 ELISA 鉴定抗 ErbB2 嵌合抗体 chA21 聚集的形式和性质, 并比较温度和添加剂对抗体聚集程度、抗原结合活性的影响, 用圆二色谱(CD)检测不同聚集条件下蛋白构象的变化, 最后将抗体酶解分离分析聚集的部位。结果表明: chA21 在溶液中可形成二聚和更高形式的聚集, 聚集体是通过非共价键相互作用形成, 并仍保留抗原结合活性, 聚集程度和活性受温度和添加剂影响, 而蛋白质的构象相对稳定, 抗体可变区的相互作用可能是引起聚集的主要原因之一。对抗体聚集现象的分析有助于建立稳定的抗体保存条件, 并为今后抗体进一步改造提供依据。

关键词: 嵌合抗体, 聚集, 动态光散射, 圆二色谱

Characterization and Analysis of the Aggregation of a Single-chain Chimeric Anti-ErbB2 Antibody

Juanjuan Zhu, Ziyue Rong, Bing Jiang, and Jing Liu

School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China

Abstract: We studied the aggregation of a recombinant engineering antibody (chA21). Anti-ErbB2 antibody chA21 was produced by fusing single-chain Fv (scFv) with human IgG1 Fc fragment, and it was proved to be a drug candidate for cancer therapy. We characterized the aggregation of chA21 by high performance sized-exclusive chromatography (HPSEC), dynamic light scattering (DLS), SDS-PAGE, indirect ELISA assay, and compared the influence of temperature and additive on the level of aggregation and binding activity. Conformation changes of different levels of aggregation were also analyzed via circular dichroism (CD). Finally, we analyzed which part of chA21 was involved in aggregation by cleaving it into scFv and Fc fragments. The results showed that chA21 could form aggregates in the storage solution. The aggregates interacted through non-covalent bonds and remained binding activity. Temperature and additive could slightly affect the level of aggregation and binding activity, while the conformations of chA21 were stable. Aggregation propensity of scFv fragment was almost same as chA21, indicating that scFv may be the major part to form the aggregates. The research on aggregation may be helpful to develop a suitable formulation for chA21 clinical application as well as provide direction for future antibody design and reconstruction.

Keywords: chimeric antibody, aggregation, dynamic light scattering, circular dichroism

Received: May 11, 2008; **Accepted:** July 7, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China(No. 30570362), Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education(No. 20060358021), Hi-Tech Research and Development Program ("863" Program) of China (No. 2006AA02A245), and the Cultivation Fund of the Key Scientific and Technical Innovation Project, Ministry of Education of China (No. 706035).

Corresponding author: Jing Liu. Tel: +86-551-3601437; E-mail: jliu@ustc.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 30570362), 教育部博士点基金资助项目(No. 20060358021), 国家 863 重点项目子课题资助(No. 2006AA02A245), 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(No. 706035)资助。

目前在抗肿瘤的药物治疗方案中, 基因工程抗体以其高特异性和低副作用的特点越来越受到重视。但是作为大分子蛋白的抗体在生产和保存过程中经常有聚集现象的发生, 不同抗体聚集情况有所差别。研究表明, 抗体聚集的性质有可逆^[1]的和不可逆的^[2], 聚集部位可位于可变区^[3]或恒定区^[4], 聚集的程度与抗体本身特性和所处溶液条件密切相关^[5]。聚集可能会对抗体的活性和稳定性有所影响, 甚至使免疫原性增高, 目前已成为抗体药物开发的一大挑战。本实验室研制的嵌合抗体 chA21 是将抗肿瘤相关抗原 ErbB2 的单链抗体(scFv)与人抗体 Fc 段融合而成(scFv-Fc), 并在 CHO 细胞中成功以双价形式表达(图 1)。实验表明, chA21 具有抑制高表达 ErbB2 的乳腺癌和卵巢癌细胞生长的作用^[6], 目前已建立了适应大规模生产与纯化的工艺体系, 具有潜在的临床应用前景^[7-10]。本研究采取液相色谱等方法对 chA21 出现的聚集现象进行了分析, 并结合抗体本身结构特点对引起聚集的部位和原因进行了探索。

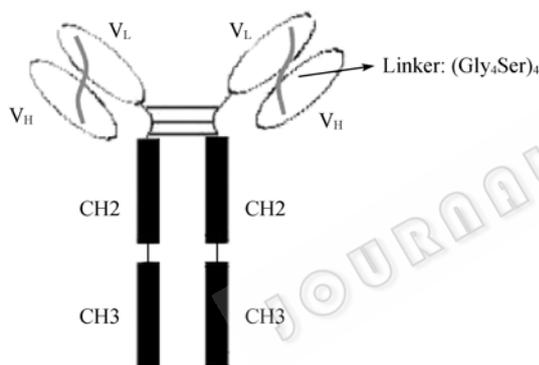


图 1 嵌合抗体 chA21 的结构图

Fig. 1 Schematic diagram of the scFv-Fc fusion protein (chA21)

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 嵌合抗体 chA21

表达 chA21 的 CHO 细胞为本实验室构建, 将细胞表达上清收集并经过 ProteinA 亲和层析和 SP 离子交换层析两步纯化后保存在 0.02 mol/L (pH 5.5, 含 0.2 mol/L NaCl) 的醋酸钠缓冲液中, 经 SDS-PAGE 测定纯度可达 95% 以上。

1.1.2 仪器

高压液相分析系统为 Agilent 公司产品, S300 分

子筛层析柱为 Phenomenex 公司产品, 动态光散射仪为 DynaPro 公司产品, 圆二色谱仪为 Jasco 公司产品, Protein A 亲和柱以及 Superdex G75 10/30 纯化柱为 Amersham 公司产品。

1.1.3 主要试剂

蛋白分子量标准购自 Promega 公司, 高表达 ErbB2 的 T6-17 细胞裂解液和不表达 ErbB2 的 3T3 细胞裂解液为本实验室保留, 96 孔酶标板购自 Nunc 公司, HRP 标记的羊抗人多抗和木瓜蛋白酶购自 Pierce 公司, 显色底物 OPD 购自 AMRESCO 公司, 甘露醇 (200 mg/mL) 注射液购自丰原药业, 所有化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 高效排阻色谱 (HPSEC) 鉴定 chA21 聚集现象

将两步纯化后的抗体浓度调整至 1 mg/mL, 并用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 取 30 μ L 样品用 HPSEC S300 进行分析。流动相为 0.05 mol/L 的 pH 7.0 的磷酸钠缓冲液, 含 0.3 mol/L 的 NaCl, 监测波长为 280 nm, 流速为 0.5 mL/min。

1.2.2 动态光散射 (DLS) 鉴定 chA21 聚集现象

将两步纯化后的抗体浓度调整至 3 mg/mL 并用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 取 12 μ L 加入样品池。仪器温度设为 20°C, 激光波长约 824 nm, 照射角度为 90°, 样品加入稳定 20 min 后开始测量, 测定结果取 20 个有效数据进行分析。

1.2.3 SDS-PAGE 分析 chA21 聚集的性质

分离胶浓度为 8%, 将经 S300 分子筛层析柱分离的每个峰收集, 浓缩后进行电泳检测, 以上柱前的抗体作为对照, 考马斯亮蓝 R-250 染色显示蛋白条带。

1.2.4 间接 ELISA 分析 chA21 不同聚集形式的抗原结合活性

用高表达 ErbB2 的 T6-17 细胞裂解液包被 96 孔酶标板 2 h, 不表达 ErbB2 的 3T3 细胞裂解液为阴性对照。PBS-T 洗 3 次, 每次 2 min, 封闭剂 (含 1% 脱脂奶粉的 PBS-T) 封闭 1 h, PBS-T 洗 3 次, 然后把 S300 分离的各个峰以原液加到板上, 振荡反应 1 h, 清洗后加入 HRP 标记的羊抗人 Fc 多抗反应 1 h, 最后用 OPD 底物显色, 检测在 490 nm 的吸收值。

1.2.5 HPSEC 和间接 ELISA 比较温度、甘露醇对抗体聚集程度和活性的影响

将纯化后的抗体浓度调整为 1 mg/mL, 甘露醇

的加入量与抗体的质量浓度比为 20:1, 对照组加入等体积缓冲液, 将 2 组都分别放置于 4°C 和 37°C 过夜。用 HPSEC S300 进行分析, 样品量均为 30 μL , 用仪器自带软件采用面积归一法计算每种条件下各个峰所占比例, 每种样品测 3 次取平均值。间接 ELISA 检测不同溶液环境下抗体结合活性变化(抗体浓度均稀释为 1 ng/ μL)。

1.2.6 圆二色谱(CD)分析抗体构象变化

远紫外光谱分析样品浓度为 0.1 mg/mL, 样品池容积为 0.4 mL, 从 200 nm~250 nm 每 1 nm 为一个测量值, 近紫外光谱分析样品浓度为 1 mg/mL, 样品池容积为 3 mL, 从 250 nm~450 nm 每 1 nm 为一个测量值。以相应溶液为空白对照, 扫描速度为 100 nm/min, 根据样品设置不同的水浴温度, 结果取同一样品 3 次扫描的平均值。

1.2.7 抗体的酶解分离以及聚集部位的分析

抗体置于 pH 7.0 的 0.02 mol/L 的磷酸盐溶液中(含 0.01 mol/L EDTA), 用木瓜蛋白酶酶解过夜, 将酶解液用 Protein A 亲和柱进行分离纯化, 挂柱后洗脱下来的是含为抗体恒定区(Fc 段)的部分, 未挂柱的为不含 Fc 段的部分。将未挂柱的成分用 Superdex G75 进一步精细纯化得到抗体可变区(单链抗体 scFv)^[3], 保存于 0.02 mol/L 醋酸钠溶液中(pH 5.5, 0.2 mol/L NaCl), 将纯化所得的 scFv(浓度约 0.2 mg/mL)同样用 HPSEC S300 进行分析。

2 实验结果

2.1 高效排阻色谱(HPSEC)对抗体 chA21 聚集现象的鉴定

如图 2 所示纯化后的抗体经 HPSEC S300 分离出现连续的 3 个峰, 出峰时间分别为 14.36 min、15.37 min 和 16.92 min, 根据出峰时间和标准分子量对照得出 3 个峰的分子量约分别为 300 kD、200 kD 和 100 kD, 已知 chA21 的单体分子量为 105 kD 左右, 因此这 3 个峰应该分别为抗体的三聚、二聚和单体形式, 采用面积归一法得出峰 1、峰 2、峰 3 分别占 14.5%、22.6%以及 62.9%。

2.2 动态光散射(DLS)对聚集现象的鉴定

如图 3 所示, X 轴显示散射颗粒的粒径分布情况, Y 轴显示各粒径颗粒的散射光强度百分比(以最强的散射光强度作 100%), 溶液中同时存在粒径约为

4.8 nm 和 11.2 nm 的 2 种不同大小的颗粒, 分别占约 92.5%和 7.5%。据文献报道天然 IgG 的粒径大小约 10 nm 左右^[11], 因 chA21 的分子量仅为天然抗体的 2/3, 所以推测 4.8 nm 可能代表 chA21 抗体的单体形式, 11.2 nm 可能是代表抗体的二聚或更高形式的聚集集体。

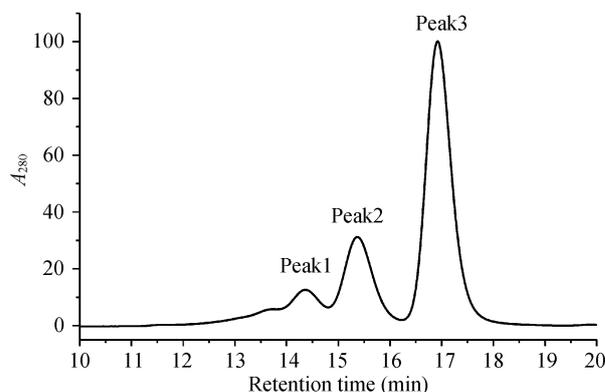


图 2 纯化后的抗体在 HPSEC 上的分析
Fig. 2 Analysis of purified chA21 by HPSEC

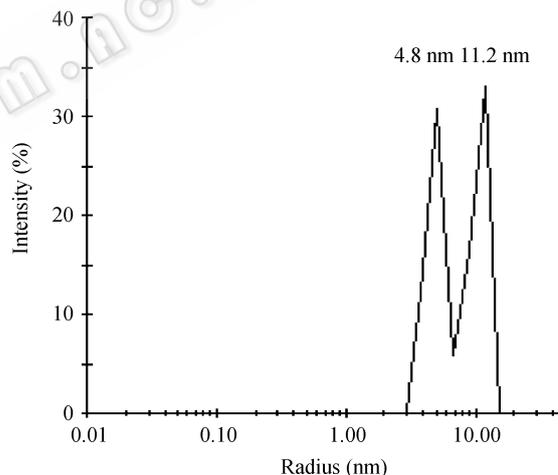


图 3 动态光散射对抗体聚集情况的分析
Fig. 3 Dynamic light scattering analysis of antibody aggregation

2.3 SDS-PAGE 和间接 ELISA 对聚集性质的鉴定

SDS-PAGE 结果显示, 经 HPSEC 分离的 3 个峰和分离前的 chA21 具有相同的电泳迁移率, 表明分子量都约为 150 kD, 为抗体的单体形式(图 4a), 说明聚集集体是通过非共价键的相互作用而形成。间接 ELISA 结果显示收集的 3 个峰都具有抗原结合活性(图 4b)。综合两者, 表明 chA21 具有可逆的聚集性质。

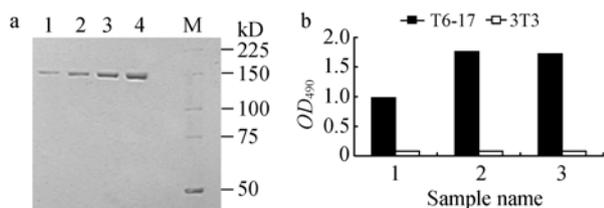


图 4 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定聚集(a)和间接 ELISA 分析聚集形式的抗原结合活性(b)

Fig. 4 Determination of the aggregates by SDS-PAGE(a) and the binding activity of the aggregates by indirect ELISA assay(b)

(a) 1: peak1; 2: peak2; 3: peak3; 4: chA21 control; M: marker
(b) 1: peak1; 2: peak2; 3: peak3

2.4 HPSEC 检测温度和添加剂对聚集程度的影响

如图 5 所示, 与 4°C 溶液组中单体比例(63.9%)相比, 4°C 加甘露醇组(64.1%)、37°C 溶液组(65.5%)单体比例均略有增加, 提示加入甘露醇、升高温度可促使抗体解聚; 而 37°C 加甘露醇组单体比例增加较多(79.1%), 提示温度升高同时含甘露醇的条件下抗体解聚更明显。

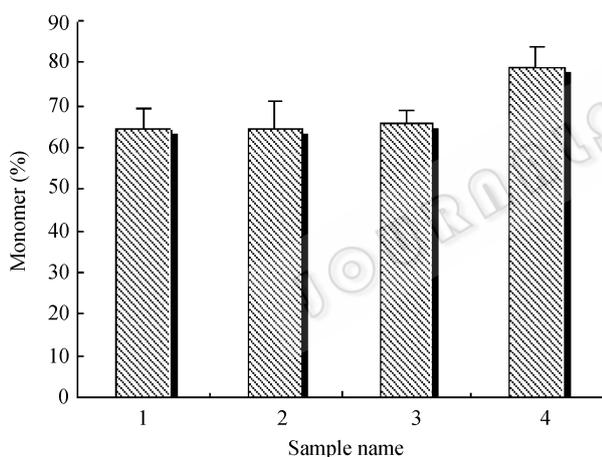


图 5 HPSEC 比较温度和甘露醇对抗体聚集程度的影响
Fig. 5 Effects of temperature and mannitol on the level of aggregation by HPSEC

1: 4°C; 2: 4°C, mannitol; 3: 37°C; 4: 37°C, mannitol

2.5 间接 ELISA 比较温度和添加剂对抗体结合活性的影响

比较上述保存条件下相同浓度抗体活性变化(图 6), 在 4°C 时不同的溶液环境对抗体活性无明显影响, 但在 37°C 时结合活性增强, 且此温度下含甘露醇组活性增加较明显, 提示温度升高、含甘露醇时可增加抗体结合活性。

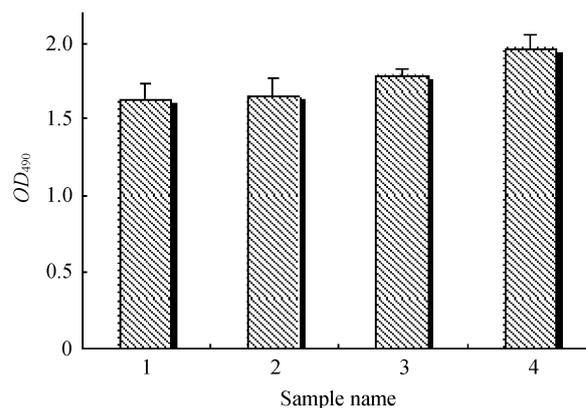


图 6 间接 ELISA 比较温度和甘露醇对抗体结合活性的影响

Fig. 6 Effects of temperature and mannitol on the binding activity by indirect ELISA assay

1: 4°C; 2: 4°C, mannitol; 3: 37°C; 4: 37°C, mannitol

2.6 圆二色谱(CD)分析抗体构象变化

蛋白聚集有可能引起构象的改变甚至导致变性, 通过圆二色谱可对抗体的二级和三级结构进行检测^[12]。结合图 5 结果选取聚集程度变化较大的 2 种情况作为代表, 即保存在 4°C 加有甘露醇和保存在 37°C 加有甘露醇的 2 组样品。远紫外光谱可提示抗体二级结构有关信息, 217 nm 处的负峰代表着大量的β-折叠结构的存在, 如图 7a 所示, 两组样品的光谱几乎一致, 符合抗体结构含有大量β-折叠特点; 近紫外光谱可提示抗体三级结构有关信息, 具有 292 nm 处的正值峰(和色氨酸有关)以及 260 nm~290 nm 处的几处负值峰(和酪氨酸、苯丙氨酸有关), 并且二硫键的变化信息反映在整个近紫外 CD 谱上, 图 7b 显示和远紫外光谱相比, 2 组样品的近紫外光谱差异略大, 提示不同聚集情况下抗体可能主要涉及三级结构的变化。但总的来说, 不同保存条件下抗体的二级构象和三级构象基本保持稳定。

2.7 分析抗体的聚集部位

将抗体酶解片段单链抗体(scFv)用 HPSEC S300 进行分析, 结果如图 8 所示, 3 个峰的出峰时间分别为 18.3 min、19.1 min 和 20.0 min, 对应的分子量约 75 kD、50 kD 和 25 kD, 分别代表 scFv 的三聚、二聚和单体形式, 即在相同的溶液环境中 scFv 存在着与完整抗体(图 2)相似的聚集趋势, 说明聚集部位可能主要位于抗体的可变区。

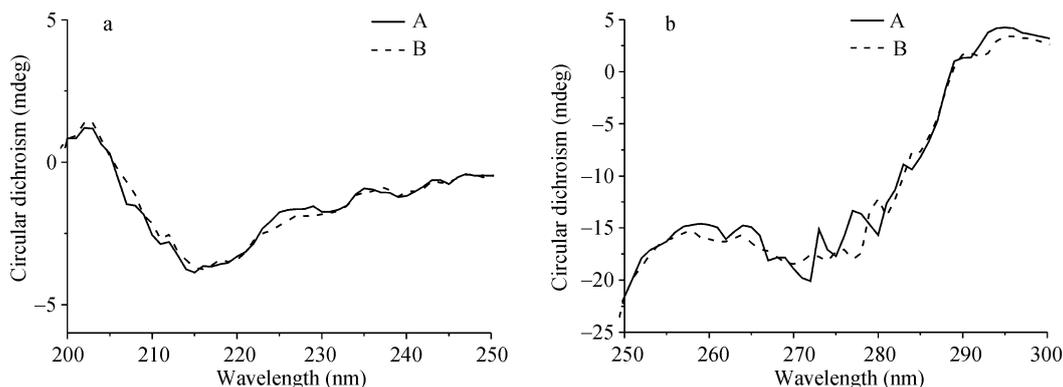


图7 圆二色远、近紫外光谱比较 chA21 二级结构(a)和三级结构(b)的变化

Fig. 7 Second structural analysis(a) and tertiary structural analysis(b) of chA21 by the far-CD spectrum

A: 4°C, mannitol; B: 37°C, mannitol

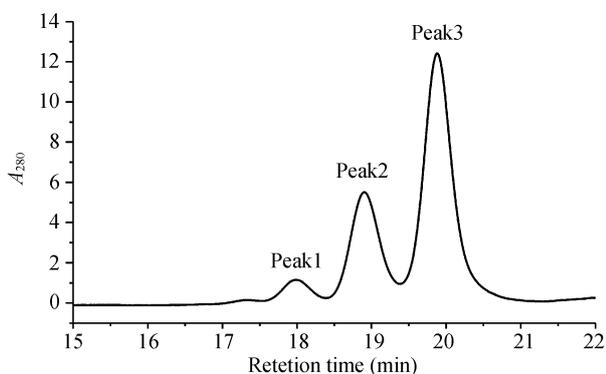


图8 HPSEC S300 鉴定 scFv 的聚集特性

Fig. 8 Analysis of the aggregation propensity of scFv by HPSEC S300

3 讨论

聚集是重组抗体药物面临的一大难题。为保证生产过程中的稳定性以及适应临床应用的要求,对于抗体聚集的性质、规律和发生原因的研究是非常必要的。以此为基础,对聚集的改善可通过对抗体分子本身的改造^[13]或保存条件的优化来实现^[14]。

目前对于聚集现象的鉴定有多种方法^[15],本文联用 HPSEC 和 DLS 两种方法。HPSEC 具有用量少、灵敏度高、对不同聚集组分的比例定量精确等优点,但是上柱前高浓度样品经常要进行稀释处理,对于高浓度状态下样品的检测有一定误差。DLS 的优点是样品无需稀释,可以较为直观地从粒径大小来说明蛋白质的聚集情况,适合分析高浓度高分子量蛋白,但是不能精确将聚集程度定量。因此同时使用两种方法可以更全面的对聚集情况进行分析。本实验中 DLS 和 HPSEC 结果都证实聚集的存在,但

DLS 对聚集程度的判定比 HPSEC 低,可能与 DLS 本身精确度以及在操作时温度设置较高(20°C)有关,实验表明温度升高时会使抗体有所解聚。SDS-PAGE 和间接 ELISA 实验证明 chA21 在给定溶液中的聚集是通过非共价相互作用形成的,不同聚集形式都保留有抗原结合活性。这种非共价的聚集具有可逆性,可受溶液环境的影响,提示我们可通过优化保存条件对聚集加以改善:实验表明在接近中性的条件下,随着 pH 值的升高聚集比例增加(数据略),可能和接近抗体等电点有关(pI 约为 8.75),因此为了减少聚集,我们一般采取中性偏酸的缓冲液保存;本研究中我们以 pH 值为 5.5 的醋酸钠缓冲液为代表,发现温度升高使抗体有所解聚,可能是由于此时疏水作用增强促进抗体分子内折叠,从而减少蛋白间相互作用引起的;甘露醇在低温下对抗体解聚作用不明显,但高温时的解聚作用影响明显,其机理有待于进一步分析。在这几种不同的聚集程度下单体比例多时抗体结合活性增强,提示聚集部位可能位于抗体可变区。尽管聚集程度有所差别,但抗体的天然构象基本维持不变,这也是抗体保持活性的基础。

抗体酶解片段的分析进一步显示 chA21 的聚集可能主要是由可变区(单链抗体)的相互作用引起的。单链抗体是通过一段连接肽(linker)将抗体重链(V_H)和轻链(V_L)共价相连, V_H 和 V_L 之间通过疏水作用折叠成抗原结合区。有文献报道单链抗体分子间的相互作用受 linker 长短、 V_H 和 V_L 的氨基酸组成以及溶液环境影响,但一般认为连接肽大于 15 个氨基酸的单链抗体主要以单体形式存在^[16]。chA21 的单链抗体的 linker 具有 20 个氨基酸仍有聚集趋势,可能与

其本身独特的性质有关, 本实验室已解析出 chA21 单链抗体的晶体结构^[8], 将结合晶体结构进一步分析。

嵌合抗体分子量仅为全抗体的三分之二, 具有免疫原性低和穿透性好的特点, 但是这类抗体的聚集特性目前所知甚少。本实验对 chA21 抗体的可逆聚集现象进行了初步研究, 探讨了影响聚集的因素, 同时分析抗体的聚集部位, 为今后抗体进一步改造提供了思路和依据。

REFERENCES

- [1] Moore JM, Patapoff TW, Cromwell ME. Kinetics and thermodynamics of dimer formation and dissociation for a recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry*, 1999, **38**(42): 13960–13967.
- [2] Andya JD, Hsu CC, Shire SJ. Mechanisms of aggregate formation and carbohydrate excipient stabilization of lyophilized humanized monoclonal antibody formulations. *AAPS PharmSci*, 2003, **5**(2): 1–11.
- [3] Wu AM, Tan GJ, Sherman MA, *et al.* Multimerization of a chimeric anti-CD20 single-chain Fv-Fc fusion protein is mediated through variable domain exchange. *Protein Eng*, 2001, **14**(12): 1025–1033.
- [4] Kameoka D, Masuzaki E, Ueda T, *et al.* Effect of buffer species on the unfolding and the aggregation of humanized IgG. *J Biochem*, 2007, **142**(3): 383–391.
- [5] Wang W, Singh S, Zeng DL, *et al.* Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci*, 2007, **96**(1): 1–26.
- [6] Cheng LS, Liu AP, Yang JH, *et al.* Construction, expression and characterization of the engineered antibody against tumor surface antigen, p185 (c-erbB-2). *Cell Res*, 2003, **13**(1): 35–48.
- [7] Wang J, Shi Y, Liu YQ, *et al.* Purification characterization of a single-chain chimeric anti-p185 antibody expressed by CHO-GS system. *Protein Expr Purif*, 2005, **41**(1): 68–76.
- [8] Hu SY, Zhu ZQ, Li LW, *et al.* Epitope mapping and structural analysis of an anti-ErbB2 antibody A21: Molecular basis for tumor inhibitory mechanism. *Proteins*, 2008, **70**(3): 938–949.
- [9] Ma J, Dong YQ, Zou M, *et al.* Effect of sodium butyrate and propionate on cell growth, metabolism and expression of the chimeric antibody. *China Biotechnol*, 2005, **25**(10): 12–16.
马军, 董艳秋, 邹珉, 等. 丁酸钠和丙酸钠对工程 CHO 细胞生长代谢和嵌合抗体表达的影响. *中国生物工程杂志*, 2005, **25**(10): 12–16.
- [10] Qiao JJ, Liu HB, Zhu JJ, *et al.* The research on expression and purification of chimeric anti-P185 antibody. *China Biotechnol*, 2006, **26**(9): 32–37.
乔婧娟, 刘海波, 朱娟娟, 等. 抗 P185 工程抗体表达与纯化研究. *中国生物工程杂志*, 2006, **26**(9): 32–37.
- [11] Bermudez O, Forciniti D. Aggregation and denaturation of antibodies: a capillary electrophoresis, dynamic light scattering, and aqueous two-phase partitioning study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, **807**(1): 17–24.
- [12] Ejima D, Tsumoto K, Fukada H, *et al.* Effects of acid exposure on the conformation, stability, and aggregation of monoclonal antibodies. *Proteins*, 2007, **66**(4): 954–962.
- [13] Hugo N, Lafont V, Beukes M, *et al.* Functional aspects of co-variant surface charges in an antibody fragment. *Protein Sci*, 2002, **11**(11): 2697–2705.
- [14] Ahrer K, Buchacher A, Iberer G, *et al.* Thermodynamic stability and formation of aggregates of human immunoglobulin G characterised by differential scanning calorimetry and dynamic light scattering. *J Biochem Biophys Methods*, 2006, **66**(1-3): 73–86.
- [15] Shire SJ, Shahrokh Z, Liu J. Challenges in the development of high protein concentration formulations. *J Pharm Sci*, 2004, **93**(6): 1390–1402.
- [16] Arndt KM, Müller KM, Plückthun A. Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment. *Biochemistry*, 1998, **37**(37): 12918–12926.