

CE-SDS和cIEF方法对半胱氨酸偶联的抗体偶联药物的分析

Heterogeneity analysis of cysteine-linked antibody-drug conjugate by CE method

任挺钧、陈泓序

Tingjun Ren, Hongxu Chen

CE & Biopharma, Sciex, China

Key Words: Antibody-drug conjugate, Cysteine-linked, CE-SDS, cIEF, Heterogeneity analysis

Abstract: Antibody drug conjugates (ADCs) are innovative biopharmaceutical emerging in recent years. And this kind of biotherapeutics show unprecedented intrinsic heterogeneity, so separation technologies play a critical role in their characterization. In this tech note, heterogeneity of a Cys-linked ADC is analyzed by using CE-SDS and cIEF. In CE-SDS, we established the reduced and non-reduced method to evaluate the purity of the ADC and explain the meaning of each peak in CE-SDS. In cIEF method, we compared the change of charge variant distribution between ADC and the monoclonal antibodies. Both two method can give us the reference of quality control assessment to the ADCs.

前言

抗体偶联药物 (Antibody-drug conjugates, ADC) 是一种将化学药物通过连接物 (linker) 与抗体偶联形成的药物。它既有抗体的靶向性又有化学药物的强杀伤力, 成为肿瘤治疗用药的研究与发展热点。2011年8月和2013年2月, ADC药物brentuximabvedotin (商品名Adcetris) 和ado-trastuzumabemtansine (商品名Kadcyla) 分别获FDA批准上市。该两种ADC药物上市仅仅是ADC研发热潮的缩影, 目前, 世界范围内有约60种ADC药物处于临床阶段^[1-2]。

ADC常见的偶联方式有赖氨酸偶联和半胱氨酸偶联。赖氨酸是抗体中最常见的连接位点, 其氨基可以与连接物的羧基反应, 得到较为稳定的酰胺键。一般的, 抗体中约有80个赖氨酸, 其中10个赖氨酸可作为连接位点。对于半胱氨酸偶联的方式, 由于抗体表面没有游离的巯基, 可以通过对断裂重链或者轻链间的二硫键, 在抗体编码中加入半胱氨酸, 另一方面, 可以通过用还原剂

打断抗体链间已有的二硫键, 形成游离的巯基, 实现偶联^[3]。图1简单描述了赖氨酸和半胱氨酸可能的位点的结构示意图^[4]。

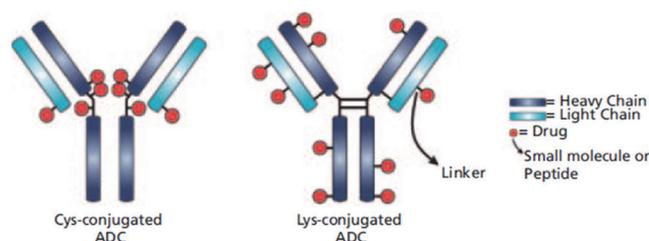


图1. 半胱氨酸和赖氨酸偶联位点及连接方式示意图。

ADC药物的质量控制与单克隆抗体类药物分析类似, 主要针对其异质性进行分析, 包括大小异质性及电荷异质性分析。而毛细管电泳技术近年来以其分离度高、分析速度快及自动化程度高成为了生物制药质控中不可或缺的分析技术, 其中主要包括毛细管凝胶电泳 (CE-SDS) 进行纯度分析 (大小异质性) 和毛细管等电聚焦 (cIEF) 进行等电点和电荷异质性分析。

本研究采用Sciex公司的PA800 Plus生物制药分析系统, 以通过还原剂打开二硫键后通过半胱氨酸偶联的ADC为例, 建立和完善了CE-SDS和cIEF对该种ADC药物的分析方法, 对其大小异质性和电荷异质性进行了分析, 为ADC药物的质量控制提供参考。

2、仪器和试剂

2.1 仪器

毛细管电泳仪 (PA800 Plus生物制药分析系统, PDA和UV检测器, Sciex); 5430型台式高速冷冻离心机 (Eppendorf, Germany); MA3涡旋混合器 (IKA, Germany); Thermomixer compact型恒温混匀仪 (Eppendorf, Germany)。

2.2 试剂

IgG Purity/Heterogeneity Assay Kit (PN A10663) 和Advanced cIEF Kit (PN A80976) 采购自Sciex。两性电解质 (PN 17-0456-01) 采购自GE Healthcare。其余所有试剂均为分析纯。巯基乙醇 (PN M6250)、碘乙酰胺 (PN I-1149)、磷酸 (PN 345245)、氢氧化钠 (PN 221465)、氢氧化铵溶液 (PN 221228)、亚氨基二乙酸 (PN 220000)、精氨酸 (PN A5006) 冰醋酸 (PN 537020) 和尿素 (U0631) 均采购自Sigma-Aldrich。实验所需用水均采用二次去离子水 (Double Deionized Water, DDI Water)。Ultrasel YM-10 滤膜 (Millipore PN A11530)。

1) CE-SDS:

碘乙酰胺溶液: 取46 mg 碘乙酰胺与1.5 mL EP管中, 加入1 mL DDI Water溶解混匀。现用现配, 避光保存。

2) cIEF:

阳极液、阴极液、化学迁移剂、酸性冲洗液、4.3 M尿素溶液、阳极稳定液、阴极稳定液、3 M Urea-cIEF Gel溶液的配制方法参照Sciex cIEF试剂盒说明书⁵。

2.3 样品及前处理

裸抗和其通过半胱氨酸偶联的ADC样品均来自某合作单位。

取 400 μ L 样品入超滤管 (截留分子量10 kD) 中, 14000 rpm, 离心10分钟; 加入300 μ L DDI water, 14000 rpm, 离心10分钟; 再加入300 μ L DDI water, 14000 rpm, 离心10分钟。调整样品最终浓度为5.0 mg/mL, 盐离子浓度低于50 mM。

1) CE-SDS:

取两支1.5 mL EP管, 分别取20 μ L样品于两支EP管中, 然后各加入75 μ L的Sample buffer使得体积为95 μ L。然后再向两支EP管中分别加入5 μ L 2-巯基乙醇 (还原法) 和碘乙酰胺溶液 (非还原法)。盖上瓶盖, 充分混合后离心1分钟。然后置于70 $^{\circ}$ C水浴10分钟。随后离心去除气泡, 吸取100 μ L置于样品管中。

2) cIEF:

分析多个样品的时候, 推荐预先配制样品混合物母液 (Master Mix), 如表1。Master Mix 可简化样品配制并且使误差最小化。在表格中输入样品的数量, 然后样品数量加1计算, 按照计算的各个溶液的体积进行配制Master Mix。

随后, 取10 μ L样品与240 μ L上述溶液进行混合, 涡旋混匀。取出200 μ L置于样品管中。

表1. 分析多个样品时配制的 cIEF Master Mix。

试剂	每个样品需要的量 (μ L)	样品数量	总体积 (μ L)
3 M 尿素-cIEF 胶	180	\times (___ + 1)	
3-10 两性电解质	12	\times (___ + 1)	
阴极稳定剂	20	\times (___ + 1)	
阳极稳定剂	2	\times (___ + 1)	
pI 标准品1	2	\times (___ + 1)	
pI 标准品2	2	\times (___ + 1)	
pI 标准品3	2	\times (___ + 1)	

3、方法

3.1 CE-SDS:

分离条件: 毛细管: 非涂层毛细管、50 μ m内径、30 /20 cm 总/有效长度; 进样: -5 kV, 20 s; 分离: -15 kV, 40 min; 数据采集频率: 4 Hz; 样品室温度: 25 $^{\circ}$ C; 毛细管温度: 25 $^{\circ}$ C; 窗口狭缝: 2号 (100 \times 200 μ m); PDA检测器, 检测波长: 220 nm;

新毛细管的预平衡: 碱性冲洗液, 20 psi 压力冲洗10分钟; 酸性冲洗液, 20 psi 压力冲洗5分钟; DDI Water, 20 psi 压力冲洗2分钟; Gel Buffer, 70 psi 压力冲洗10分钟。最后, 以-15 kV电压平衡10分钟。

每针之间冲洗: 碱性冲洗液, 70 psi 压力冲洗3分钟; 酸性冲洗液, 70 psi 压力冲洗1分钟; DDI Water, 70 psi 压力冲洗1分钟; Gel Buffer, 70 psi 压力冲洗10分钟。

3.2 cIEF:

分离条件: 毛细管: 中性涂层毛细管、50 μ m内径、30 /20 cm 总/有效长度; 进样: 25 psi, 99 s; 聚焦: 采用200 mM磷酸和300 mM氢氧化钠作为阳极液和阴极液, 25 kV, 15分钟; 化学迁移: 用350 mM醋酸来代替阳极液, 30 kV, 30分钟。数据采集频率: 4 Hz; 样品室温度: 10 $^{\circ}$ C; 毛细管温度: 25 $^{\circ}$ C; 窗口狭缝: 2号 (100 \times 200 μ m); UV检测器, 检测波长: 280 nm。

新毛细管的预平衡: 酸性冲洗液, 50 psi 压力冲洗5分钟; DDI Water, 50 psi压力冲洗2分钟; cIEF Gel, 50 psi压力冲洗5分钟。

每针之间冲洗: 4.3 M尿素溶液, 50 psi压力冲洗3分钟; DDI Water, 50 psi压力冲洗2分钟。

4、结果与讨论

4.1 CE-SDS法进行纯度（大小异质性）分析

CE-SDS因其分析速度快，重现性好，分辨率高，稳定性强等特点，已经成为检测蛋白类药物分析大小变异体的首选方法。药典中要求对单抗药物的还原（Reduced, R）和非还原（Non-Reduced, NR）样品进行分别检测^[6]。两种分析方法中样品均需要与十二烷基硫酸钠（sodium dodecyl sulfate, SDS）络合，但还原单抗纯度分析时需要使用巯基乙醇等还原剂将单抗结构中的二硫键断裂，形成轻链（Light Chain, LC）和重链（Heavy Chain, HC）。而非还原单抗纯度分析则需要保持二硫键稳定不断裂，故需加入巯基封闭剂对裸露的巯基进行封闭^[7]，防止游离巯基介导的链间二硫键断裂而产生碎片^[8,9]。

对于ADC药物的纯度分析，采用同药典中对单抗分析相同的分析策略，即对ADC进行还原和非还原法的纯度进行测定^[3]。

还原CE-SDS分析：

通过CE-SDS还原法谱图（图2），可推断1号峰为未偶联的轻链（含量8.03%），2号峰为偶联的轻链（含量23.13%），3号峰为偶联和未偶联的重链之和（含量64.73%），4号峰在此条件下，视为杂质（含量4.12%）。由结果可知，通过还原CE-SDS分析，能够将偶联和未偶联药物小分子的轻链实现分离^[10]。而重链上可能会偶联1至4个药物小分子，而在还原法CE-SDS谱图中并未发现偶联和未偶联重链的分离^[11]。通过1和2号峰含量的变化，可以在一定程度上反应出轻链的偶联效率，并对二者进行准确的定量。通过方法的结果我们可知，1和2号峰所代表的片段之所以能够实现分离，正是源于其偶联药物分子后分子量的差异，二者的分离度达到了1.4，能够实现1和2号峰的准确定量。而并未发现偶联和未偶联的重链得以分离，可能是由于重链分子量较大，偶联前后分子量变化在重链中体现不明显所致。

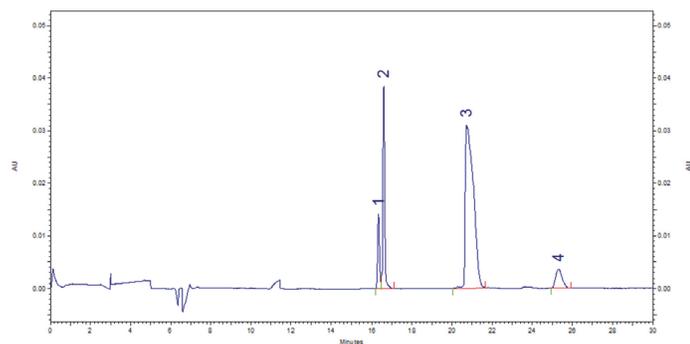


图2. 某ADC药物的还原法CE-SDS电泳谱图。电泳条件见第3节。

非还原CE-SDS分析：

由于该ADC药物是通过半胱氨酸偶联的，在进行偶联时，需利用还原剂打开抗体结构中的二硫键。因此，ADC药物会解离成多种碎片组分，且碎片类型与小分子药物的偶联位点相关。其非还原CE-SDS分析谱图见图3。根据分子量的估算，1-5号峰分别为经过偶联的轻链(LC)，重链(HC)，重轻链(HL)、重重链(HH)、重重轻链(HHL)，6号峰为完整的裸抗^[1]。

对还原和非还原谱图的峰进行分析，不仅可监测各个成分的纯度，还可反映出药物的偶联效率^[11]。如，在非还原CE-SDS中（图3），1号轻链峰为单峰，说明在非还原条件下，游离的轻链已全部偶联，还原谱图中的未偶联轻链（图2中峰1）来源于HL、HHL和完整裸抗的还原产物（图3中的3、5和6号峰）。

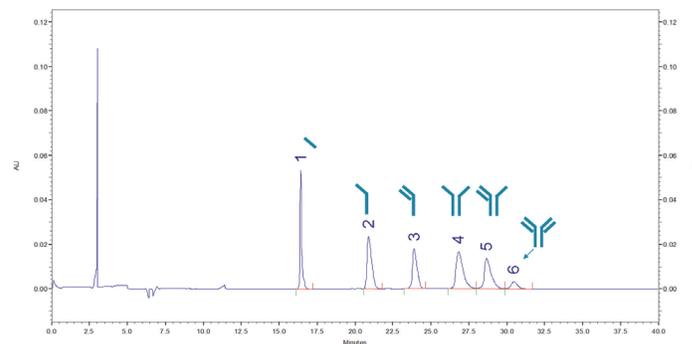


图3. 某ADC药物的非还原法CE-SDS电泳谱图。电泳条件见第3节。

4.2 CIEF法进行等电点及电荷异质性分析

如图4所示，（A）和（B）分别代表了裸抗及其对应的ADC药物。采用3个pI Marker（10.0、9.5、5.5）进行等电点的线性计算（ $R^2 > 0.999$ ），获得裸抗主峰的实测值为8.67，与根据氨基酸序列计算的理论值8.73十分接近。当通过半胱氨酸偶联药物小分子后，由于药物分子的引入以及偶联后分子结构发生了变化^[8]，所以ADC药物的等电点和电荷变异体相对于裸抗也发生了变化。以峰面积百分比含量最高的峰为主峰，则该ADC药物主峰的等电点由裸抗的8.67变化至8.10，电荷变异体的pI值范围整体向酸性移动（裸抗：8.12-8.76；ADC药物：7.48-8.89）。

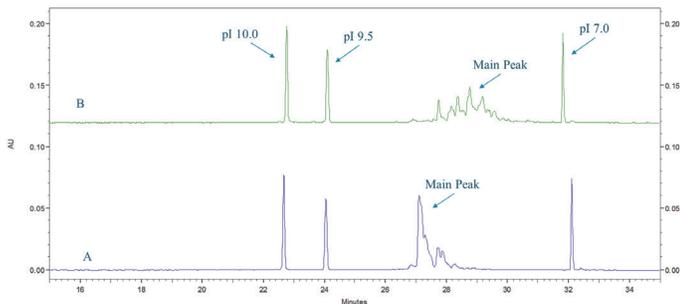


图4. 某ADC药物偶联前后的cIEF电泳谱图。(A)裸抗；(B)ADC药物。电泳条件见第3节。

5、结论

本研究建立了基于半胱氨酸偶联的ADC药物的异质性分析方法。使用CE-SDS和cIEF方法分别对其大小异质性和电荷异质性进行分析。通过还原和非还原CE-SDS的方法，对该样品进行了纯度的评价。1) 在还原条件下，偶联和未偶联的轻链可以实现高分离度的分离，并可以对这两个片段进行准确的定量分析。2) 在非还原条件下，对该类半胱氨酸偶联的ADC样品，可实现六种片段的分离和定量。3) 通过还原和非还原CE-SDS的对比分析，能够在一定程度上反映出药物的偶联效率。4) 在裸抗及其对应的ADC药物的cIEF方法分析中，通过其主峰的等电点及其电荷变异构体的变化，能够有效的监控其等电点的变化并分离ADC药物的酸碱修饰。

由于ADC药物高度复杂的异质性，我们更需要组合多种理化分析技术对其进行检测。本研究通过毛细管电泳方法的建立，实现了ADC类药物大小异质性和电荷异质性分析，对该类生物技术药物的研究和质量控制提供了参考。

参考文献

- [1] Chen T, Chen Y, Stella, C, Dedley C, Gruenhagen J, Antibody-Drug conjugate characterization by chromatographic and electrophoretic techniques, *Journal of Chromatography B*, 1032 (2016) 39-50.
- [2] Tsuchikama, K, An ZQ, Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries, *Protein&Cell*, 9 (2018) 33-46.
- [3] 王兰, 夏懋, 高凯, 抗体偶联药物的研究进展与质量控制, *中国生物工程杂质*, 34 (2019) 85-94.
- [4] Rowan E. Moore, Kelly Broster, Ken Cook, Kyle D'Silva, Eric Niederkofler, Aaron O. Bailey, Jonathan Bones, and Michael W. Dong, *Antibody-Drug Conjugates: Perspectives and Characterization*, LCGC North America, 36(2018) 362-374.
- [5] 等电点分析试剂盒说明书, Sciex, 2019。
- [6] 单抗分析大小变异体测定法(3127), 中国药典, 2015版。
- [7] Vithayathil P J, Richards F M. Modification of the Methionine Residue in the Peptide Component of Ribonuclease-S, *J Biol Chem*, 1960, 235 (8) 2343-2351。
- [8] 刘振东, 高铁, 徐玲丽, 杨勇, 王庆民, 陈泓序, 十二烷基硫酸钠毛细管电泳法分析非还原单克隆抗体药物纯度的前处理条件优化, *色谱*, 37 (2019) 666-670。
- [9] 齐连权, 韦薇, 常翠云, 白玉, 罗建辉, 抗体偶联药物及其质量研究与质量控制, *中国新药杂质*, 28 (2019) 1428-1432。
- [10] 李萌, 朱磊, 武刚, 崔永霏, 于传飞, 刘春雨, 张峰, 王文波, 陈伟, 高凯, 王兰, 抗体联药物抗CD30-VC-MMAE的异质性分析, *中国药学杂质*, 51(2016) 1091-1095。
- [11] Michael M. C. Sun, Kevin S. Beam, Charles G. Cervený, Kevin J. Hamblett, Richard S. Blackmore, Michael Y. Torgov, Felicia G. M. Handley, Nathan C. Ihle, Peter D. Senter, and Stephen C. Alley, *Bioconjugate Chem.*, 16(2015)1282-1290.

For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

Trademarks and/or registered trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd., or their respective owners, in the United States and/or certain other countries.

RUO-MKT-02-10284-ZH-A

AB SCIEX™ is being used under license.

© 2019 DH Tech. Dev. Pte. Ltd.



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

上海公司及中国区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897 网址：www.sciex.com.cn 微博：@SCIEX