

毛细管区带电泳用于半胱氨酸偶联ADC样品的电荷异质性分析

Analysis of Charge Heterogeneity in Cysteine Coupled ADC Samples by Capillary Zone Electrophoresis

唐红梅, 王文涛, 陈泓序, 罗继, 郭立海

Tang Hongmei, Wang Wentao, Chen Hongxu, Luo Ji, Guo Lihai

SCIEX, 中国;

SCIEX, China;

Key words: CZE, ADC, Charge heterogeneity

1. 前言

电荷异质性分析对于单抗以及抗体偶联药物(ADC)的表征都是非常重要的,因为它可提供有关产品的质量和稳定性的重要信息。对于单抗,中国药典中提到可采用毛细管区带电泳(CZE)、离子交换色谱(IEX-HPLC)、毛细管等电聚焦电泳(cIEF)或成像毛细管等电聚焦电(icIEF)等适当方法测定电荷变异体。单抗本身就具有复杂的异质性(如糖基化和其他翻译后修饰等),单抗本身的异质性及偶联造成的异质性的叠加会导致ADC的复杂程度大幅提高。对于具有高度异质性的ADC,需采用具有高分离度的可靠分析方法进行全面分析,并且根据小分子药物和连接体的化学性质、偶联方式(氨基偶联、巯基偶联、定点偶联等)以及产品的复杂性选择合适的特性分析方法。使用IEX-HPLC方法时,由于小分子药物多位点连接的可能性以及分析物与色谱柱固定相之间潜在的非特异性相互作用,会导致样品分离度降低;而cIEF或icIEF方法中需要使用预混液,预混液中存在一些其他试剂可能会对ADC样品有影响导致分离重复性不稳定。而毛细管区带电泳(CZE)方法根据电荷与体积之比的差异对样品进行分离,具有分离度高、前处理简单、对样品影响小等特点,可用于半胱氨酸偶联的ADC样品电荷异质性分析。

本文通过使用CZE试剂盒方法,可以快速的对半胱氨酸偶联的ADC样品电荷异质性进行有效分析,并对CZE方法的稳定性进行了考察,得到了高分离度和高重现性的分离结果。

2. 实验部分

2.1 实验试剂和样品信息

实验试剂: CZE试剂盒(SCIEX, PN C44790), 包含0.1M HCl, CE Grade Water (SCIEX, PN C48034), CZE Rapid Charge Variant Separation buffer, 蛋白质测试混合物; 按照试剂盒说明书制备相应浓度的试剂。

样品: 半胱氨酸偶联的ADC样品(Enhertu)由某生物制药公司提供, DAR值为8, PI 7.9, 浓度20.0 mg/mL;

2.2 样品前处理

Enhertu样品溶液制备: 用CE Grade Water将样品稀释至1 mg/mL, 取100 μ L放入到PCR管中, 作为待测溶液。

2.3 仪器及方法

CZE方法实验条件: 采用是PA 800 plus生物制药分析系统, UV检测器, 采集频率: 4 Hz, 采集波长214 nm; 非涂层毛细管, 50 μ m内径, 50/ 60.2 cm(有效长度/总长度); 毛细管温度: 25 $^{\circ}$ C; 样品室温度: 15 $^{\circ}$ C; 进样条件: 0.5 psi, 20 s; 分离条件: 25 kV, 35 min。

毛细管预冲洗: 序列运行前毛细管先用0.1 N HCl进行50 psi冲洗5 min, 再用CZE buffer进行50 psi冲洗5 min。每次运行开始时, 0.1 N HCl进行30 psi冲洗1 min, 再用CZE buffer进行30 psi冲洗2 min。

3. 结果与讨论

3.1 Enhertu样品CZE方法分离结果

本文采用Enhertu样品进行了电荷异质性分析，毛细管电泳分离结果如下图1所示，通过谱图可以看出样品电荷异质性较强，其中PK#3,4是主峰，主峰校正峰面积比例(CAP)为67.68%，PK#1,2是碱性峰，校正峰面积比例为8.49%，PK5,6,7为酸性峰，校正峰面积比例为23.83%。

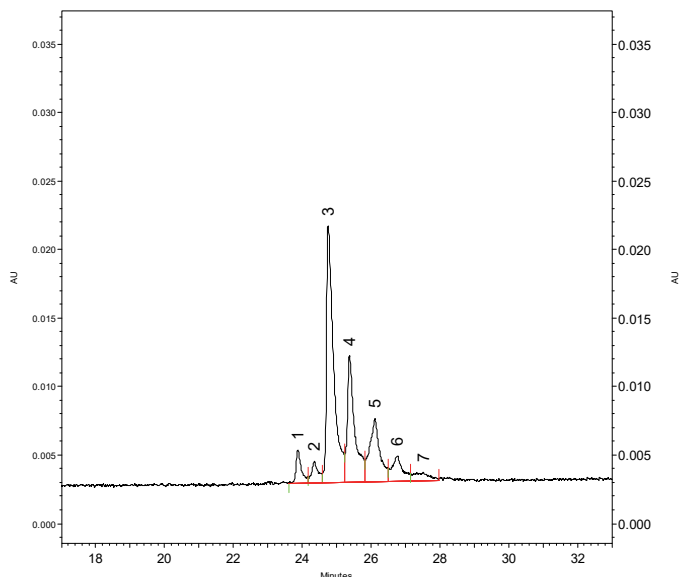


图1. Enhertu样品CZE电荷异质性分析的电泳图

3.2 Enhertu样品CZE方法重复性考察

对同一样品管的Enhertu样品进行连续6针重复，统计每1针中主峰，碱性峰，酸性峰的迁移时间和校正峰面积，考察样品连续进样6针的重复性，实验结果电泳图见图2；主峰，酸性峰，碱性峰CAP的RSD值< 5.0%，并且主峰迁移时间(MT)的RSD值< 0.5%，统计结果见表1；实验结果表明半胱氨酸偶联的ADC样品连续6针进样重复性良好，CZE方法可用于半胱氨酸偶联的ADC样品电荷异质性的分析。

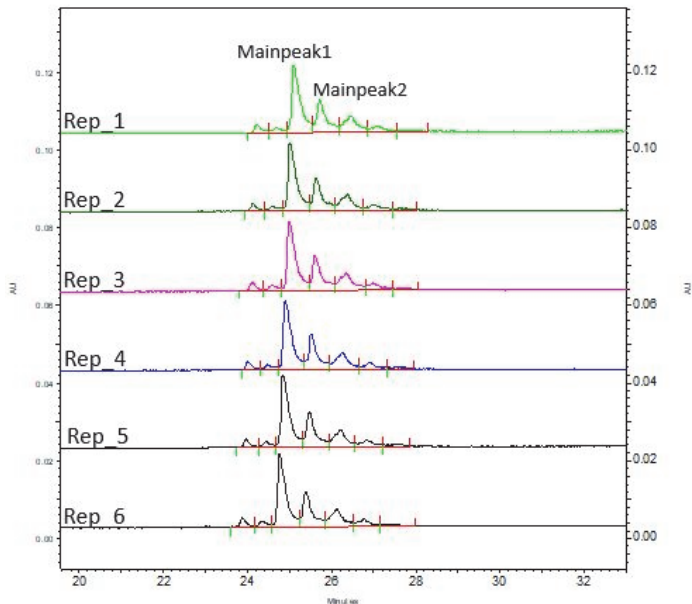


图2. Enhertu样品6针重复性电泳图

表1. Enhertu样品连续6针进样重复性结果(n=6)

序号	碱性峰 CAP %	主峰CAP %	主峰1 MT (min)	主峰2 MT (min)	酸性峰 CAP %
Rep-1	8.49	67.68	24.75	25.38	23.83
Rep-2	8.23	66.95	24.84	25.46	24.83
Rep-3	8.06	68.72	24.89	25.50	23.22
Rep-4	8.54	68.27	24.98	25.60	23.19
Rep-5	8.31	69.16	25.00	25.62	21.35
Rep-6	8.41	68.52	25.09	25.71	23.07
RSD %	2.13	1.15	0.49	0.47	4.89

4. 结论

本文借助于PA 800 plus生物制药分析系统以及CZE试剂盒方法对半胱氨酸偶联的Enhertu样品电荷异质性进行了分析，主要结论如下：

1. CZE方法分离度高，能够把样品中碱性峰、主峰、酸性峰明显分离，适用于半胱氨酸偶联的ADC样品电荷异质性的分析；
2. CZE方法重复性良好，适用于半胱氨酸偶联的ADC样品电荷异质性分析；同一样品连续6针进样重复性好，主峰迁移时间的RSD值均<0.5%，主峰，酸性峰，碱性峰CAP的RSD值<5.0%；

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-33642-A



SCIEX中国

北京分公司
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
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7201
传真：021-2419-7333
官网：sciex.com.cn

广州办公室
广州国际生物岛星岛环北路1号
B2栋501、502单元
电话：020-8842-4017

官方微信：[SCIEX-China](#)