

## Unagi 与 Stunner 携手实现 ADC 偶联、纯化和表征

### 简介

抗体药物偶联物 (ADCs) 是一种由三种主要成分组成的分子：单克隆抗体 (mAb)、连接子和小分子药物。制备和优化 ADC 需要在测试不同成分组合和反应条件时，仔细进行样品制备和表征；纯化这些新合成的 ADC，并将其从反应缓冲液转移到储存缓冲液中，为此流程增加了额外的工作。在整个过程中，密切关注抗体浓度、检查药物—抗体比 (DAR)、以及聚集现象至关重要。

在有許多不同的组分和反应条件需要测试时，去除 ADC 中与药物连接子相关的杂质可能会造成麻烦。基于树脂的方法，如色谱或脱盐，需要多次洗涤以平衡缓冲液并且总会稀释样品，增加了已经冗长的实验步骤。离心过滤器可能会导致死端过滤，并使样品在膜上不均匀浓缩，进而引发聚集。切向流过滤 (TFF) 对于大型实验效果良好，但它是一种低通量方法，难以用于小试和实验室研究。

Unagi (图 1A) 填补了其他方法的不足，可同时处理多达 8 个样品，采用免手动操作的自动化方式，防止稀释和死端过滤，从而能够进行严格控制的纯化、缓冲液置换和浓缩步骤。对已制备的 ADC 进行表征通常需要结合多种 HPLC 方法。然而，HPLC 往往耗时过长、样品需求量大，或需要过多优化才能适用于每个候选物。Stunner (图 1B) 仅使用 2  $\mu\text{L}$  的样品，通过 UV/Vis 吸收来同时测定多达 96 个样品的浓度和 DAR。在表征过程中，Stunner 还通过动态光散射 (DLS) 检测 ADC 的粒径和粒径分布，从而识别聚集体。

A



B



图 1: Unagi (A) 是您的自动化台式缓冲液置换解决方案。Stunner (B) 是一款可以在  
同个 2  $\mu\text{L}$  样品上同时获取 UV/Vis 和 DLS 数据的板式系统。

在这项研究中，我们将一种 mAb 与 3 种药物/连接子组合按 2 种摩尔比进行偶联，合成了 6 种 ADC 模型。与药物相关的杂质通过 Unagi 上的自动化缓冲液置换和过滤被去除 (图 2)，并在 Stunner 上对所有 ADC 进行了表征。Stunner 使用 Unmix 算法和用户存储的参考光谱，将总的 UV/Vis 吸收光谱解卷积为各组成部分 (图 3)。通过这些解卷积后的光谱，Stunner 可以定量总蛋白质和药物载量，并用这些数据计算偶联物的 DAR (药物—抗体比)。

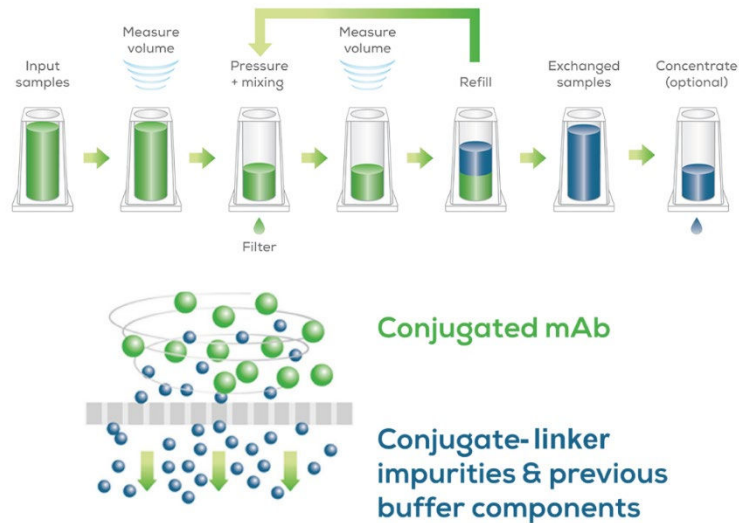


图 2：Unagi 的自动化压力驱动超滤/透析 (UF/DF) 技术使用超声波体积测量来监控流速，并根据每个样品调整压力和循环时间。样品体积测量可以实现精确的目标置换百分比和浓缩倍数，因为在每个循环中截留物的量都已知。偶联的 mAb 或 ADC 被保留，而多余的未反应偶联分子以及之前的缓冲液成分被过滤掉。在每个缓冲液置换步骤中，新的缓冲液会添加到孔中。

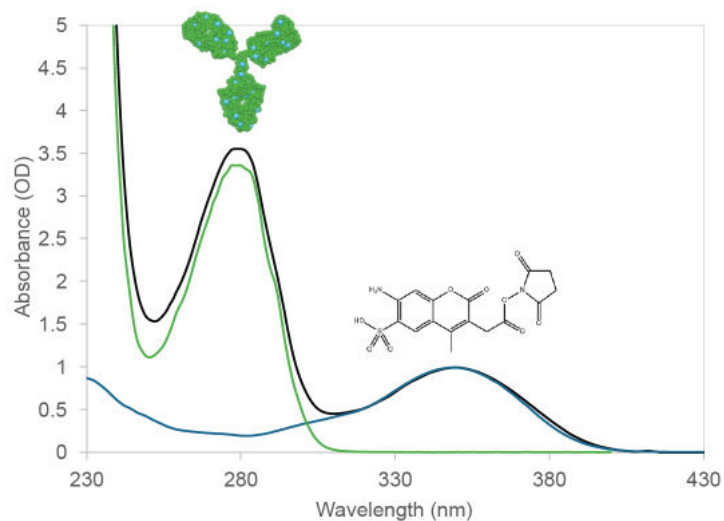


图 3：Stunner 中的 Unmix 算法让您可以使用自己测量的光谱，将 ADC 的总体吸收光谱（黑线）解卷积为来自 mAb（绿线）和药物或偶联分子（蓝线）的贡献。在这个例子中，我们展示了与 Alexa Fluor™ 350 NHS 酯偶联的 mAb 的总吸收光谱和解卷积后的光谱。

## 方法

### 单克隆抗体制备

将 26.6 mg/mL 的人源 mAb 在 5 mM 琥珀酸钠、60 mM 海藻糖、pH 5.0 的缓冲液中稀释至 10 mg/mL，并以 14,000xg 离心。将上清液通过 0.1  $\mu$ m 注射器过滤器过滤。将 1.1 mL 的分装样品置换至 50 mM 硼酸盐缓冲液，pH 8.5，100 mM 碳酸氢盐缓冲液，pH 8.3，或 1X 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中。关键的缓冲液置换参数见表 1。初始和最终的蛋白质浓度、粒径和多分散指数 (PDI) 在 Stunner 上以四次重复进行检查。

Parameter	Setting
Mixing speed	700 rpm
Pressure	60 psi
Target % exchange	96%
Target volume removed per cycle	50%
Initial concentration	10 mg/mL
Initial well volume	1.1 mL
Target final concentration	10 mg/mL
Target final well volume	1.1 mL

表 1: 用于 mAb 缓冲液置换的关键缓冲液参数，使用了 10 kDa 分子量截留 (MWCO) 的 Una

### 抗体偶联和纯化

荧光素异硫氰酸酯 (FITC, Thermo Fisher 46425)、Alexa Fluor™ 350 (AF350) NHS 酯 (Thermo Fisher A10168) 和 AF350 C5 马来酰亚胺 (Thermo Fisher A30505) 在 dimethyl sulfoxide (DMSO) 中溶解至 10 mg/mL。将这些染料按染料与蛋白质的摩尔比 2:1 或 10:1 加入到表 2 中指示的缓冲液中的 0.5 mL mAb 溶液中。

在马来酰亚胺反应中加入 100  $\mu$ g 的三-(2-羧乙基)磷 (TCEP, Thermo Fisher T2556) 作为还原剂。反应混合物在室温下孵育 1 小时，并保护免受光照。

孵育后，将 6 组反应混合物稀释至 1 mL，并通过 Unagi 换液至 PBS。关键的缓冲液置换参数见表 3。初始和最终的蛋白质浓度、药物—抗体比 (DAR)、粒径和多分散指数 (PDI) 在 Stunner 上以四次重复进行检查。

Buffer	Conjugate	Molar ratios
50 mM borate, pH 8.5	Fluorescein isothiocyanate (FITC)	2:1 and 10:1
100 mM bicarbonate, pH 8.3	Alexa Fluor™ 350 NHS Ester	2:1 and 10:1
PBS	Alexa Fluor™ 350 C5 maleimide	2:1 and 10:1

表 2：用于 mAb 偶联反应的染料/缓冲液组合及摩尔比。

Parameter	Setting
Mixing speed	700 rpm
Pressure	60 psi
Target % exchange	96%
Target volume removed per cycle	50%
Initial concentration	5 mg/mL
Initial well volume	1 mL
Diluent volume	1 mL
Target final concentration	10 mg/mL
Target final well volume	0.5 mL

表 3：用于 ADC 纯化和缓冲液置换的关键参数，在 10 kDa MWCO 的 Una 中进行。Unagi 的预稀释和浓缩功能在缓冲液更换开始时自动将每个样品稀释至 2 mL，并在结束时浓缩至 0.5 mL。

### ADC 定量与粒径测定

将 10 mg/mL 每种染料的 DMSO 溶液以 1:9 比例稀释至 PBS，然后在 90% PBS 和 10% DMSO 中制作 2X 稀释系列。使用 Stunner 的 Store Analyte 应用测量每种染料稀释系列的吸光度，并保存光谱。mAb 的光谱也以相同方式保存。消光系数 (E1%<sub>1cm</sub>) 通过生产商的文档或储备液的浓度确定。保存的染料和 mAb 光谱与 ADC + Sizing 应用程序联用，以确定每个样品的浓度、DAR、粒径和多分散指数 (PDI)。DLS 采集设置为每次 1 秒的 5 次采集，并使用软件的离群值自动排除功能。

## 结果

使用不同药物-连接子的化学反应偶联 ADC 通常需要先将前体 mAb 置换到不同的反应缓冲液中，具体取决于偶联化学的要求。例如，FITC 和 NHS 酯需要碱性 pH 的反应缓冲液来标记赖氨酸残基和蛋白质的 N 端。在 Unagi 上，这个缓冲液置换仅需要几分钟的动手操作时间和不到 1 小时的自动处理时间。最终的浓度与目标值 10 mg/mL 以内的误差不超过 5%，且样品回收率超过 90% (图 4)。

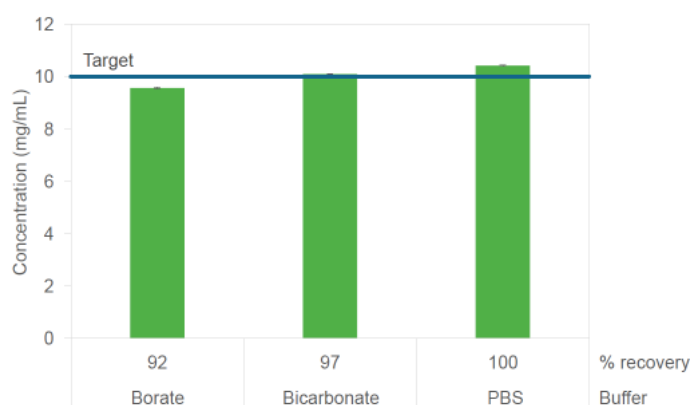


图 4: Unagi 缓冲液置换后，每种反应缓冲液中 mAb 的蛋白质浓度 (A280) 及其回收率。误差线表示 1 个标准偏差。

将 mAb 更换到新缓冲液后检查 mAb 的质量非常重要，特别是要确认是否发生了聚集。各反应缓冲液中的 mAb 粒径和 PDI 指标表明没有发生聚集 (图 5)。在每种情况下，10–12 nm 的水动力直径与预期的抗体大小一致。PDI 值小于 0.1 也表明所有样品都是单分散的。

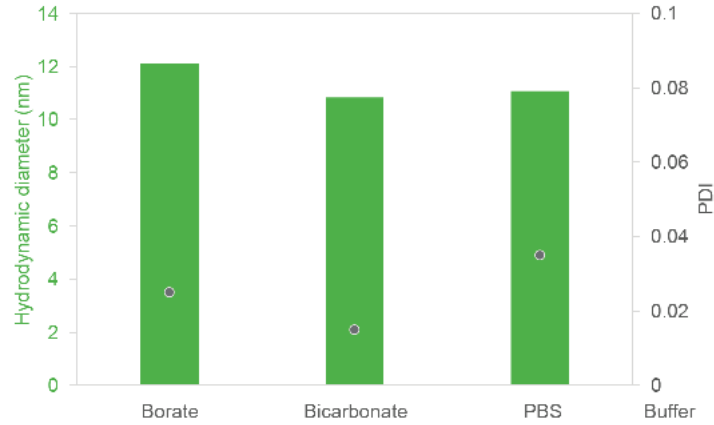


图 5: Unagi 缓冲液置换后, 3 种反应缓冲液中 mAb 的 Z 平均直径 (绿色柱, 左 y 轴) 和 PDI (灰色点, 右 y 轴)。

为了通过 UV/Vis 分析 ADC 的光谱, 必须区分抗体的吸收光谱与偶联药物的吸收光谱。然而, 不同药物的光谱可能会显著差异, 因此仪器需要足够智能以跟上变化。Stunner 可以通过其 Store Analyte 功能从药物的稀释系列中学习化合物的吸收光谱。为说明这一点, 我们在 Stunner 上存储了 FITC 的光谱 (图 6), 并将其与存储的 mAb 光谱一起用于分析一个以 10:1 FITC—蛋白质摩尔比反应的 mAb 样品, 该样品已在 Unagi 上进行纯化。Stunner 使用存储的光谱来分解抗体和所偶联 FITC 的吸光度, 并结合 mAb 和 FITC 的 E1% 值, 确定每种成分的浓度。这些浓度的比值就是 DAR。将此方法应用于不同药物、连接子和摩尔比, 有助于优化任何 ADC 的反应条件。

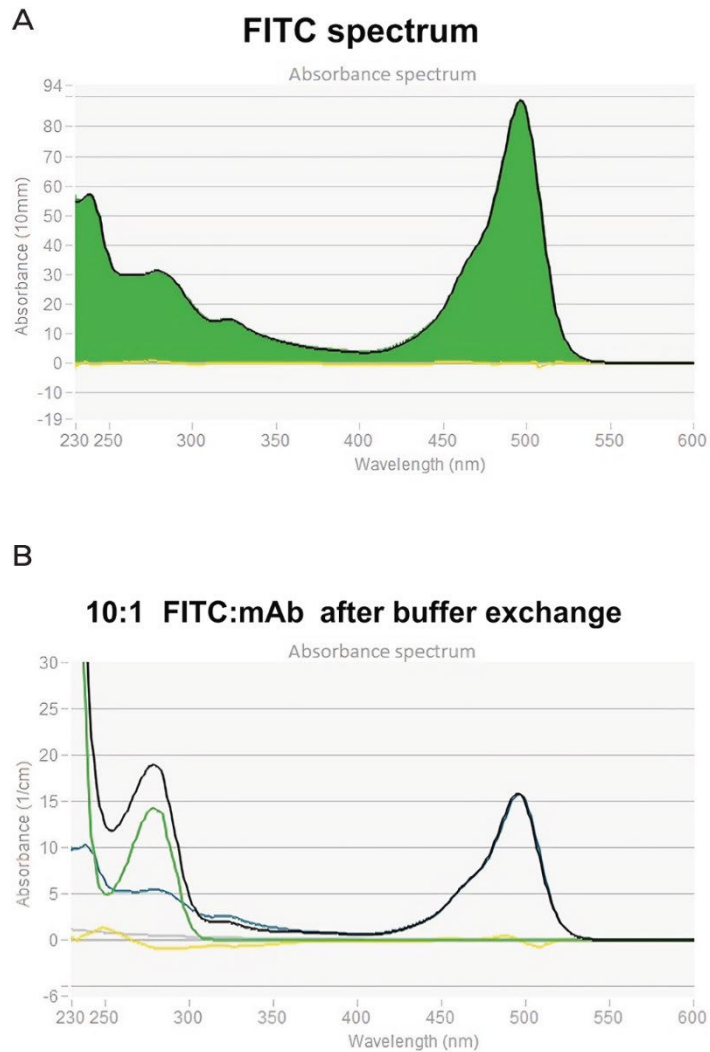


图 6: 通过 Stunner 的 Store Analyte 功能从稀释系列中获取的 FITC 的 UV 光谱 (A)。运行 ADC 时, 可以将总吸光度 (黑色) 分解为抗体的吸光度 (绿色)、FITC 的吸光度 (蓝色) 以及每个波长的残余误差 (黄色)(B)。

更改药物一连接子与 mAb 的摩尔比会影响 ADC 的 DAR, 但反应速率和靶残基的丰度也会产生影响。优化 ADC 的偶联反应条件以实现目标 DAR 是 ADC 工艺开发的重要组成部分。通过在 Stunner 上分析 Unagi 纯化之前和之后的反应混合物, 我们可以看到纯化步骤的效果, 评估反应效率, 并找到每种染料的目标 DAR 的正确摩尔比 (图 7)。

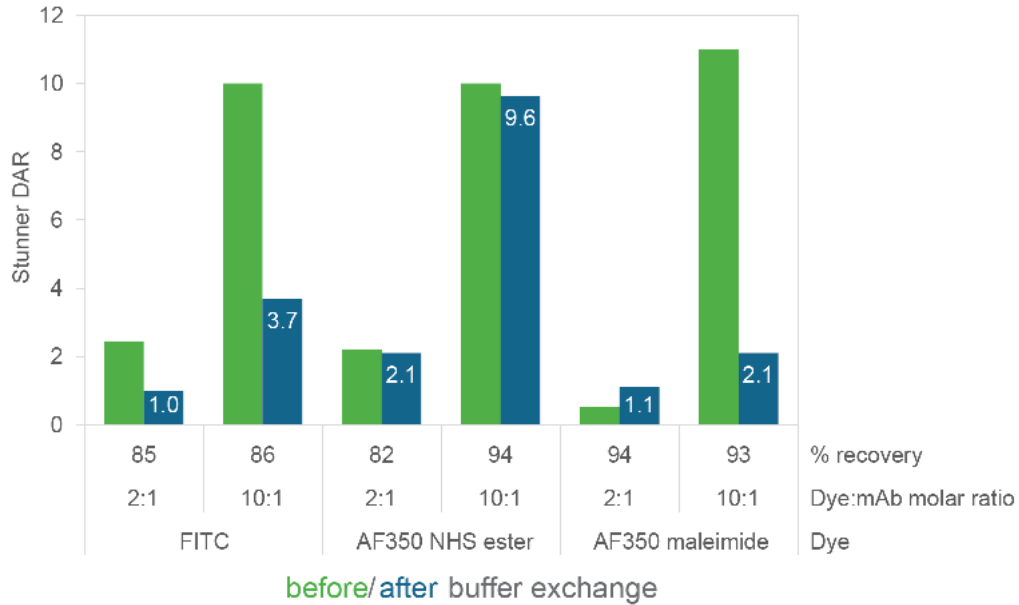


图 7：在 Unagi 纯化和缓冲液置换至 PBS 之前（绿色）和之后（蓝色带白色标签），以 2:1 和 10:1 染料与蛋白质摩尔比标记 FITC、AF350 NHS 酯或 AF350 马来酰亚胺的 mAb 的 DAR。图中还显示了经过 Unagi 纯化和缓冲液置换后，偶联 mAb 的回收百分比。

通过比较缓冲液置换前（图 7 绿色柱）和缓冲液置换后（蓝色柱）的 DAR，可以了解反应是否发生以及纯化步骤的效果。如果染料没有与 mAb 发生反应，96% 的染料会与其他缓冲液成分一起从溶液中被移除。如果出现这种情况，Stunner 报告的 DAR 将是初始值的约 4%。通常，缓冲液置换后的 DAR 高于该阈值，但仍低于 Unagi 处理前测量的值，这表明标记反应有效，Unagi 仅去除了未反应的染料。缓冲液置换后，只有 2:1 马来酰亚胺样品的 DAR 增加了，这很可能是由于在 Unagi 处理前测量中样品混合不足所致。Unagi 置换非常温和且完全由用户控制，因此最终产物的浓度符合预期，不会像树脂法那样被稀释。

即使使用相同的药物，不同的连接子和偶联化学方法不可避免地会导致反应效率的差异。例如，AF350 NHS 酯标记的 mAb 在两种摩尔比下纯化后都具有较高的 DAR，表明反应更加高效。AF350 酯和马来酰亚胺反应效率的差异可能是由于它们的化学性质不同：酯与胺基反应，而马来酰亚胺与巯基反应。测试不同的连接子的目标之一是找到能够达到目标 DAR、浓度和回收率的药物、连接子和 mAb 组合。

达到目标 DAR 和良好的回收率很重要，但如果 ADC 聚集，这一切都没有意义。无论是蛋白质相关还是药物—连接子相关，DLS 都可用于检查生物分子是否存在聚集现象。ADC 模型的水动力学直径与未偶联的 mAb 相等或略高（图 8）。具有 10:1 摩尔比的样品的直径比具有相同药物—连接子的 2:1 样品更大。结合这些观察结果，表明偶联增加了 ADC 分子的大小。Unagi 上的样品纯化通常会降低 ADC 的 PDI，因为在去除药物—连接子杂质后，样品更为均一。基于 0.15 的 PDI，10:1 FITC:mAb 样品可能发生了聚集，但其他样品的 PDI 和水动力学直径都足够低，表明在偶联或缓冲液置换过程中，ADC 没有发生聚集。

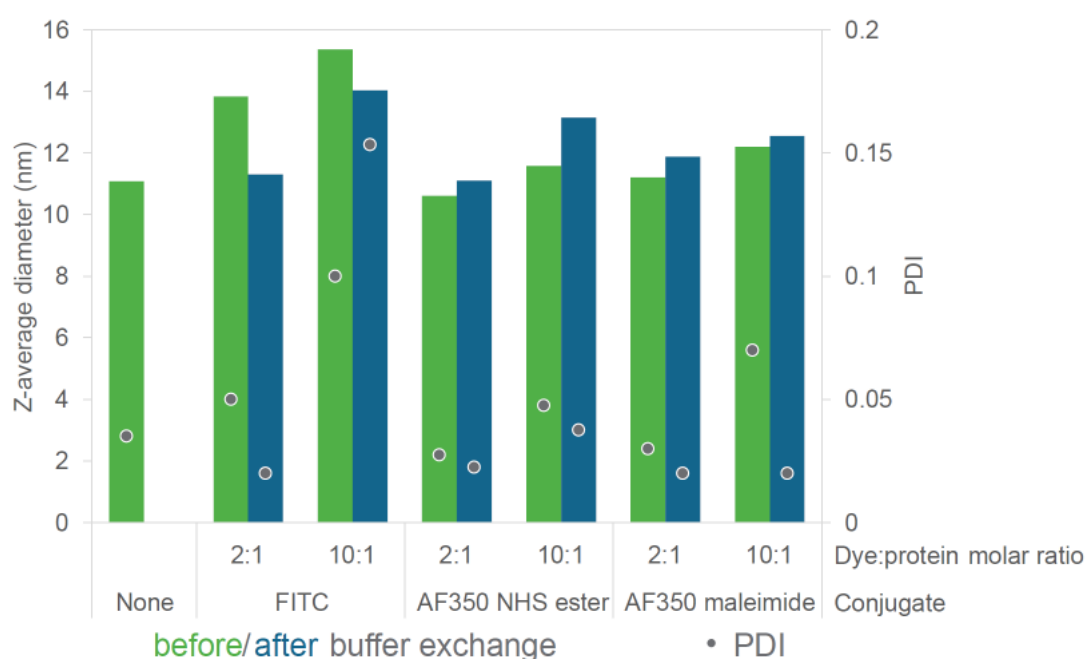


图 8：用 FITC、AF350 NHS 酯或 AF350 马来酰亚胺标记的 mAb 的 Z 平均直径（柱形图，左 y 轴）和 PDI（点图，右 y 轴），在 2:1 和 10:1 染料与蛋白质摩尔比反应前（绿色）和反应后（蓝色）由 Unagi 纯化并缓冲液置换至 PBS。还提供了在 PBS 中未反应 mAb (None) 的结果作为对比。

## 结 论

ADC 的制备和表征是复杂的挑战，可能与 ADC 自身的结构一样复杂。Stunner 能够以快速、低体积、高通量的形式定量抗体浓度、DAR、粒径和粒径分布。Unagi 适用于需要缓冲液置换以准备样品、浓缩偶联反应产物或在之后纯化的任何 ADC——能够自动化处理样品，使科学家能够将精力投入到其他实验室工作中。

## 参考文献

- 1 Drug-to-Antibody Ratio (DAR) by UV/Vis Spectroscopy. Y Chen. In: Ducry L, ed. Antibody-Drug Conjugates. Totowa, NJ: Humana Press; 2013:267-273.
- 2 Photoinduced Aggregation of a Model Antibody-Drug Conjugate. GM Cockrell, et al. Molecular Pharmaceutics. 2015; 12(6):1784-1797.



**Unchained Labs**  
4747 Willow Road  
Pleasanton, CA 94588  
Phone: 1.925.587.9800  
Toll-free: 1.800.815.6384  
Email: [info@unchainedlabs.com](mailto:info@unchainedlabs.com)

© 2024 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner, Unagi, the Stunner logo, the Unagi logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A