

摘要

ADC偶联工艺中，游离小分子杂质的深度清除与偶联反应特异性控制是关键挑战。针对mc-GGFG-DXd等疏水性载荷易形成胶束、传统超滤难以去除的难题，本文采用了一种新型深层过滤工艺，能显著提升清除效率并降低成本。此外，针对半胱氨酸偶联中马来酰亚胺连接子的非特异性副反应，智享生物通过调控偶联pH这一关键参数，在保证高效偶联的同时有效抑制了杂质生成。智享生物的全方位偶联技术平台为应对各类工艺挑战提供了高效、可放大的解决方案。

案例分享

案例1：马来酰亚胺连接子在半胱氨酸偶联过程中的非特异性偶联控制

半胱氨酸偶联是指连接子的马来酰亚胺基团和抗体被还原的半胱氨酸中的游离巯基通过迈克尔加成反应将小分子偶联到抗体上。偶联反应pH通常是偏中性，例如pH 6.5-7.5，且反应速度非常快，通常在15min内即可完成反应。因马来酰亚胺与巯基的极高的反应选择性，使得马来酰亚胺很难与抗体分子上的其他基团发生副反应，例如氨基、羟基。但是这不代表马来酰亚胺基团不能与抗体上的其他基团发生副反应，只是副反应相比主反应发生的程度不同。因小分子比例相对抗体是过量的，增加了副反应发生的可能性。如下图所示，当发生副反应时，在RP-DAR值检测图谱中表现为H3（重链偶联3个小分子）主峰之后出现多个新的组分。

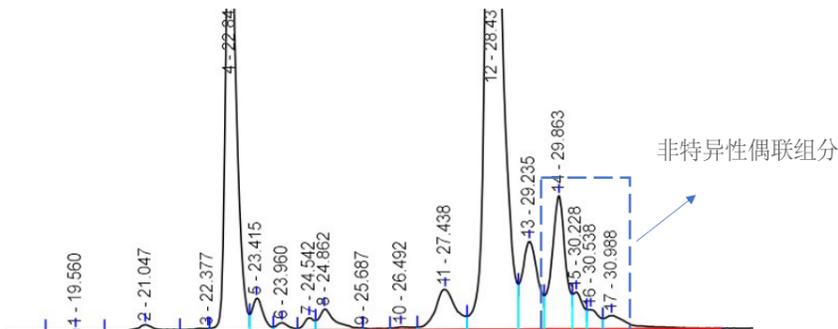


图2：ADC谱图中非特异性偶联组分优化前

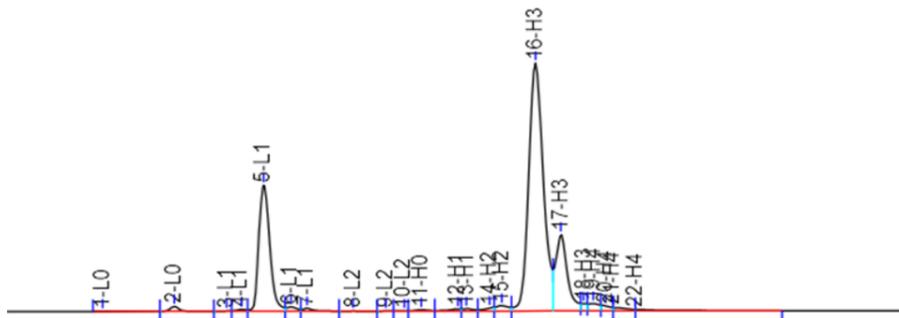


图3：ADC谱图中非特异性偶联组分优化后

为了保证足够的偶联效率，小分子相对抗体必须是过量的，所以通过降低小分子当量控制非特异性偶联的发生可能影响产品质量，尤其是DAR值。我们研究了各种偶联工艺参数对非特异性偶联的影响，包括偶联时间、pH、小分子当量、温度、有机溶剂比例等，发现偶联pH是显著影响非特异性偶联的一个参数（如图3所示），且发现对于容易发生非特异性偶联的小分子，其在偏酸性条件下的反应速度和偶联效率并未受影响，但是即使在小分子当量更高的条件下，也能够显著降低非特异性偶联的现象（如图4所示）。

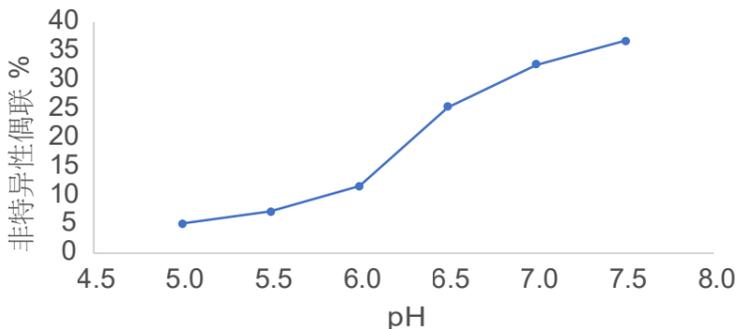


图4：ADC谱图中非特异性偶联效率

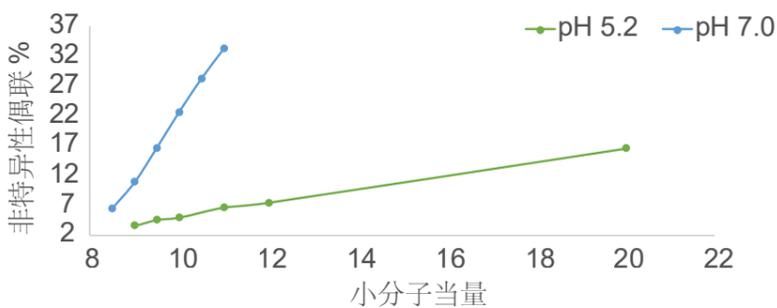


图5：非特异性偶联&小分子当量

案例2：游离小分子及相关杂质的去除挑战与解决方案

游离小分子属于工艺相关杂质，其残留被评估为ADC产品的关键质量属性（CQA），需要控制在非常低的水平。对于mc-VC-PAB-MMAE、SMCC-DM1类小分子，可选择制剂缓冲液进行小分子的去除，但是对于mc-GGFG-DXd类小分子，因其溶解度更差，且小分子自身会表现出类似于表面活性剂的性质，形成分子尺寸更大的胶束而难以透过平均孔径仅有30 kDa的膜包，即使换液20 DV，甚至更多，也难以将小分子去除至符合质量标准。

柠檬酸缓冲液或者含有5%-10%比例有机溶剂的缓冲液可以增加小分子溶解度或者破坏胶束从而达到快速去除小分子的效果，但是仍然需要不少于12 DV的换液倍数。同时，还需要额外的超滤换液将产品置换至储存缓冲液中，导致物料成本的成倍增加。

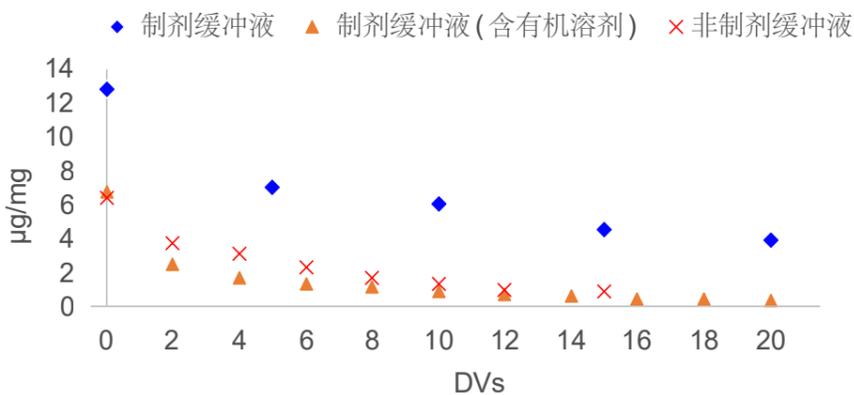


图6：杂质残留&洗滤倍数

智享生物针对上述小分子难以去除的难题，开发了一种适用于上述难以去除的小分子的深层过滤工艺平台。仅通过一步深层过滤就可以将小分子去除至低于超滤换液10倍的水平，同时极大地降低了物料成本，缩短了工艺时长。

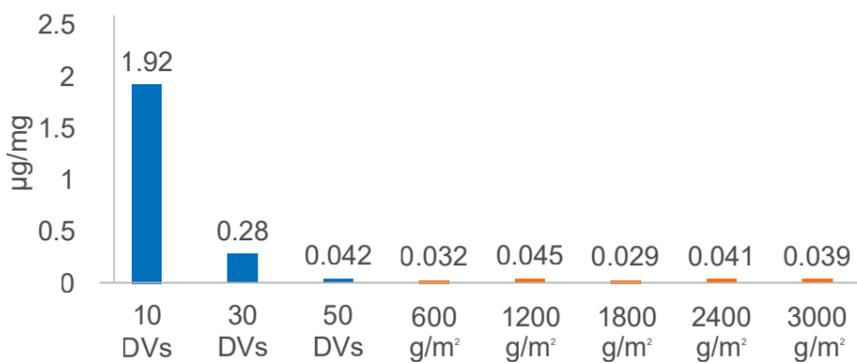


图7：吸附深层过滤 & 超滤 / 洗滤的杂质去除能力对比

结论

智享生物已搭建的智享偶联一体化平台包括：赖氨酸偶联、半胱氨酸偶联、二硫键偶联，工程化半胱氨酸偶联、糖基定点偶联偶联、Sortase酶促定点偶联。针对不同的偶联技术设计不同的工艺路线，对偶联工艺和纯化工艺中影响产品关键质量属性的非体积依赖和体积依赖的工艺参数进行优化，找到关键工艺参数及范围，并进行毫克、克、几十克规模的逐级放大达到对工艺的最终确认。

