

LC-MS 法对抗 PD-1 信迪利单抗药物分子 铰链区序列改构稳定性的研究

于传飞¹, 曹兴军², 王文波¹, 倪海晴², GUO Amy Y², 王 兰^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629; 2. 信达生物制药(苏州)有限公司, 江苏 苏州 215123)

摘要: 抗体药物目前已成为治疗自身免疫性疾病及肿瘤等多种疾病的重要创新药物。以 IgG4 为框架开发的抗体药物面临的挑战之一是野生型 IgG4 的铰链区不稳定, 容易发生铰链区 Fab 臂交换现象。将 IgG4 分子的铰链区序列-CPSC-(野生型 IgG4) 改构成-CPPC-(改构型 IgG4) 是降低铰链区交换和提高 IgG4 类分子稳定性的有效手段。信迪利单抗(sintilimab) 是用于肿瘤免疫治疗的全人源抗 PD-1 抗体, 采用 IgG4 分子框架并对其铰链区序列进行了改构(S228P)。利用 LC-MS 检测方法从体外(PBS 和人血清)到动物体内(SCID 小鼠)对改构后的铰链区稳定性进行了评估。结果表明, LC-MS 作为一种简便快速的方法可以有效地检测体外和体内 IgG4 分子的 Fab 臂交换反应, 经 IgG4 分子改构后的信迪利单抗结构稳定, 避免了 Fab 臂的交换现象。

关键词: IgG4; Fab 臂交换; LC-MS; PD-1; 信迪利单抗

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0122-08

LC-MS analysis of sintilimab as an anti-PD-1 therapeutic mab for its improved hinge stability study

YU Chuan-fei¹, CAO Xing-jun², WANG Wen-bo¹, NI Hai-qing², GUO Amy Y², WANG Lan^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China;

2. Innovent Biologics Suzhou Co. Ltd, Suzhou 215123, China)

Abstract: Monoclonal antibodies (mAbs) have been widely used as therapeutic drugs for treating diseases such as cancers and auto-immune diseases. When using an IgG4 isotype, one of the challenges is the instability of its hinge which is prone to Fab-arm exchange (FAE). The hinge sequence of a wild type IgG4 is -CPSC-, however, a single point mutation S228P from -CPSC- to -CPPC- can effectively diminish FAE, thereby improving hinge stability of the IgG4 molecule. Sintilimab is the fully human anti-PD-1 monoclonal antibody designed and developed for immuno-oncology, in which serine 228 in the hinge was engineered to proline to mitigate FAE. In this study, LC-MS is used to study hinge stability of sintilimab in both *in vitro* (PBS and human serum) and *in vivo* (SCID mouse) studies. The studies demonstrate that LC-MS is a fast and simple way to monitor for the occurrence of FAE *in vitro* and *in vivo*, and FAE can be eliminated by antibody engineering with a single point mutation.

Key words: IgG4; Fab-arm exchange; LC-MS; PD-1; sintilimab

抗体药物作为一种具有独特优势的生物靶向治疗

药物, 以其高特异性、有效性和安全性的特点, 已成为近年来全球研发的热点。随着抗体药物临床适应症的不不断扩大, 在许多重大疾病的治疗中逐步发挥了不可取代的作用。2017 年全球抗体市场规模首次突破千亿美元, 占据全球药物市场总销售额的十分之一, 已成为医药产业一个重要的细分领域和增长点。2017 年

收稿日期: 2018-06-21; 修回日期: 2018-08-03.

基金项目: 中国医学科学院中央级公益性科研院所课题 (2017PT31041);
重大新药创制科技重大专项-创新生物技术药评价及标准化
关键技术研究 (2018ZX09101001-004).

*通讯作者 Tel: 86-10-53852159, E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0574

艾伯维公司 (Abbvie) 的修美乐 (Humira®) 以 184 亿美元的年销售额成为“全球药王”。抗体药物已成为整个制药行业中发展最快的领域之一, 截止 2017 年 FDA 已经累计批准上市了 70 多个抗体药物, 目前开发的抗体药物中已经有 550 多种处于临床研发阶段, 超过 50 个已进入了临床 III 期研究阶段。

目前临床在研的治疗性抗体药物中均为 IgG 类型, 主要为 IgG1、IgG2 和 IgG4 亚型。具体选择何种 IgG 亚型作为抗体药物框架开发, 主要根据抗体作用机制和取决于 Fc 介导的效应功能^[1], 如 ADCC (antibody dependent cellular cytotoxicity, 抗体依赖的细胞毒作用) 效应和 CDC (complement dependent cytotoxicity, 补体依赖的细胞毒作用) 效应。效应功能与 IgG 和 Fc 受体 FcγR 等的亲和力相关, 其顺序为 IgG1 > IgG4 > IgG2^[2-4]。目前市场上的治疗性抗体药物绝大多数为 IgG1 类型, 若针对膜抗原, 则可以发挥抗体介导的 ADCC 效应和 CDC 效应。而像近年发展较快的针对肿瘤免疫检查点 (check point) PD-1 和 PD-L1 的抑制性抗体, 其作用机制是以抗 PD-1 和 PD-L1 抗体阻断 PD-1/PD-L1 信号通路, 解除对 T 细胞的抑制, 从而杀伤肿瘤细胞, 作用机制不同于以往抗肿瘤抗体依赖 ADCC 等活性杀伤肿瘤细胞的机制^[5,6], 因此已上市的抗 PD-1 抗体 nivolumab (Opdivo®)、pembrolizumab (Keytruda®) 在设计时均采用了 ADCC 活性弱的 IgG4 亚型, 而 Roche 的 PD-L1 抗体 atezolizumab (Tecentriq®) 虽然采用了 IgG1 亚型但突变除去了糖基化位点, 消除了 ADCC 活性^[7,8]。选择 IgG4 分子作为治疗性抗体药物开发的框架, 一个潜在的风险就是野生型 IgG4 分子存在潜在的 Fab 臂交换 (FAE, Fab-Arm Exchange), 导致分子铰链区的稳定性问题。IgG4 与 IgG1 在铰链区二硫键稳定性有所不同; IgG4 在铰链区的序列为 -CPS²²⁸C-, 相比 IgG1 的 -CPP²²⁸C-, IgG4 两条重链间的二硫键倾向于重排, 首先形成半抗体分子 (half molecule) 的结构, 然后两个半抗体分子通过 CH3 区域的非共价相互作用在天然非变性状态下仍然结合在一起; 在还原性环境中, 两个不同的 IgG4 半分子分开, 重排并发生二硫键氧化 (经历 Redox 过程) 形成 Fab 臂交换, 形成双特异抗体形式^[9,10]。研究表明, 通过铰链区突变 (S228P), 即把第 228 位的丝氨酸 (Ser) 改构为 IgG1 序列的脯氨酸 (Pro), 可以极大的降低 FAE 的发生, 增强 IgG4 的稳定性^[11]。此外, 有文献报道把 IgG4 的 CH3 区域的第 409 位的精氨酸突变为 IgG1 序列保守的赖氨酸 (Lys) 也可以降低 FAE 的发生^[12]。早期开发的 IgG4 类抗体药物并没有对铰链区序列进行改构以避免 FAE 的发生, 例如 Biogen 公司开发的以 α4β1 和 α4β7 为靶点的用于治

疗多发性硬化症的 natalizumab (Tysabri®) 就是 IgG4 野生型, 实验已经证明这个抗体药物分子可与人体内源 IgG4 发生 Fab 臂交换^[13]。虽然到目前为止尚无任何数据表明 natalizumab 与人体内源 IgG4 发生 Fab 臂交换后会降低治疗效果或产生不良反应, 但是在 IgG4 治疗性抗体药物开发的策略中, 人们还是更倾向于将 IgG4 框架稳定化, 即通过 IgG4 铰链区序列的改构 (S228P) 来减少或消除 Fab 臂交换效应^[2,14]。虽然很多文献已证明上述 S228P 改构的效应, 但是监管机构仍建议在分子表征中进行证明性研究。

传统研究 FAE 的方法主要为 ELISA 方法, 即利用 FAE 后形成双特异性抗体可以结合两个不同抗原的特性, 采用桥接式 ELISA (Bridging-ELISA) 法来检测。近年来, 一些新颖的方法被开发用于检测 FAE。例如采用荧光共振能量转移 (FRET) 的方法^[15], 两种荧光素基团分别标记两种 IgG4 分子, 如果发生 FAE 形成杂合抗体后, 激发一种荧光会引发另一种荧光的响应, 从而检测到 FAE, 但是这种方法需要对抗体分子预先标记, 可能会影响抗体与抗原的结合。一般的 SEC-HPLC 无法区分不同的 IgG 分子, 通过木瓜蛋白酶将其中一种 IgG4 分子酶切获得 Fc 片段 (~50 kDa), 再与另一种完整的 IgG4 分子 (~150 kDa) 孵育, FAE 后形成的杂合抗体分子量大约为 100 kDa, 通过普通的 SEC-HPLC 即可分离出这 3 种形式, 从而检测 FAE 的发生^[16]。与 FRET 方法相似, 这种酶切方法预先改变了抗体的分子形式, 可能无法真实反映抗体行为。此外, 混合色谱 (mixed-mode chromatography) 也可用于 FAE 的检测^[15]。

液质联用 (LC-MS) 方法已经广泛应用于单克隆抗体药物的表征, 包括完整和还原分子量的检测、肽图氨基酸序列的分析、脱酰胺和氧化等杂质的鉴定和定量分析等^[8]。LC-MS 法也已用于体外 (*in vitro*) 缓冲液中 IgG4 分子 FAE 的检测^[13,17]。在这种简单反应环境中, 只要参与 FAE 反应的两种 IgG4 分子的分子量达到一定的差异, 所形成的杂合抗体即可与原 IgG4 分子在 MS 图谱上得到分离。LC-MS 法与 ELISA 法相比, 具有快速和无需额外处理抗原 (例如包被和生物素化) 的优点, 可在几分钟内获得检测结果。而对于在复杂条件下的体外 (*in vitro*) 研究, 例如在人血清中反应以模拟人体内环境, 以及动物体内 (*in vivo*) 反应, 受限于反应环境中含有许多其他高丰度蛋白的干扰, ELISA 法仍然不可替代。为了方便研究 FAE, 可先将血清中的内源 IgG 去除以及采用不表达内源 IgG 的 SCID 小鼠模型, 从而将 FAE 反应限制在两个 IgG4 分子之间。在这种情况下, LC-MS 法仍然可以作为一种

简便和正交 (orthogonal) 的分析方法去研究 FAE 的发生。

信迪利单抗 (sintilimab) 是一种全人源抗 PD-1 抗体, 用于肿瘤的免疫治疗。与国外已上市的抗 PD-1 抗体 nivolumab 和 pembrolizumab 相同, 信迪利单抗是 IgG4 κ 型抗体, 在早期开发时, 为提高抗体的稳定性, 将铰链区的序列 -CPSC- 改构为 -CPPC- (S228P), 以去除潜在的 FAE 风险。本研究构建表达了 sintilimab 以及 sintilimab 改构前的野生型 (-CPSC-) (sintilimab-wt), 采用 LC-MS 方法评估了 sintilimab 在体外和动物体内实验中的 FAE 稳定性。结果表明, 改构后的 sintilimab 分子稳定性提高, 其半抗体分子含量明显低于未做改构的野生型, 在体外和体内 sintilimab 不与其他野生型 IgG4 分子发生 FAE。

材料与方法

供试品及试剂 信迪利单抗 (sintilimab) 和野生型信迪利单抗 (即铰链区未改构型, 简称 sintilimab-wt), 以及另一个野生型 IgG4 分子 TGN1412 均由信达生物制药 (苏州) 有限公司提供, 在 CHO-S 细胞中表达和纯化。Pembrolizumab (批号 6302604005) 购自美国 Merck 公司。人 AB 型血清购自美国 Gemini 公司; C.B17 SCID 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; NEM 和 GSH 购自美国 Sigma 公司; Protein A 琼脂糖珠购自美国 GE 公司; C4 色谱柱 (ACQUITY UPLC Protein BEH C4 Column, 300 Å, 1.7 μ m, 2.1 mm \times 50 mm) 购自美国 Waters 公司; SDS-PAGE 预制胶 (4%~15%, 12-well) 购自美国 Bio-Rad 公司 (货号 456-1085)。

仪器 液质联用仪 Ultimate3000 Q-Exactive 购自美国 Thermo Scientific 公司; Beckman PA800 Plus 毛细管电泳仪购自美国 Beckman 公司; 凝胶成像系统 (Chemidoc XRS+) 购自美国 Bio-Rad 公司。

SDS-PAGE 将各抗体样品稀释到 2 mg \cdot mL⁻¹, 取 20 μ L 与非还原上样缓冲液 1:1 混合, 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 冷却至室温后离心, 取 8 μ g 上样到 4%~15% 12-well Bio-Rad 预制胶, 同时加样 5 μ L 预染分子量 Marker, 200 V 电压恒压电泳 25 min 左右。停止电泳, 将凝胶置于考马斯亮蓝染色液中摇晃 40 min 染色, 再脱色至背景无色、条带清晰。用凝胶成像系统拍照分析。

非还原型 CE-SDS 取样品 100 μ g, 加入 pH 6.5 样品缓冲液使总体积为 85 μ L (样品缓冲液体积 \geq 70 μ L), 加入内标 (10 kDa) 2 μ L 和 250 mmol \cdot L⁻¹ 的 NEM 溶液 5 μ L, 混匀后 70 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 冷却至室温后, 将样品加入进样管中, 用 Beckman PA800 Plus 毛细管电泳仪进行凝胶电泳检测。

PBS 缓冲液 FAE 实验 分别取 100 μ g sintilimab、sintilimab-wt 和 pembrolizumab 与 100 μ g TGN1412 混合, 加 10 μ L 的 100 mmol \cdot L⁻¹ GSH (终浓度为 1 mmol \cdot L⁻¹), 补加 PBS 至终体积为 1 mL, 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育。各样品平行制备 5 份, 分别在 0、1、2、6 和 20 h 取出用 LC-MS 法分析。

去除内源 IgG 的人血清中 FAE 实验 取 3 mL Protein A 琼脂糖珠加入到 10 mL 色谱柱, 用 6 mL PBS 清洗 3 次。加入 3 mL 人血清与 Protein A 琼脂糖珠混合后, 置于旋转混合仪, 室温孵育 2 h, 收集过滤血清, 再将过滤血清重复以上步骤, 最终获得去除内源 IgG 的人血清, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 待用。分别取 100 μ g sintilimab、sintilimab-wt、pembrolizumab 与 100 μ g TGN1412 混合, 真空浓缩干燥。分别用 100 μ L 去除内源 IgG 的人血清复溶各样品, 并加入 GSH 至 3 mmol \cdot L⁻¹ 终浓度, 在 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育过夜 (18 h)。然后, 再向各样品加入 Protein A 琼脂糖珠, 置于旋转混合仪, 室温孵育 2 h。使用 150 μ L PBS 和去离子水依次清洗 Protein A 琼脂糖珠 3 次, 最后用 1% 甲酸/水溶液 100 μ L 洗脱, 并真空干燥浓缩。各样品加超纯水至 100 μ L, 使用 LC-MS 法检测各样品内抗体分子量。

SCID 小鼠实验 分别将 sintilimab、sintilimab-wt、pembrolizumab 与 TGN1412 混合, 用 PBS 稀释至终质量浓度为 1 mg \cdot mL⁻¹, 按 10 mg \cdot kg⁻¹ 的剂量通过尾静脉注射进 5 周龄免疫缺陷的雌性 C.B17 SCID 小鼠。24 h 后, 取小鼠全血 200 μ L, 离心 (5 000 r \cdot min⁻¹, 5 min) 分离出血清。向各血清样品中加入 Protein A 琼脂糖珠, 置于旋转混合仪, 室温孵育 2 h。使用 PBS 150 μ L 和去离子水依次清洗 Protein A 琼脂糖珠 3 次, 最后用 1% 甲酸/水溶液 100 μ L 洗脱, 并真空干燥浓缩。各样品加超纯水至 30 μ L, 使用 LC-MS 法检测各样品内抗体分子量。

LC-MS 检测 采用 Dionex Ultimate 3000 UHPLC 和 Q-Exactive 液质联用系统对抗体分子量进行检测。液相参数: 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C4 300 Å (2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m), 进样体积为 10 μ L, 柱温为 80 $^{\circ}$ C, 流速为 0.2 mL \cdot min⁻¹, 检测波长为 214 nm; 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 实际分离为 5 min 内 B 相梯度为 10%~98%。Q-Exactive 质谱仪离子源参数: 鞘气流速为 35 arb, 辅助气流速为 12 arb, 喷雾电压为 3.8 kV, 离子传输管温度为 320 $^{\circ}$ C, S-lens RF level 为 80%, 辅助器加热器温度为 200 $^{\circ}$ C。Q-Exactive 数据采集方法参数: 采用全 MS 模式扫描, 运行时间为 2~18 min, 选择正离子模式, 源内 CID 电压为 0 eV, microscans 为 10, 分辨率为

17 500, AGC Target为3e6, Maximum IT为200, 扫描范围为1 500~4 500 m/z , 数据类型设为profile。质谱产生的数据用Biopharma Finder (Thermo Scientific) 软件进行解卷积分析分子量。

结果

为考察信迪利单抗铰链区序列的改构 (S228P) 效果, 本研究同时构建了 sintilimab、未改构的野生型 (sintilimab-wt) 以及另一野生型 IgG4 单抗 TGN1412, 并在 CHO-S 细胞中表达和纯化。sintilimab 与 sintilimab-wt 相比, 只有铰链区氨基酸 S228P 的变化, 其他氨基酸序列则完全一致。TGN1412 为德国 TeGenero 制药公司研发的针对 CD28 的抗体, 用于治疗风湿性关节炎和白血病, 但在临床 I 期发生严重不良反应而终止试验。TGN1412 同样为典型的野生型 IgG4 分子, 铰链区序列为 -CPS²²⁸C-, 根据文献报道会与其他野生型 IgG4 分子发生 FAE^[13]。此外, Merck 公司的抗 PD-1 抗体 pembrolizumab 已经被报道证明不会发生 FAE^[18], 本文用其作为对照。

1 半抗体分子检测

半抗体分子的存在是 IgG4 分子间发生 FAE 的分子基础^[9]。将这几种抗体在非还原条件下变性后用 SDS-PAGE 胶进行分离, 并用考马斯亮蓝染色。如图 1 所示, 在胶上 ~75 kDa 的地方可以观察到半抗体分子的存在。Sintilimab-wt 和另一个野生型 IgG4 TGN1412, 在胶上可看到明显的分子自身半抗体分子条带, 而 sintilimab 以及 pembrolizumab 的自身半分子条带非常微弱。

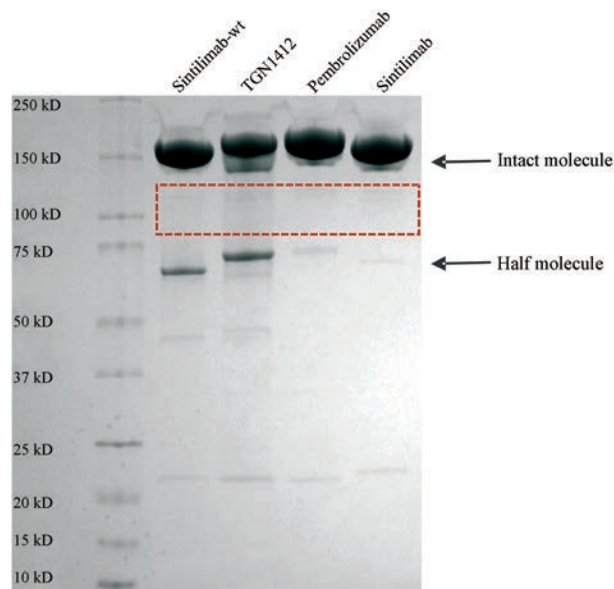


Figure 1 Analysis of half-molecules present in various IgG4 mAbs as indicated by non-reduced SDS-PAGE

进一步对各抗体分子中的半抗体分子含量进行定量分析, 用非还原 CE-SDS (图 2) 检测各个 IgG4 分子中的半抗体分子含量。从图 2 上观察到了半抗体分子紫外吸收峰, 其中 TGN1412 的半抗体分子含量最高, 达到 11.6%, sintilimab-wt 中半抗体分子含量为 5.3%, sintilimab 的半抗体分子含量仅为 0.1%, pembrolizumab 的半抗体分子含量为 0.5%。由此可见, sintilimab 的铰链区序列的改构 (S228P) 极大降低了 sintilimab 自身半抗体分子的生成, 半抗体分子含量仅为改构前的 2%。值得注意的是, sintilimab 中的半抗体分子含量也远低于

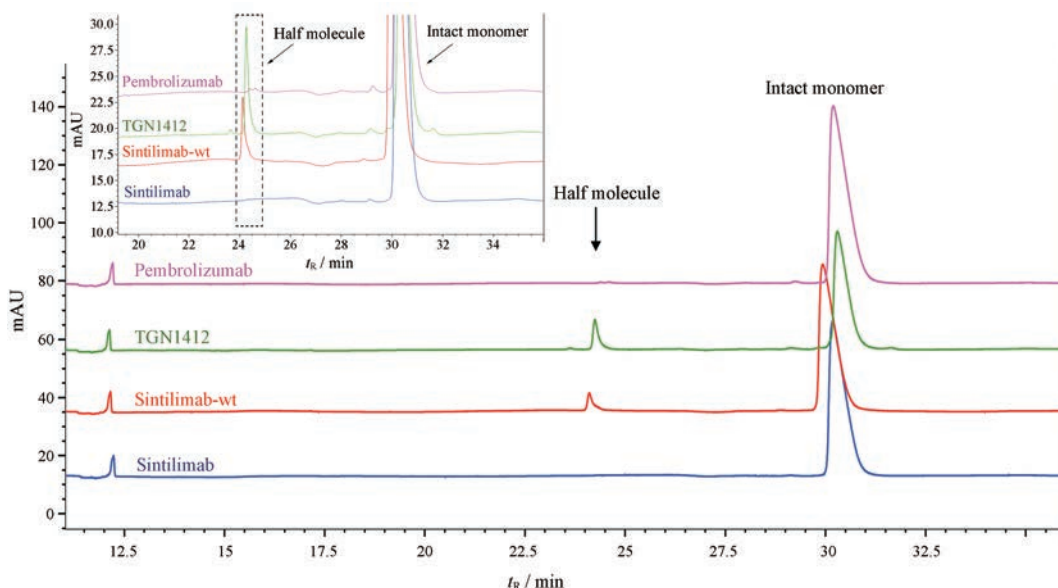


Figure 2 Analysis of half antibody molecules presented in various IgG4 mAbs as indicated by non-reduced CE-SDS (insert as zoomed-in graph)

于 pembrolizumab。

为考察 sintilimab 是否会发生 FAE, 分别将 sintilimab、sintilimab-wt 与 TGN1412 在不同的环境 (包括体内和体外) 中混合, 利用 LC-MS 法对结果进行检测。反应环境包括 PBS 缓冲液、人血清和 SCID 小鼠。

2 PBS 缓冲液实验

为分析 sintilimab-wt、sintilimab 是否会发生 FAE, 将 sintilimab-wt、sintilimab 分别与 TGN1412 在 PBS 缓冲液中混合, 加入还原剂谷胱甘肽 (GSH) 在 37 °C 孵育, 在不同时间 (0、1、2、6 和 20 h) 取样后直接用 LC-MS 法检测。结果如图 3 所示, 在孵育 1 h 后即可明显观察到 sintilimab-wt 与 TGN1412 发生 FAE 后形成的杂合抗体 (hybrid), 并且随着时间的延长而增加, 到 6 h 的时候 FAE 基本停止, 杂合抗体的含量与 20 h 的结果基

本一致; 与此相反的是, 即使混合孵育时间达到 20 h, sintilimab 与 TGN1412 之间仍未检测到 FAE 的发生。Pembrolizumab 与 TGN1412 在 PBS 缓冲液中混合, 加 GSH 做同样的时间点取样 LC-MS 检测。结果显示 pembrolizumab 同 sintilimab 一样, 孵育 20 h 后仍然未见杂合抗体的产生 (结果未显示)^[18]。

3 人血清体外实验

人血清内含有丰富的蛋白质、生长因子、激素和脂类等复杂成分, 相比 PBS 缓冲液, 可以在体外更好地模拟人体内生理环境。血清中含有大量的白蛋白、IgG 等高丰度蛋白, 为了排除血清中高丰度的内源 IgG 的干扰, 用 Protein A 琼脂糖珠先将人血清中的内源 IgG 去除, 再加入还原剂 GSH (终浓度 3 mmol·L⁻¹), 然后将 sintilimab-wt、sintilimab 分别与 TGN1412 在血清中混

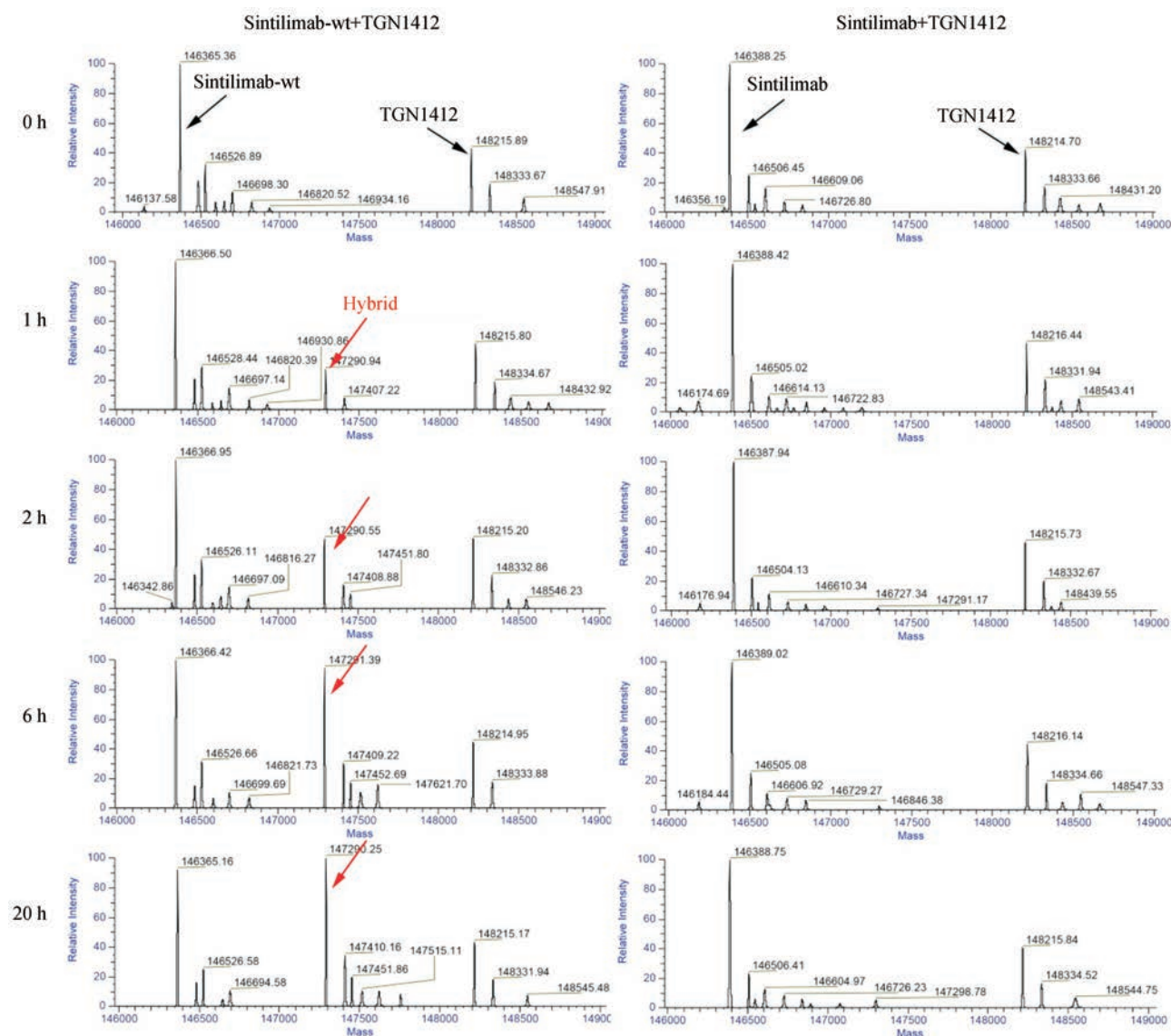


Figure 3 Time course study of Fab-arm exchange analysis between sintilimab-wt or sintilimab and TGN1412 in PBS

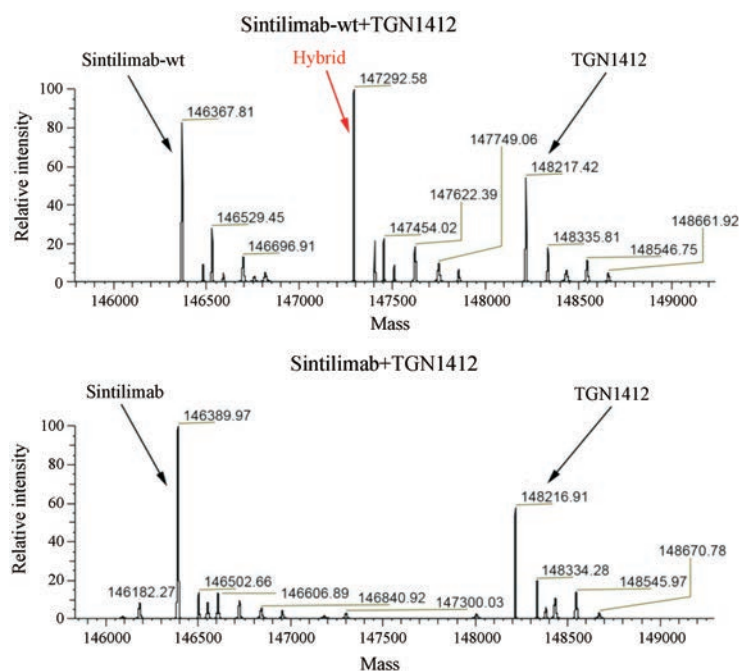


Figure 4 Fab-arm exchange analysis between sitilimab-wt or sitilimab and TGN1412 in IgG-removed human serum after 18 hours mixing

合 37 °C 孵育 18 h, 最后用 1% 甲酸从 Protein A 琼脂糖珠上洗脱出外源 IgG 分子, 浓缩体积后直接上样 LC-MS 检测。结果 (图 4) 显示, 与在 PBS 缓冲液中的结果相同, sintilimab-wt 与 TGN1412 发生 FAE 形成杂合抗体 (Hybrid), 而 sintilimab 与 TGN1412 在人血清中不发生 FAE。在 LC-MS 的质谱图谱上并没有观察到其他多余的蛋白质峰, 而且血清中反应 18 h 后 sintilimab-wt 和杂合抗体的含量与在 PBS 中反应 20 h 后的含量相似, 说明用 Protein A 琼脂糖珠去除内源 IgG 和亲和富集外源 IgG 的效果显著。

4 SCID 小鼠体内实验

将 sintilimab-wt、sintilimab 分别与 TGN1412 混合后, 按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量静脉注入免疫缺陷的 SCID 小鼠, 24 h 后取血。与处理人血清类似, 采用 Protein A 琼脂糖珠从血清中亲和富集外源 IgG 分子, 1% 甲酸洗脱并浓缩后直接用 LC-MS 法检测。结果如图 5 显示, sintilimab-wt 与 TGN1412 发生 FAE 形成杂合抗体 (Hybrid), 而 IBI308 与 TGN1412 在 SCID 小鼠中不会发生 FAE。

综合以上的体外实验 (PBS 缓冲液和人血清) 和动物体内 (SCID 小鼠) 实验结果, sintilimab 的铰链区序列的改构 (S228P) 消除了 FAE 发生, 提高了 IgG4 结构的稳定性。

讨论

随着重组抗体药物的迅速发展, 将会出现越来越

多的采用 IgG4 结构的抗体药物。新近上市的 IgG4 抗体药物均对铰链区的序列进行了改构 (S228P), 并且已经证明铰链区序列的改构会消除 IgG4 分子 FAE 的风险。信迪利单抗作为一种全人源 IgG4 型抗 PD-1 创新抗体, 本研究验证了该产品铰链区的稳定性。LC-MS 方法无需额外的样品处理, 可以直接用于缓冲溶液中 FAE 发生的评估, 但是对于在较复杂反应环境如血清和动物体内的使用还很少有相关报道。本文用 LC-MS 方法对信迪利单抗铰链区的稳定性做了系统性的研究, 从 PBS 缓冲液到人血清, 再到 SCID 小鼠。结果表明, 信迪利单抗铰链区序列改构 (S228P) 后, 与未改构的野生型相比, 结构稳定, 消除了 Fab 臂交换的风险。

在 SCID 小鼠中的反应, 利用 Protein A 琼脂糖珠亲和富集出加入人血清中的全部外源 IgG 分子。与采用的亲和富集策略不同的是, Merck 公司研究人员在用 LC-MS 检测 pembrolizumab 在 SCID 小鼠内稳定性的时候, 采用生物素化的 PD-1 去亲和富集 PD-1 抗体包括可能 FAE 后形成的杂合抗体^[18]。IgG4 抗体在发生 FAE 交换形成双特异性杂合抗体后, 对抗原的亲合力会有所下降, 如果用抗原来制备亲和柱来做亲和分离, 亲和力的不同有可能会杂合抗体回收率的减少, 无法准确反映抗体真实行为, 而使用 Protein A 琼脂糖珠来做亲和分析, 无需制备亲和柱, 不用考虑亲和力的不同, 提高了检测的可靠性。对于在人血清中的反应, 作者首先用 Protein A 琼脂糖珠去除了人内源

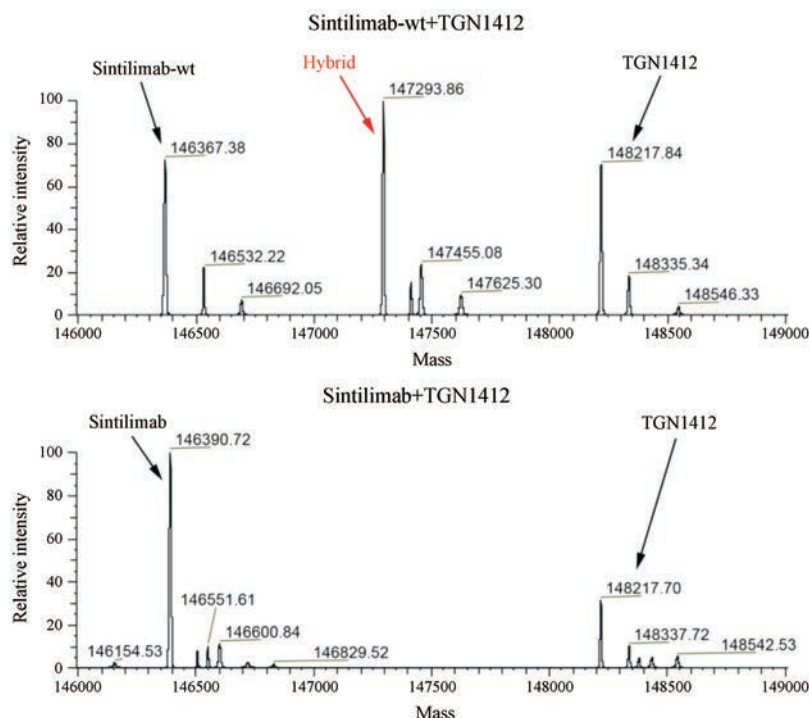


Figure 5 Fab-arm exchange analysis between sitilimab-wt or sitilimab and TGN1412 in SCID mice serum after 24 hours injection

IgG pool, 反应后, 又用 Protein A 琼脂糖珠亲和分离富集出加入人血清中的外源 IgG 分子。与 PBS 结果相比, 从 LC-MS 谱图结果上并未发现其他的蛋白峰, 说明在这个过程中未引入或引入的其他蛋白包括内源 IgG 的量是非常低的, Protein A 琼脂糖珠去除内源 IgG 和减少其他污染蛋白的效果是非常好的。

结合本文实验结果, 可以看到对于以 IgG4 分子为框架开发的抗体药物, 较链区的序列改构 (S228P) 可以极大地提高抗体药物的稳定性。LC-MS 法作为一种简便快速的方法, 结合 Protein A 纯化等手段, 可以在体内和体外实验中对 IgG4 类抗体药物的稳定性进行有效的评估。

References

- [1] Jiang XR, Song A, Bergelson S, et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 101-111.
- [2] Salfeld JG. Isotype selection in antibody engineering [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 1369-1372.
- [3] Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 343-357.
- [4] Martin WL, West AP Jr, Gan L, et al. Crystal structure at 2.8 Å of an FcRn/heterodimeric Fc complex: mechanism of pH-dependent binding [J]. *Mol Cell*, 2001, 7: 867-877.
- [5] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24: 207-212.
- [6] Li Y, Li F, Jiang F, et al. A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway and translational blockade of immune checkpoints [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17:1151.
- [7] Lee HT, Lee JY, Lim H, et al. Molecular mechanism of PD-1/PD-L1 blockade via anti-PD-L1 antibodies atezolizumab and durvalumab [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 5532.
- [8] Rogstad S, Faustino A, Ruth A, et al. A retrospective evaluation of the use of mass spectrometry in FDA biologics license applications [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28: 786-794.
- [9] Rispens T, Ooijevaar-de Heer P, Bende O, et al. Mechanism of immunoglobulin G4 Fab-arm exchange [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 10302-10311.
- [10] Schuurman J, Perdok GJ, Gorter AD, et al. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds [J]. *Mol Immunol*, 2001, 38: 1-8.
- [11] Angal S, King DJ, Bodmer MW, et al. A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody [J]. *Mol Immunol*, 1993, 30: 105-108.
- [12] Labrijn AF, Rispens T, Meesters J, et al. Species-specific determinants in the IgG CH3 domain enable Fab-arm exchange by affecting the noncovalent CH3-CH3 interaction strength [J]. *J Immunol*, 2011, 187: 3238-3246.
- [13] Labrijn AF, Buijsse AO, van den Bremer ET, et al. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 *in vivo* [J]. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 767-771.
- [14] Beck A, Wurch T, Bailly C, et al. Strategies and challenges

- for the next generation of therapeutic antibodies [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10: 345-352.
- [15] Yang X, Zhang Y, Wang F, et al. Analysis and purification of IgG4 bispecific antibodies by a mixed-mode chromatography [J]. *Anal Biochem*, 2015, 484: 173-179.
- [16] Rispiens T, den Bleker TH, Aalberse RC. Hybrid IgG4/IgG4 Fc antibodies form upon 'Fab-arm' exchange as demonstrated by SDS-PAGE or size-exclusion chromatography [J]. *Mol Immunol*, 2010, 47: 1592-1594.
- [17] van der Neut Kofschoten M, Schuurman J, Losen M, et al. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange [J]. *Science*, 2007, 317: 1554-1557.
- [18] Yang X, Wang F, Zhang Y, et al. Comprehensive analysis of the therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab: hinge modification blocks half molecule exchange *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 4002-4014.