

康柏西普非还原 SDS-PAGE 纯度方法研究

于传飞^{1#}, 张峰^{1#}, 刘爱兵², 张亚飞², 罗祖秀², 陈粟², 柯潇², 王兰^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 成都康弘药业集团股份有限公司, 四川 成都 610000)

摘要: 建立非还原 SDS-PAGE 纯度检测方法, 以研究康柏西普降解物或片段的含量。本文针对凝胶的筛选、凝胶成像系统的比较、主带灰度值线性范围和脱色条件开展研究, 确定了康柏西普非还原 SDS-PAGE 纯度测定方法的实验条件。结果显示: 4%~15% 梯度浓度胶分离效果好, 带型清晰平整; 高分辨率的凝胶成像系统能使主带、杂带响应峰基线分离; 当上样量 $\leq 3 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性好, 因此, 以 $3 \mu\text{g}$ 作为非还原 SDS-PAGE 纯度方法的上样量; 脱色条件确定为 60 min 更换一次脱色液, 每次 100 mL, 脱色时间不超过 3 h。所建立的非还原 SDS-PAGE 纯度测定方法能够更客观测定康柏西普的纯度, 该方法经过验证后, 以补充材料的形式提交美国 FDA, 为康柏西普在美国直接进入临床 III 期研究奠定了质量基础。

关键词: 非还原 SDS-PAGE; 线性; 上样量

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 12-2099-05

A study of non-reduced SDS-PAGE purity method of conbercept

YU Chuan-fei^{1#}, ZHANG Feng^{1#}, LIU Ai-bing², ZHANG Ya-fei², LUO Zu-xiu²,
CHEN Su², KE Xiao², WANG Lan^{1*}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

2. Chengdu Kanghong Pharmaceutical Group, Chengdu 610000, China)

Abstract: A non-reduced SDS-PAGE purity method for quantitation of conbercept fragments was established based on gel screening, comparison of gel imaging system, linearity range of main band, screening of destaining conditions. The results indicated that the bands could be separated effectively with good clearness and flatness on 4%–15% gradient concentration gel, the peaks of all bands could be separated from baseline using high-distinguishability gel imaging system, the signal intensity of a main band had shown a good linearity with $\leq 3 \mu\text{g}$ of loading amount, and that the destaining was set as a total of $\leq 3 \text{ h}$ with exchanging 100 mL destaining buffer every 60 min. The established non-reduced SDS-PAGE method could demonstrate the purity of conbercept more objectively. After validation, the established non-reduced SDS-PAGE method was submitted to FDA in the form of supplementary materials, which laid a quality basis for the direct entry of conbercept to the clinical III study in the United States.

Key words: non-reduced SDS-PAGE; linearity; loading amount

收稿日期: 2018-06-13; 修回日期: 2018-07-30.

基金项目: 国家药典委员会标准提高课题《康柏西普标准提高》(2018-23).

[#]共同第一作者.

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0555

康柏西普 (conbercept) 是一种重组人血管内皮生长因子受体-抗体融合蛋白, 于 2013 年 12 月被国家食品药品监督管理总局 (CFDA) 批准上市, 用于治疗湿性年龄相关性黄斑变性^[1, 2]。2016 年 10 月康柏西普获得美国食品和药品监督管理局 (FDA) 准许在美国直接开展 III 期临床试验。针对康柏西普的质

量控制,其非还原 SDS-PAGE 纯度测定最初直接采用了《中国药典》中的相应方法,以该方法检测产品纯度相对偏低。为了确定康柏西普产品是纯度问题还是方法学评价的客观性问题,进一步有效控制和评价康柏西普产品相关杂质,结合康柏西普蛋白的特点发现原方法在产品主成分饱和的情况下过高估计了杂质的含量,同时也优化了 R250 染色的非还原 SDS-PAGE 纯度检测方法,相应药学资料经过方法学验证后提交给 FDA,促进了康柏西普在美国直接进入临床 III 期。本文针对凝胶的筛选、凝胶成像系统的比较、主带灰度值线性范围、主要杂质灰度值线性范围以及脱色条件开展研究,确定了康柏西普非还原 SDS-PAGE 纯度测定方法的实验条件。希望本文能够对新药研发人员具有一定的借鉴作用。

材料与amp;方法

药品和试剂 康柏西普蛋白样品,成都康弘生物科技有限公司生产。10% 预制聚丙烯酰胺凝胶, Bio-Rad 公司,货号 456-1033; 4%~15% 预制聚丙烯酰胺凝胶, Bio-Rad 公司,货号 456-1083; 10×Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad 公司,货号 161-0732; 4×上样缓冲液, Bio-Rad 公司,货号 161-0747; 蛋白 Marker, Bio-Rad 公司,货号 161-0373; 碘乙酰胺, Sigma 公司,货号 L1149-5G; 考马斯亮蓝 R250 染色液, Beyotime 公司,货号 P0017A-1; 脱色液, Beyotime 公司,货号 P0017A-2。

仪器 Powerpac™ Universal 型电泳仪, Bio-Rad 公司; XRS+型高分辨率凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; EZ 型低分辨率凝胶成像系统, Bio-Rad 公司。

凝胶的选择 康柏西普样品分别以 10% 固定浓度预制胶、4%~15% 梯度浓度预制胶进行非还原 SDS-PAGE 电泳,每块胶以 10 μg、3 μg 各上样 1 孔并有一泳道为蛋白 Marker。两种凝胶同槽电泳,染色脱色条件相同,比较两种凝胶对蛋白的分离效果。除特别说明外,非还原 SDS-PAGE 实验条件为(下同):上样体系加入 3.6% (W/V) 碘乙酰胺 1 μL (抑制自由巯基重排)^[1,2], 70 °C 水浴 10 min, 80 V 电泳 30 min 后再 120 V 电泳 60 min, 考马斯亮蓝 R250 染色 60 min 后再脱色。

凝胶成像系统的选择 使用 4%~15% 梯度浓度预制胶,康柏西普样品上样 3 μg 进行非还原 SDS-PAGE 电泳,染色脱色后,同一块凝胶分别在高分辨率和低分辨率的两种凝胶系统上采集数据,使用 ImageLab 软件分析数据。比较两种不同分辨率的凝

胶成像系统采集数据的差异。

主带线性范围及上样量的确定 使用 4%~15% 梯度浓度预制胶电泳,高分辨率凝胶成像系统采集数据,以康柏西普样品在 0.125~20 μg 内进行 10 个梯度上样量的检测,分别为 0.125、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、10 和 20 μg,重复 3 次,各 1 板凝胶。复孔样品单独稀释和前处理,计算不同上样量主带灰度值的 3 次重复平均值。以上样量对主带平均灰度值作图,考察主带上样量的线性;计算各上样量对应的纯度,考察不同上样量纯度的精密度。

脱色条件的影响 同一康柏西普样品经前处理后混匀上样体系,于两板凝胶上各点样 4 孔,以考马斯亮蓝 R250 同盘染色 60 min 后,两板凝胶各置一脱色盘脱色,每次加入脱色液 100 mL。胶 1 加入脱色液开始脱色后,每脱色 30 min 后更换一次新鲜脱色液,总脱色时间为 3 h。胶 2 加入脱色液开始脱色后,每脱色 60 min 后更换一次新鲜脱色液,总脱色时间为 3 h 时采集一次数据,胶 2 加入脱色液继续脱色至 5 h,采集数据。通过背景脱色效果和纯度结果比较 3 个脱色条件的影响。

主要杂带的线性范围 电泳与主带线性范围实验相同,二者共享实验数据。计算各上样量主要杂质条带灰度值的 3 次重复平均值。以上样量对主要杂质带平均灰度值作图,考察杂带灰度值的线性。

结果

1 凝胶的选择

10% 固定浓度预制胶、4%~15% 梯度浓度预制胶以相同实验条件电泳并染色脱色后,电泳结果见图 1。

电泳图 1 显示,康柏西普样品主带下方出现 3 条杂带,杂带 1、杂带 2 位于 100 kD 与主带之间,所占比例较低;杂带 3 略低于 75 kD,所占比例明显高于杂带 1、杂带 2。10% 固定浓度胶,杂带 1、杂带 2 与主带未完全分离,带型较弥散,康柏西普条带两边上翘。4%~15% 梯度浓度胶,杂带 1、杂带 2 与主带完全分离,且分离效果好,带型平整。另外,分子量 Marker 显示,对于高分子量区域,4%~15% 梯度浓度胶分离效果优于 10% 固定浓度胶,相反,对于低分子量区域,10% 固定浓度胶分离效果优于 4%~15% 梯度浓度胶。

2 凝胶成像系统的选择

康柏西普样品电泳后,如图 2 所示,同一凝胶以两种凝胶成像系统采集数据,分别为 EZ 型(低分辨

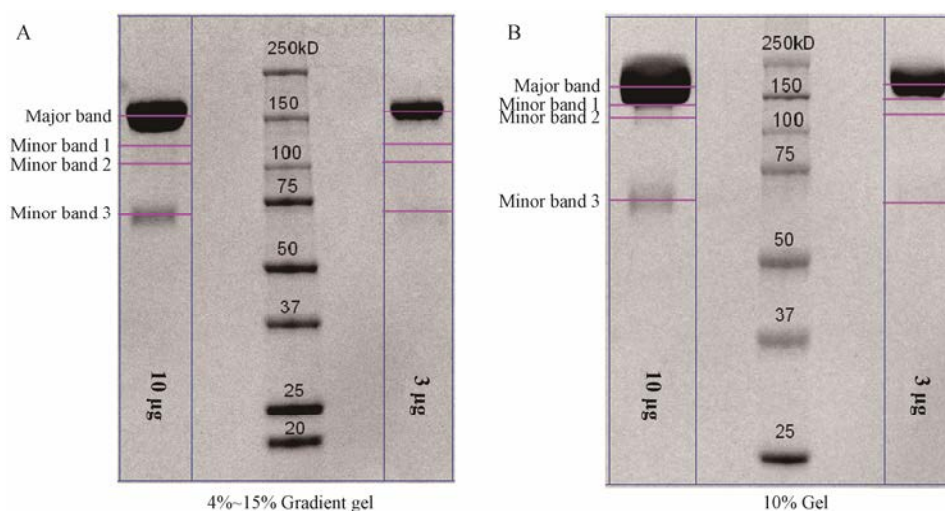


Figure 1 Separation results of conbercept with 4%–15% gradient gel (A) and 10% gel (B)

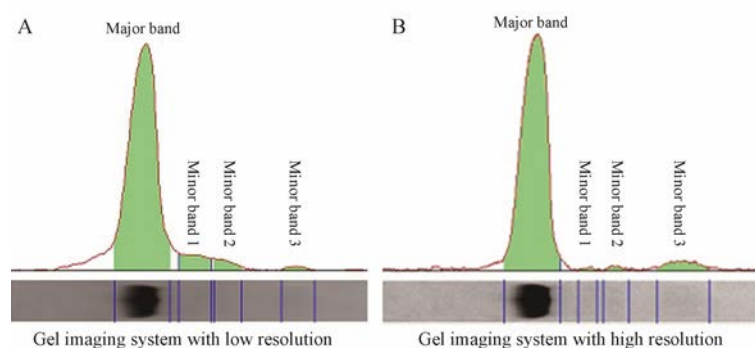


Figure 2 Comparison of data acquired from gel imaging systems with low resolution (A) and high resolution (B)

率型) 和 XRS+型 (高分辨率型)。其中低分辨率型设备较简易, 专用于 SDS-PAGE, 图片分辨率 140 万像素, 动态范围 3.0 OD, 像素密度为 2^{12} , 即饱和度为 4 096, 输出图像清晰度 300 dpi; 高分辨率型则具有多功能性, 可用于 SDS-PAGE、DNA 凝胶等, 图片分辨率 400 万像素, 动态范围 4.0 OD, 像素密度为 2^{16} , 即饱和度为 65 536。输出图片清晰度 300~600 dpi。

对于康柏西普样品, 主带下方有 3 条杂质带, 杂带 1、杂带 2 含量较低且离主带较近, 杂带 3 为主要的杂质且离主带较远。凝胶系统采集数据并经 Image Lab 软件分析, 低分辨率凝胶系统无法使杂带 1、杂带 2 与主带基线分离, 无法准确进行积分计算; 高分辨率凝胶系统能使杂带 1、杂带 2 与主带基线分离。

3 主带线性范围及上样量的确定

康柏西普样品在 $0.125 \sim 20 \mu\text{g}$ 内进行 10 个梯度上样量, 重复 3 次, 上样量与主带平均灰度值的线性关系见图 3A。

上样量 $\leq 3 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性相关系数 $R^2 = 0.9937$; 上样量 $\leq 4 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性相关系数

$R^2 = 0.9848$; 上样量 $\leq 10 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性相关系数 $R^2 = 0.9441$; 上样量 $\leq 20 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性相关系数 $R^2 = 0.9107$ 。表明上样量 $\leq 3 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性好, 上样量超过 $3 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性相关系数逐渐下降。 $1.5 \sim 4 \mu\text{g}$ 内不同上样量的纯度 $\text{CV}\% = 0.96\%$, $1.5 \sim 10 \mu\text{g}$ 内不同上样量的纯度 $\text{CV}\% = 2.68\%$, $10 \mu\text{g}$ 上样量纯度明显偏低。

鉴于上样量 $\leq 3 \mu\text{g}$ 时, 主带灰度值线性相关系数 $R^2 = 0.9937$, 且 CV 值较低, 故非还原 SDS-PAGE 检测康柏西普纯度的方法采用 $3 \mu\text{g}$ 作为样品检测的上样量。

4 脱色条件的影响

3 种脱色条件为不同的脱色液更换频率和脱色时间, 电泳图见图 3B, 3 种脱色条件所对应主带的纯度分别为 $89.9\% \pm 1.33\%$ 、 $90.2\% \pm 1.27\%$ 和 $94.4\% \pm 0.68\%$ 。

60 min 更换一次脱色液, 脱色 3 h 后, 凝胶脱色干净, 背景清晰。总脱色时间 3 h 内, 30 min 与 60 min 的换液频率主带平均纯度无明显差异; 脱色时间延

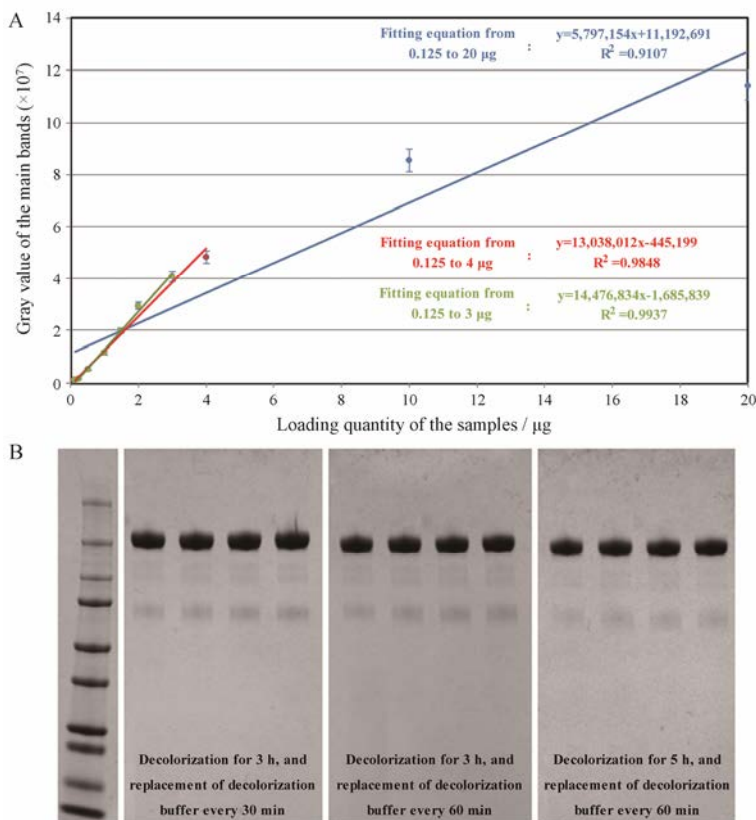


Figure 3 The linear relationship between the loading amounts of the samples and the average gray values of the main band (A) and electrophoregrams with three destaining conditions as indicated (B)

长至 5 h, 杂带变浅, 主带纯度由 90.2% 提高至 94.5%, 表明 3 h 后继续脱色对纯度有明显影响。

5 主要杂质的线性范围

康柏西普杂带占比以杂带 3 为主。电泳与主带线性范围实验相同, 计算不同上样量 (0.5~20 µg) 对应杂带 3 的平均灰度值。可以计算得到, 第 3 条杂质的上样量 (0.5~20 µg) 与杂带 3 的平均灰度值的线性相关系数 $R^2=0.9900$, 线性关系较好。结合主带线性范围的结果, 以 3 µg 作为非还原 SDS-PAGE 纯度方法的上样量时, 主带及主要杂质的灰度值均在线性范围内。

讨论

固定浓度胶和梯度浓度胶对不同分子量区域的蛋白尤其糖蛋白的分离效果存在差异^[3]。康柏西普样品主带下方出现 3 条杂带, 4%~15% 梯度浓度胶的分离效果和带型均明显优于 10% 固定浓度胶, 所以康柏西普非还原 SDS-PAGE 纯度测定方法选用 4%~15% 梯度浓度胶进行电泳。作为纯度测定方法, 应尽量保证泳道分离组分的完整性, 本研究的两种凝胶电泳条件相同, 溴酚蓝刚迁移至凝胶底部时结束电

泳, 若 10% 固定浓度胶增加电泳时间, 主带与杂带也可能实现完全分离, 但过度的迁移将导致条带两边上翘加重且会丢失泳道的部分信息。

康柏西普应使用高分辨率的凝胶成像系统采集凝胶数据。由于康柏西普有两条 100 kD 以上的杂质带且所占比例很低。低分辨率的凝胶成像系统无法实现响应峰的基线分离, 将导致杂质条带占比显著高于真实值。

确定康柏西普的非还原 SDS-PAGE 纯度方法上样量为 3 µg。当 SDS-PAGE 作为定量方法时, 应结合主带、杂带的线性范围合理确定上样量。康柏西普上样量 > 3 µg 时, 随上样量的增加, 主带灰度值逐渐趋于饱和, 而杂质条带的响应值却线性增加, 将导致计算的主带纯度结果低于真实值。康柏西普 3 µg 上样量对应主带灰度值为线性范围的上限, 且对应的主要杂质条带灰度值也在线性范围内, 所以 3 µg 是康柏西普的非还原 SDS-PAGE 纯度方法的合理上样量。

本研究之前的实验表明, 脱色 2~2.5 h, 有时背景不能完全脱色干净, 故本研究对 3 h 及 3 h 以上的脱色时间进行了比较。结果表明, 脱色 3 h 内, 保证背景脱色干净的前提下, 更高的换液频率 (30 min 更

换一次脱色液) 对纯度结果没有影响, 而进一步增加脱色时间将导致杂质条带过度脱色, 使主带纯度结果高于真实值。由于脱色过程对纯度结果有影响, 实际应用中, 应结合脱色液用量、摇床转速、换液频率等确定合理的脱色时间。

值得注意的是, 虽然现行版《中国药典》III部中很多治疗类生物制品各论的 SDS-PAGE 方法要求加样量不低于 $10\ \mu\text{g}$ ^[4], 但是对于新药研发应根据产品特点进行方法学验证以确定适宜的加样量。在本文研究中, $10\ \mu\text{g}$ 的上样量已经严重脱离其灰度值及上样量之间的线性关系, 所计算的康柏西普非还原 SDS-PAGE 纯度远低于其实际值。此外, 取高上样量时杂带的灰度值、低上样量时的主带的灰度值, 以保证二者均位于上样量与灰度值的良好线性范围内, 并综合考虑上样量之间的倍数关系, 所计算出的样品纯度能够更客观地反映其实际值。虽然 SDS-PAGE 是相对成熟的传统纯度测定方法, 但是其中对于实际产品的检测, 仍然需要谨慎的优化和验证, 这样才能真实地反映产品纯度。本文中应用了碘乙酰胺, 可以在非还原电泳中有效减少杂带的含量^[5, 6]。综上所述, 利用本文中优化的非还原 SDS-PAGE 方法重新对康柏西普纯度进行方法学验证和评估, 实测值及结合多批次所制定的质量标准获得 FDA 同行专家的认

可, 也为重组融合蛋白类制品纯度的质量控制提供了参考。

References

- [1] Nguyen TT, Guymer R. Conbercept (KH-902) for the treatment of neovascular age-related macular degeneration [J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2015, 8: 541–548.
- [2] Lu X, Sun X. Profile of conbercept in the treatment of neovascular age-related macular degeneration [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 2311–2320.
- [3] Walker JM. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Methods Mol Biol*, 1984, 1: 57–61.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 4. Beijing: China Medical Science Press, 2015.
- [5] Taylor FR, Prentice HL, Garber EA, et al. Suppression of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis sample preparation artifacts for analysis of IgG4 half-antibody [J]. *Anal Biochem*, 2006, 353: 204–208.
- [6] Vasilyeva E, Woodard J, Taylor FR, et al. Development of a chipbased capillary gel electrophoresis method for quantification of a half-antibody in IgG4 samples [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25: 3890–3896.