利用 SEC 和水相流动相进行 mAb 和 ADC 聚集体的定量分析

Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统和 AdvanceBio SEC 300Å, 2.7 µm 色谱柱

应用简报

生物制剂与生物仿制药

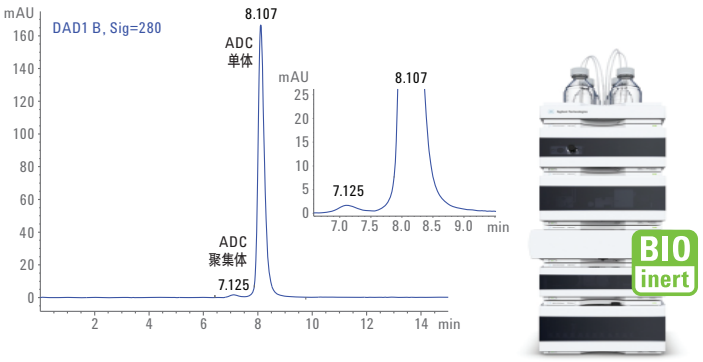
作者

M.Sundaram Palaniswamy
安捷伦科技公司
Bangalore, India

摘要

体积排阻色谱 (SEC) 是监测生物治疗蛋白质样品（包括单克隆抗体及其衍生物）中单体、二聚体、聚集体和潜在降解物的重要工具。由于聚集体被视为一项关键质量属性，因此需要对其进行定量分析。

本应用简报介绍了一种利用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱和 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱对生物治疗 mAb 和抗体药物偶联物 (ADC) 中的聚集体进行定量分析的简单而灵敏的方法。该方法采用相同的水相流动相，无需添加有机改性剂即可对 mAb 和疏水性更强的 ADC 进行分析。优化方法还可监测经 pH/温度处理形成的聚集体和降解物。该方法操作简单且具有良好重现性，与仪器的抗腐蚀性相结合后极其适用于生物制药行业中 mAb 和 ADC 的常规 QA/QC 分析。



Agilent Technologies

前言

治疗性蛋白质容易在开发过程的表达、再折叠、下游处理、制剂、灭菌和储存等各个阶段发生聚集和降解。此外，为形成 ADC 而连接的疏水性有效载荷也会提高由疏水性造成的聚集现象的发生。尽管聚集体/降解物的含量较低，但它们仍可对生物药物产生严重影响，如导致活性丧失、降低溶解度以及增加免疫原性。体积排阻色谱是用于表征蛋白质聚集体的标准方法。本文展示了使用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å，7.8 × 300 mm，2.7 µm 色谱柱分离、定量分析和监测治疗性 mAb 和 ADC 完整性所具备的优势。AdvanceBio SEC 色谱柱是 SEC 分析领域的一项突破性技术。这款由安捷伦设计并生产的色谱柱采用创新型硅胶填料和特有的键合技术，可使各种样品均获得出色的分离度和体积分离，且无需向流动相中添加有机改性剂。单克隆抗体和疏水性更强的 ADC 可采用相同的水相流动相进行分析。

材料与方法

仪器

我们采用完全生物兼容、最高耐压达 600 bar 的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统，由以下几个模块组成：

- Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱泵 (G5611A)
- Agilent 1260 Infinity 生物惰性高性能自动进样器 (G5667A)
- Agilent 1200 Infinity 系列恒温器 (G1330B)
- 包含生物惰性溶剂加热元件的 Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (TCC)（G1316C，选项 19）
- Agilent 1260 Infinity DAD VL（G1315D，配置生物惰性标准流通池，10 mm）

软件

Agilent ChemStation B.04.03 版（或更高版本）。

条件

色谱柱：	Agilent AdvanceBio SEC 300Å，7.8 × 300 mm，2.7 µm（部件号 PL1180-5301）
流动相：	磷酸盐缓冲液 (PBS)，50 mM 磷酸钠 + 150 mM 氯化钠，pH 7.4
TCC 温度：	室温
进样量：	10 µL
流速：	0.8 mL/min
检测条件：	UV，220 和 280 nm

试剂、样品与材料

曲妥单抗和抗体药物偶联物 (T-DM1) 购自当地药店并根据制造商的使用说明进行储存。PBS、盐酸和氢氧化钠购自 Sigma-Aldrich 公司。所有化学品和溶剂均为 HPLC 级，高纯水来自 Milli-Q 水纯化系统（Millipore Elix 10，美国）。

线性和范围

校准曲线由浓度范围为 15.625 - 2000 µg/mL 的 8 个曲妥单抗和 ADC 标准浓度点构建。

定量限 (LOQ) 和检测限 (LOD)

LOD 和 LOQ 的测量使用了曲妥单抗和 ADC (T-DM1)。将信噪比 (S/N) > 3 时的最低生物分子浓度定义为 LOD，而将 S/N > 10 时的浓度定义为 LOQ。

步骤

将流动相 (10 µL) 作为空白进样，随后将各线性浓度样品重复进样 3 次。用每个浓度的峰面积和保留时间 (RT) 计算标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD %) 值。并以较低线性浓度溶液的进样分析确定 LOD 和 LOQ。将各线性浓度下的平均峰面积对分析物浓度作图，得出单体校准曲线。

曲妥单抗和 ADC 聚集体的前处理

曲妥单抗和 ADC 聚集体前处理方法为，用流动相将单克隆抗体稀释至最终浓度为 2 mg/mL。pH 处理方法与其他方法基本相同，仅有略微改动 [1]。简而言之，将 1 M HCl 溶液缓缓滴加到样品溶液中，使其 pH 值从 6.0 改变为 1.0。然后，滴加 1 M NaOH 溶液将 pH 值调节至 10.0。最后，再次滴加 1 M HCl 溶液将 pH 值调回至 6.0。pH 值变化间大约有 1 min 的等待时间，此时以 500 rpm 速度持续搅拌溶液。将所得溶液在 60 °C 下温育 60 min。

结果与讨论

分离和检测

在进行聚集体、单体、二聚体和更高分子量聚集体的 SEC 定量分析时，确保样品组成不受流动相影响非常的关键。由于环境条件会改变聚集体的浓度，因此必须确保在含有低浓度盐的中性 pH 水相流动相中完成 SEC 分离。图 1 表明在蛋白质分析常用的色谱条件（即 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液）下，采用 AdvanceBio SEC 色谱柱可在 15 min 内对完整治疗性曲妥单抗 mAb 完成出色分离。该峰峰形对称且洗脱时的保留时间与单个分子量的 mAb 保持一致，这表明分离是基于体积且没有发生次级相互作用的。图 1 还显示了一张放大图，表明存在少量聚集体。图中不存在早洗脱或晚洗脱峰，说明市售 mAb 制剂呈均质且没有发生聚集或降解的迹象。

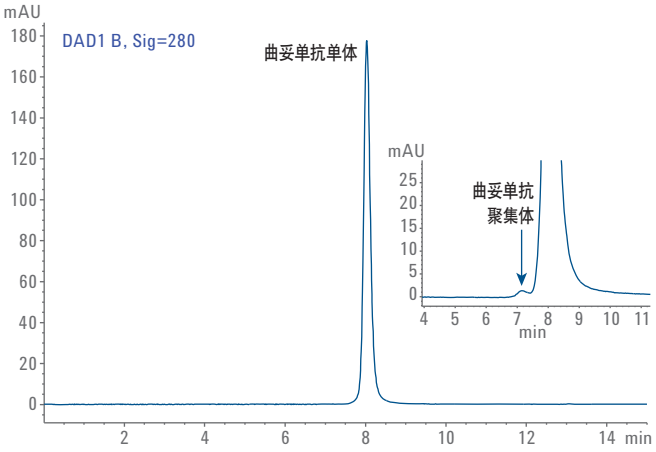


图 1. (A) 完整曲妥单抗的 SEC 色谱图 (B) 放大区域显示 Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上的曲妥单抗聚集体的 SEC 色谱图

ADC 的 SEC 分析

多数在市售的 SEC 色谱柱上利用水相进行 ADC SEC 分析的已发布方法会导致较差峰形以及对单分子偶联物聚集体的不完整分离。疏水性有效载荷与固定相之间的非特异性相互作用会导致这一现象。而结果表明，添加 15% 的 2-丙醇可克服这一现象 [2]。当采用 AdvanceBio SEC 色谱柱和水相流动相分析 ADC T-DM1 时，PBS 有助于获得对称峰形与出色的单体和聚集体分离度，这表明疏水性药物和固定相之间没有发生非特异性相互作用（图 2）。

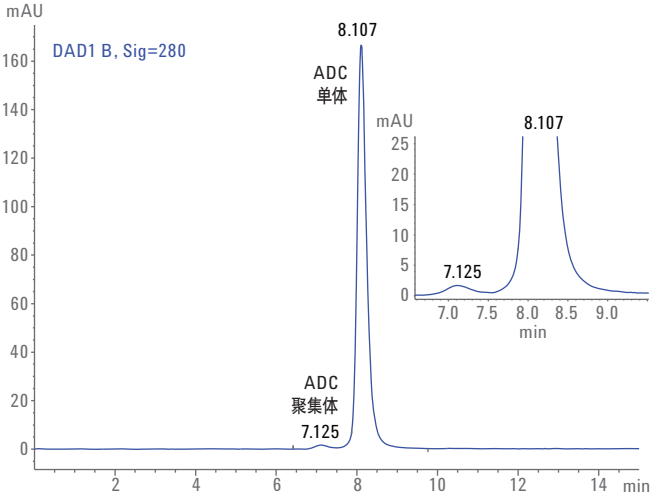


图 2. Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm 色谱柱上利用 pH 7.4 PBS 流动相获得的完整 T-DM1 (ADC) 的 SEC 色谱图

保留时间和峰面积的精密度

表 1 显示曲妥单抗 mAb 和 ADC 6 次重复进样得到的平均保留时间和峰面积 RSD 值。保留时间和峰面积的 RSD 分别小于 0.04% 和 1%，这表明其具有十分出色的方法重现性和系统精密度。

表 1. 保留时间和峰面积精确度 (n = 6)

	保留时间		峰面积	
样品	平均值 (min)	RSD	平均值 (mAU/min)	RSD
曲妥单抗创新药物	8.034	0	100	0
ADC	8.106	0.005	98.91	0.33

检测限和定量限

曲妥单抗和 ADC 的 LOD 和 LOQ 分别为 15 µg/mL 和 31 µg/mL，这表明方法的灵敏度很高。表 2 列出了曲妥单抗和 ADC 的 LOD 和 LOQ 实测值，而图 3 所示为 LOD 和 LOQ 以及空白的叠加色谱图。

表 2. LOD、LOQ 和 S/N 结果 (n = 3)

浓度 (µg/mL)	S/N	平均峰面积
曲妥单抗		
15.625 (LOD)	7.8	12.62
31.25 (LOQ)	21.4	29.16
62.5	32.7	60.74
ADC		
15.625 (LOD)	10.5	15.20
31.25 (LOQ)	15.5	37.89
62.5	37.9	80.24

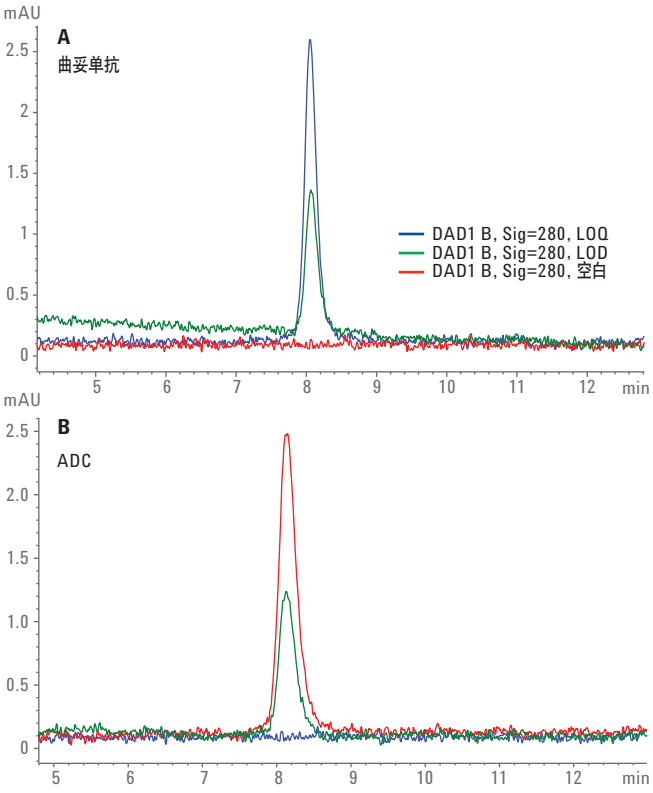


图 3. 曲妥单抗和 ADC 的 LOD 和 LOQ 与空白的叠加色谱图

线性

使用面积响应与曲妥单抗/ADC 的浓度构建了从 LOQ 到本研究最高浓度的曲妥单抗和 ADC 的线性曲线。准确度结果如表 3 所示。图 4 所示为 12.5 - 2000 µg 浓度范围内的曲妥单抗/ADC 线性曲线。

表 3. 曲妥单抗和 ADC 的线性范围汇总 (n = 3)

曲妥单抗		ADC	
浓度 (µg/mL)	平均峰面积	浓度 (µg/mL)	平均峰面积
15.625	16.4	15.625	22.6
31.25	30.6	31.25	37.9
62.5	64.4	62.5	91.2
125	140.7	125	178.8
250	277	250	348.4
500	538.2	500	704.7
1000	1095	1000	1400
2000	2179	2000	2821

聚集体/降解物分析

我们利用 SEC 将天然和强应激曲妥单抗以及 ADC 进行了对比，以监测聚集体和降解物。在色谱运行中，在单体形式之前和之后洗脱的所有峰分别被认为是聚集体峰降解物峰 [3]。

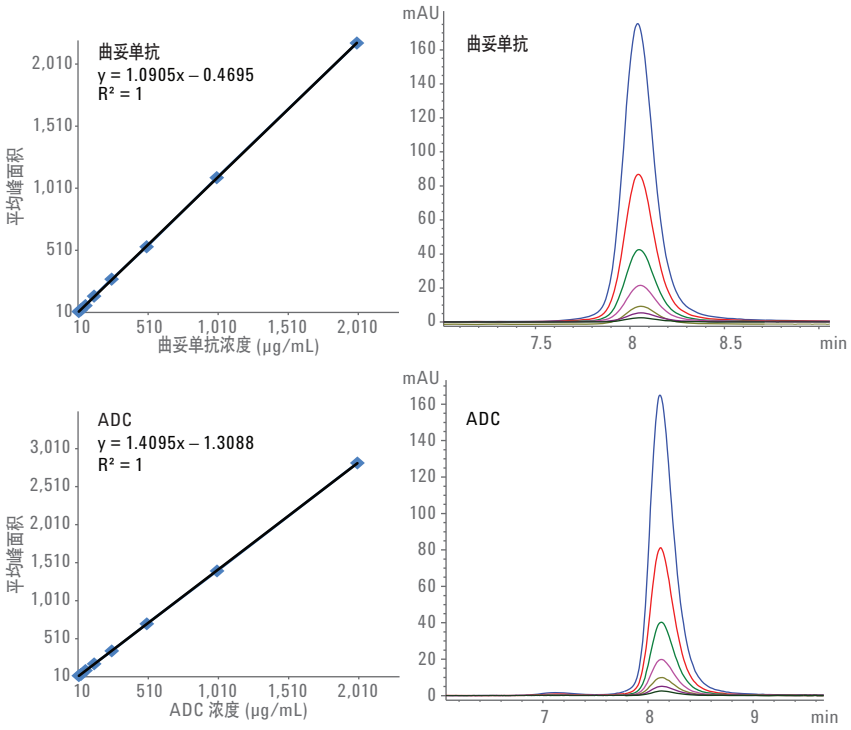


图 4. 浓度范围为 15.62 - 2000 µg/mL 的 8 个标准浓度曲妥单抗和 ADC 的线性曲线显示出极佳的线性相关系数值。同时还显示出线性范围内的叠加色谱图

图 5 和 6 所示的 pH/加热诱导的聚集体色谱图表明，AdvanceBio SEC 色谱柱可用于聚集体以及降解的曲妥单抗和 ADC 的分离和检测。完整态、聚集体和降解物彼此之间都具有良好的分离度。

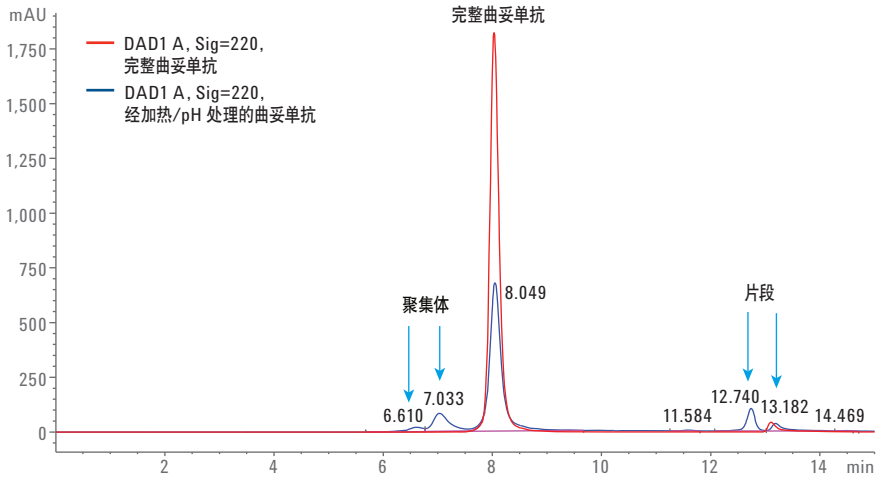


图 5. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å，7.8 × 300 mm，2.7 µm 色谱柱获得的天然（对照，红色）曲妥单抗与 2 mg/mL 经 pH/加热处理的曲妥单抗的叠加色谱图

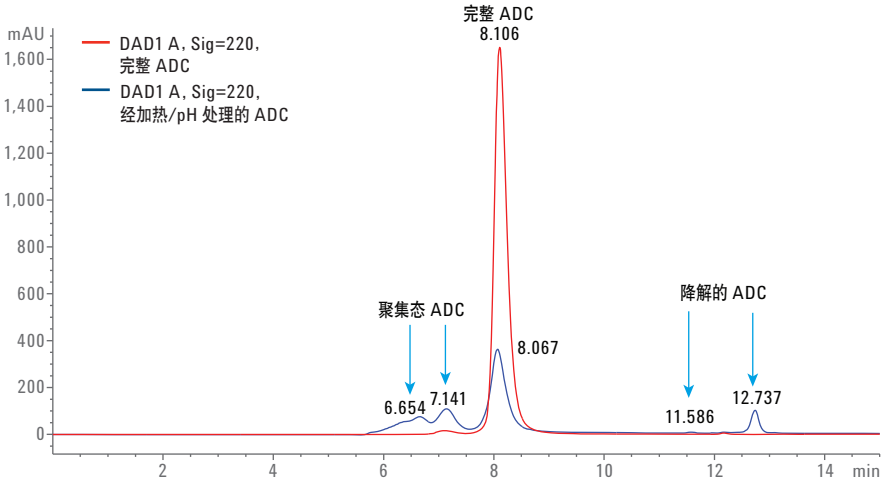


图 6. 使用 Agilent AdvanceBio SEC 300Å，7.8 × 300 mm，2.7 µm 色谱柱获得的天然（对照，红色）ADC 与 2 mg/mL 经 pH/加热处理的 ADC 的叠加色谱图

曲妥单抗和 ADC 聚集体和降解物的定量分析

曲妥单抗和 ADC 中聚集体和降解物的相对定量结果以峰面积百分比形式列于表 4 中。

数据清楚地显示，曲妥单抗和 ADC 中的聚集体和降解物浓度有显著上升，而单体构型则相对有所下降，分别下降至 71% 和 54%。尽管这些结果令人鼓舞，但它们只有在生物活性数据的支撑下才能够证明聚集体/降解物能够使药效下降。

表 4. 曲妥单抗和 ADC 单体、聚集体和片段的保留时间和峰面积

完整曲妥单抗		处理后曲妥单抗	
保留时间 (min)	峰面积%	保留时间 (min)	峰面积%
7.14	0.140	6.61	2.8
8.034	96.8	7.033	13.26
13.10	3.0	8.03	71.83
		12.74	7.65
		13.18	4.0
完整 ADC		**处理后的 ADC**	
7.115	2	6.654	19
8.106	97.8	7.141	17.8
		8.06	54.92
		11.58	0.2
		12.73	7.5
		14.46	0.2

结论

我们展示了几款用于监测治疗性 mAb 曲妥单抗/ADC T-DM1 纯度和稳定性以及方法开发的强大工具。我们首先采用 Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱开发出了一种简单、高分离度的 mAb 分离方法。特别值得一提的是，AdvanceBio SEC 色谱柱可为疏水性 ADC 提供出色的分离度，而无需在流动相中添加有机改性剂。此方法可获得优异的峰面积与保留时间精密度，表明方法的可靠性较高。浓度范围为 15 - 2000 µg/mL 的 8 个 mAb 和 ADC 标准浓度的线性曲线显示出极佳的线性相关系数值，表明该方法可以实现准确定量。mAb 和 ADC 的 LOD 和 LOQ 分别为 15 µg/mL 和 25 µg/mL，表明该方法的灵敏度很高。此外，mAb 和 ADC 的应激研究还表明，AdvanceBio SEC 色谱柱可根据峰面积百分比对聚集体和降解物进行分离、检测和定量分析。该方法操作简单且具有良好重现性，与 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱的生物惰性和抗腐蚀性结合后非常适用于生物制药行业中单克隆抗体/ADC 的 QA/QC 分析。

参考文献

1. Ba ak Kükrer, B.; Filipe, V.; van Duijn, E.; Kasper, P. T.; Vreeken, R. J.; Heck, A. J. R.; Jiskoot, W. Mass Spectrometric Analysis of Intact Human Monoclonal Antibody Aggregates Fractionated by Size-Exclusion Chromatography. *Pharm. Res*. **2010**, *27*, 2197-2204.
2. Wakankar, A.; Yan Chen; Gokarn, Y.; Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *MAbs* **2011**, *3:2*, 161-172.
3. Rodriquez-Diaz, R.; Wehr, T. Use of Size Exclusion Chromatography in Biopharmaceutical Development. In *Analytical Techniques for Biopharmaceutical Development*; Rodriquez-Diaz, R., Wehr, T., Tuck, S., Eds.; CRC Press: New York, 2005.

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278，400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 10 月 16 日，中国出版

5991-6303CHCN



Agilent Technologies