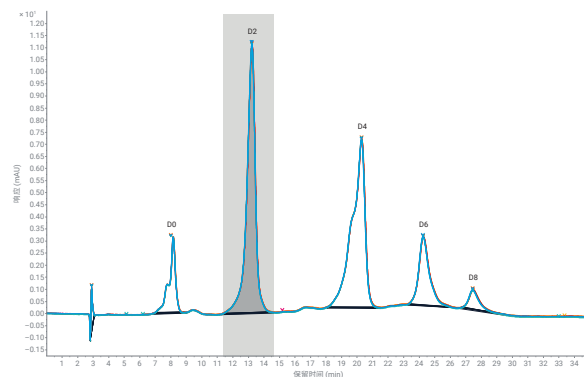


便捷、可靠地分析抗体药物偶联物

在 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统上使用三元梯度进行药物-抗体比率测定



作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

在疏水相互作用色谱 (HIC) 中加入异丙醇等有机改性剂是降低疏水性抗体药物偶联物 (ADC) 的保留能力以及调整选择性的重要参数。本应用简报展示了使用三元梯度并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂, 对本妥昔单抗 ADC 进行的药物-抗体比率 (DAR) 测定。结果表明, Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统对于这种具有挑战性的高浓度盐缓冲液和有机溶剂组合具有出色的重现性, 使之成为新一代安捷伦高端液相色谱系统, 可生成高度可靠的数据。

前言

ADC 是与细胞毒性小分子药物通过化学方法连接的单克隆抗体 (mAb)^[1]。与单独的抗体相比，其结构更为复杂，且具有异质性。

半胱氨酸连接的 ADC（例如本妥昔单抗 ADC）在链间二硫键还原后生成，从而形成可与特定马来酰亚胺连接物偶联的游离巯基。游离巯基的数量限制了可偶联药物特定位置的数量，结果形成每个抗体包含 0 (D0)、2 (D2)、4 (D4)、6 (D6)、8 (D8) 个药物分子的混合物。

特别是由于高 DAR 物质的疏水性，加入有机改性剂（例如异丙醇）有助于从 HIC 柱中完全洗脱。通常，在二元梯度中，将改性剂添加到用于洗脱的流动相（通常是含有少量盐或不含盐的缓冲液）中。Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵作为四元泵，可以使用第三通道添加有机改性剂。由于两种溶剂在泵中混合时可能形成盐晶体，因此高浓度盐缓冲液与有机流动相的结合至关重要。

1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统是新一代安捷伦高端液相色谱系统，专为生物色谱条件而设计：样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁；贯穿 Multisampler、高容量柱温箱和检测器的所有毛细管和接头均由 MP35N（一种镍钴合金）制成。因此，1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统非常适合用于生物色谱条件，凭借通常用于 HIC 的高浓度腐蚀性盐，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

实验部分

设备

Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统，包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵 (G7131C)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A)，配备样品恒温箱（选件 #101）
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)，配备标准流速生物兼容性热交换器
- Agilent 1290 Infinity II 可变波长检测器 (G7114B)，配备生物兼容性微量流通池，3 mm，2 μ L

软件

Agilent OpenLab CDS 2.5 版或更新版本

色谱柱

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱，3.5 μ m，4.6 $\times$ 100 mm（部件号 685975-908）

化学品

所有试剂纯度均为液相色谱级。异丙醇购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水来自配置 0.22 μ m 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)。磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物和硫酸铵购自 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)。

样品

本妥昔单抗 ADC（商品名 Adcetris，来自 Takeda, Tokyo, Japan）溶于 50% 水: 50% 溶剂 A（见下文），浓度为 100 mg/mL。

注：由于 Adcetris 含有多种佐剂，此处提及的浓度不只是蛋白质浓度，而是药物所有组分的总浓度。

缓冲液配制

A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7

B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7

C) 异丙醇

配制 2 L 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7)：取 5.84 g 磷酸二氢钠一水合物和 15.47 g 磷酸氢二钠七水合物加入 2 L 棕色瓶中，用超纯水定容至 2 L。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 7（缓冲液 B）。将 198.21 g 硫酸铵（总浓度 1.5 mol/L）加入 1 L 棕色空瓶中，用配制好的磷酸盐缓冲液定容至 1 L（& 缓冲液 A）。测量 pH 值，如有需要，将 pH 值调至 7（加入大量盐可改变 pH 值）。配制的缓冲液均使用 0.2 μ m 滤膜过滤。

方法

参数	值
溶剂	A) 1.5 mol/L 硫酸铵溶于 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 B) 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7 C) 异丙醇
梯度	梯度: 0 min 55% A, 40% B, 5% C 25 min 0% A, 75% B, 25% C 停止时间: 35 min 后运行时间: 10 min
流速	0.400 mL/min
温度	25 °C
检测	280 nm, 10 Hz
进样	进样量: 15 µL 样品温度: 10 °C 进样针清洗: 用水清洗 3 秒

注: 在 HIC 中使用高盐流动相需要一台能够耐受高盐的液相色谱系统, 而 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统完全不含不锈钢 (SST)/不含铁的流路避免了高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀。此外, 密封垫清洗和进样针清洗等清洗功能有助于避免出现盐析问题。然而, 避免使液相色谱系统或色谱柱暴露于高浓度盐溶液中仍然很重要。

注: 使用高浓度盐溶液作为洗脱液时, 需要考虑在泵方法中设置相应溶剂类型。例如, 对于含 1.5 mol/L 硫酸铵的溶剂 A, 在泵方法的溶剂选择字段使用硫酸铵 1.5 mol/L 而非一般水相或水。高浓度盐可改变溶剂的压缩系数, 因此使用预先配置的溶剂表可以使泵达到理想性能。

结果与讨论

图 1 显示了本妥昔单抗 ADC 的分析结果, 5 个主峰分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。图 1 中的每个峰对应分别一个完整的 mAb 异构体, 附着的药物分子数量不断增加 (D0–D8 对应 0–8 个结合分子)。通过比较本妥昔单抗 ADC 的 HIC 色谱图与文献中的色谱图, 确定了这些峰^[2]。

我们评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度。通过 7 次后续运行, 经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.055%, 表明 RT 具有良好的精度。这证明了四元泵在运行三元梯度方面的出色性能, 即使在使用高浓度盐缓冲液 (例如本研究使用的 1.5 mol/L 硫酸铵缓冲液) 和异丙醇这样极具挑战性的组合作为有机改性剂的情况下也是如此。峰面积的精度也十分出色, RSD < 0.46% (最后一个峰除外) (见图 1 的表)。

HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布, 也可以测定 DAR。通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分, 能够计算总体 DAR (公式 1)。

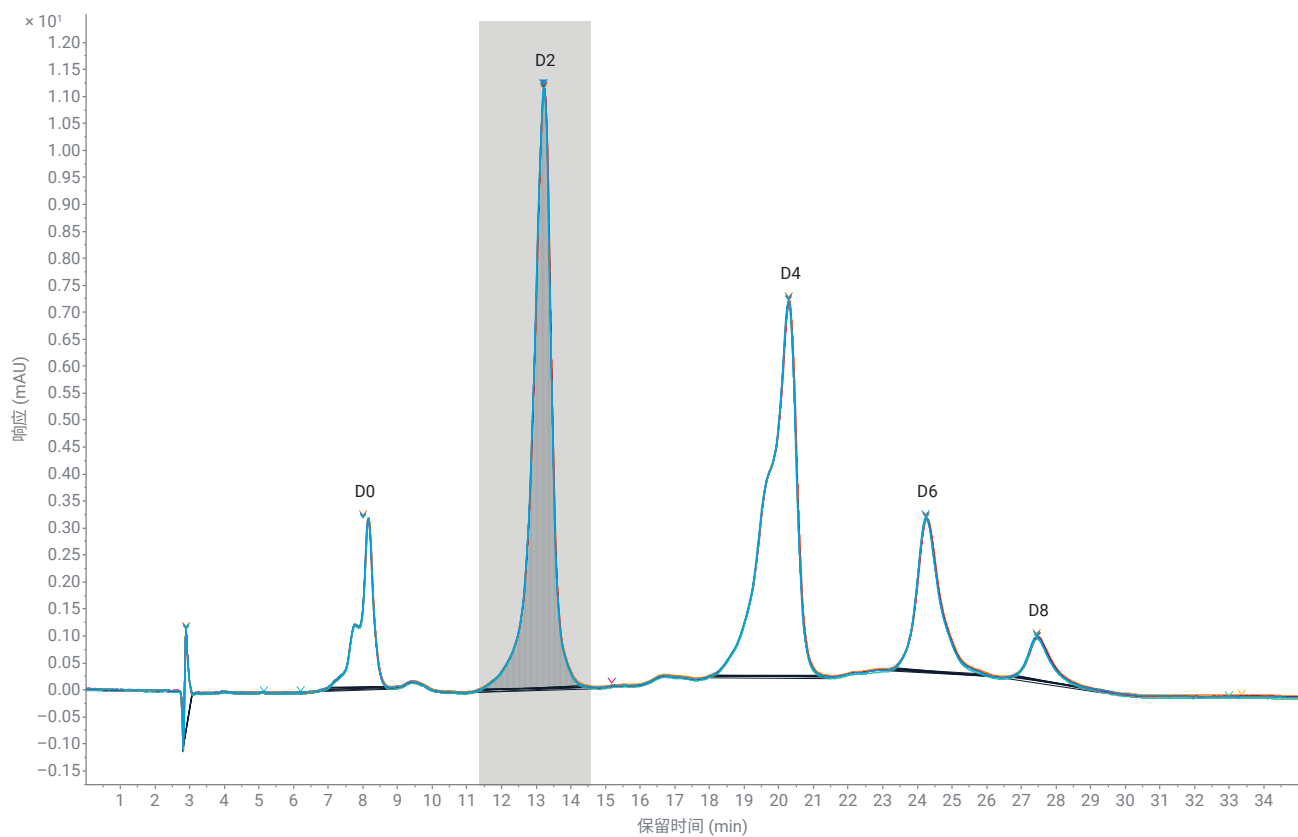


图 1. 使用 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC。D0-D8 表示不同的 DAR 异构体。所示为 7 次后续运行的叠加色谱图。通过空白扣除功能，使用在同一序列中运行的空白进样过滤缓冲液 A 中硫酸铵盐引起的基线漂移

HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR。通过对每个峰的峰面积及其各自载药量进行积分，能够计算总体 DAR（公式 1）。

$$\text{DAR} = \sum_{n=0}^8 \frac{\text{LC 峰面积} \times n_{\text{药物}}}{\text{总 LC 峰面积}}$$

公式 1.

由 5 个观测峰的峰面积积分和峰面积百分比计算得到的 DAR 约为 3.3（见表 1）。

表 1. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积%	DAR 计算值
D0	8.00	89.18	8.11	0
D2	13.22	427.04	38.83	0.78
D4	20.29	405.58	36.88	1.48
D6	24.27	140.51	12.78	0.77
D8	27.48	37.38	3.4	0.27
DAR				3.3

结论

本研究使用三元梯度下的 HIC，并将异丙醇作为第三通道中的有机改性剂，对本妥昔单抗 ADC 进行了分析。5 种预期 ADC 均得到很良好分离，分别对应于含 0、2、4、6、8 个小分子药物的 mAb。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR，经计算为每个抗体 3.3 个药物分子。配备 Agilent 1260 Infinity II 生物全能泵的 Agilent 1260 Infinity II Prime 生物液相色谱系统出色地完成了挑战性溶剂组合的分析。保留时间重现性十分优异，相对标准偏差低于 0.055%，可实现类似二元泵的性能，生成高度可靠的数据。

参考文献

- McCombs, J. R.; Owen, S. C. Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry. *J. Amer. Assoc. Pharm. Sci.* **2015**, 17(2), 339–51
- Rodriguez-Aller, M. et al. Practical Method Development for the Separation of Monoclonal Antibodies and Antibody-Drug-Conjugate Species in Hydrophobic Interaction Chromatography, Part 1: Optimization of the Mobile Phase. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 118, 393–403

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

DE44308.2358796296

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2021
2021 年 5 月 7 日，中国出版
5994-3522ZHCN