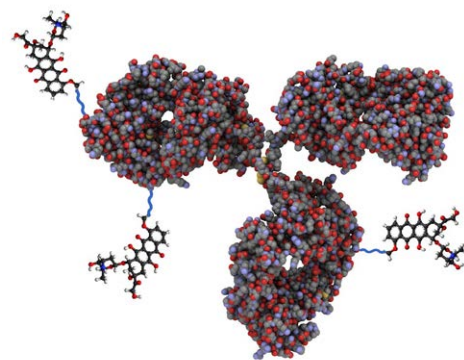


利用正交分析方法提高抗体药物偶联物的质量



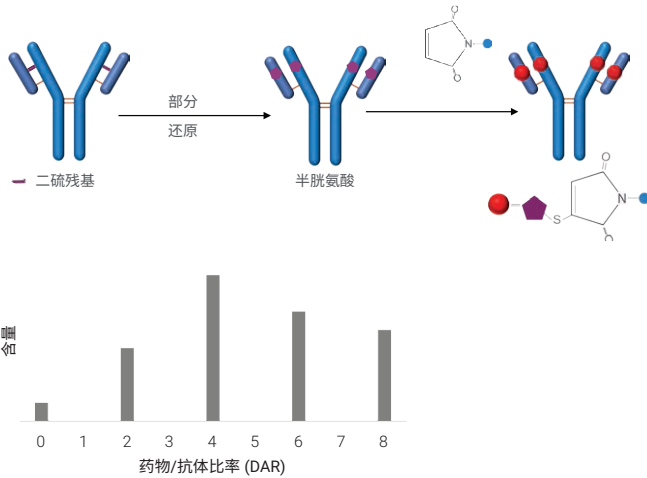
抗体药物偶联物

抗体药物偶联物 (ADCs) 代表了新一代靶向生物治疗药物, 是药物发现管线中快速增长的领域之一。通过连接臂将强效细胞毒性药物与靶向特定细胞的单克隆抗体 (mAbs) 连接, 从而获得抗体药物偶联物。美国 FDA 在 2019/2020 年批准的 ADCs 基于半胱氨酸和赖氨酸的偶联, 其中以半胱氨酸连接臂为主。

表 1. 2019 年至 2020 年获得批准的 ADCs

名称	IgG 亚型	靶点或目标抗原	连接臂平台	有效载荷
吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin)	IgG4	CD33	赖氨酸	卡奇霉素 (calicheamicin)
维布妥昔单抗 (brentuximab vedotin)	IgG1	CD30	半胱氨酸	奥瑞他汀 (auristatin) (MMAE)
恩美曲妥珠单抗 (trastuzumab emtansine)	IgG1	HER2	赖氨酸	美登素 (maytansine) (DM1)
奥英妥珠单抗 (inotuzumab ozogamicin)	IgG4	CD22	赖氨酸	卡奇霉素 (calicheamicin)
维博妥珠单抗 (polatuzumab vedotin)	IgG1	CD79b	半胱氨酸	奥瑞他汀 (auristatin) (MMAE)
恩诺单抗 (enfortumab vedotin)	IgG1	Nectin 4	半胱氨酸	奥瑞他汀 (auristatin) (MMAE)
德喜曲妥珠单抗 (trastuzumab deruxtecan)	IgG1	HER2	半胱氨酸	拓扑异构酶 I 抑制剂
戈沙妥珠单抗 (sacituzumab govitecan)	IgG1	TROP-2	半胱氨酸	伊立替康的活性代谢物 (SN-38)
玛贝妥单抗 (belantamab mafodotin)	去岩藻糖基化 IgG1	BCMA	半胱氨酸	奥瑞他汀 (auristatin) (MMAF)

半胱氨酸偶联



赖氨酸偶联

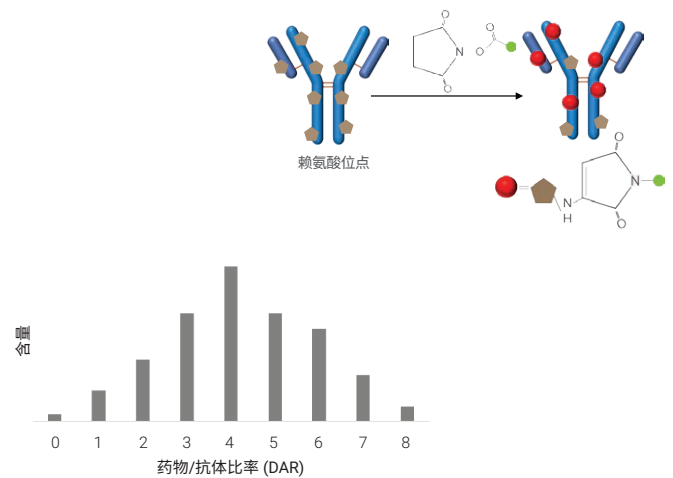


图 1. ADC 偶联类型

对于半胱氨酸偶联，还原铰链区的链间二硫键使药物偶联个数为 2 的倍数，最多偶联 8 个药物。赖氨酸偶联通常会导致高度异质性。例如，恩美曲妥珠单抗 (trastuzumab emtansine) 在整个曲妥珠单抗分子中具有 90 个赖氨酸残基，每个分子可最多偶联 8 个 DM1 药物。

由于行业采用“快速试错，廉价试错”策略来增加最终产品获批的可能性，因此必须尽早深入了解 ADCs 的结构-功能关系。这只能通过采用一系列正交分析技术从各个方面来表征分子的结构和功能来实现。

与抗体偶联以形成 ADCs 的小分子通常为疏水性。对于由半胱氨酸连接的 ADCs，总体疏水性随其 DAR 值的增大而增加，使得疏水相互作用色谱 (HIC) 成为监测 DAR 的理想工具。相反，由赖氨酸连接的 ADCs 具有许多 Lys 残基，并且由多种位置异构体的混合物组成。不建议使用 HIC 分离由赖氨酸连接的 ADCs^[7,8]。反相色谱 (RP) 联用质谱检测 (MS) (RP-MS) 是理想方法。RP 提供了对完整 mAb 和片段的高选择性，而 MS 则提供了高灵敏度和质谱信息，这两者对于峰归属都至关重要。这对于研究由赖氨酸连接的 ADCs 非常重要，因为这些片段含有未偶联和可变偶联的轻链及重链以及那些只带有连接臂的片段^[7]。

为形成 ADC 而连接的疏水性有效载荷也增强了由疏水性造成的聚集现象^[9]。尽管聚集体和降解物的含量较低，但它们仍对生物制剂具有重要影响，如导致活性丧失、溶解度下降以及免疫原性增加。体积排阻色谱 (SEC) 是用于表征蛋白质聚集体的标准方法。

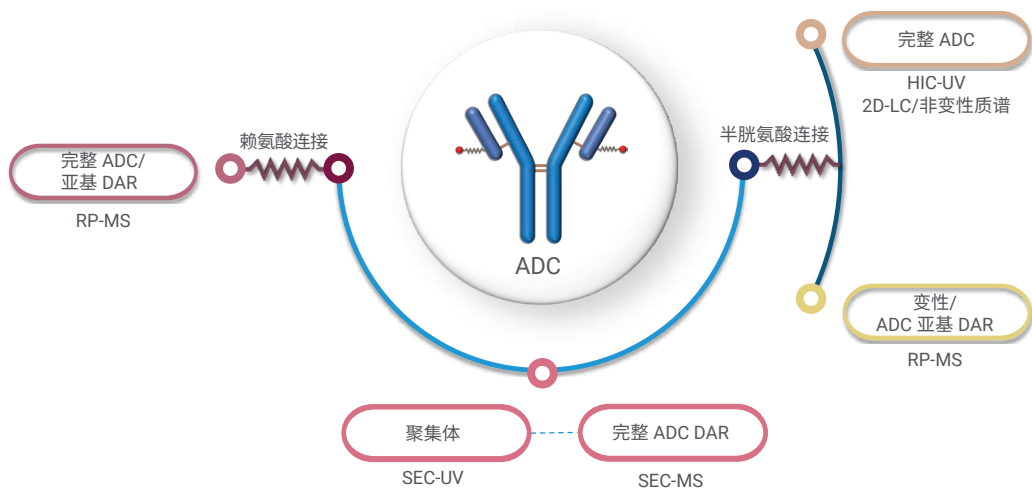


图 2. 用于表征 ADCs 的正交方法

分离的优化技巧

样品前处理

- ADC 样品往往具有疏水性，因此确保其在洗脱液中的溶解度至关重要。理想情况下，样品应溶解于初始流动相中
- 为避免聚集体和杂质可能对色谱柱造成的损坏，我们建议在 HPLC 分析之前使用 Captiva 优级 PES 针头过滤器过滤样品（参见“轻松挑选和订购信息”部分）
- 处理复杂或“脏”样品时，使用保护柱（参见“轻松挑选和订购信息”部分）可延长色谱柱寿命

Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱:

监测天然形式的 ADCs 的 DAR

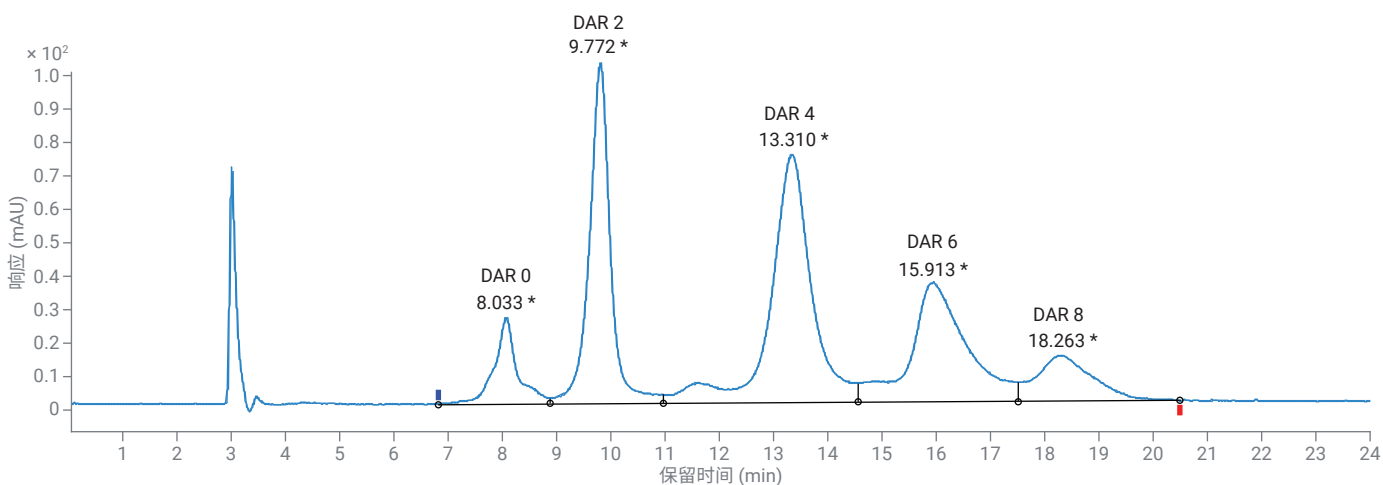


图 3. 使用 Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱分离维布妥昔单抗 (brentuximab vedotin) (5994-0149ZHCN)

疏水相互作用色谱 (HIC)

HIC 利用包含高浓度盐的流动相, 可降低生物分子溶解度。这有利于将这些分子吸附到 HIC 固定相上。通过盐梯度洗脱能够使分子按照疏水性逐渐增加的顺序洗脱。由于 HIC 中使用的盐浓度较高, 因此建议使用生物惰性液相色谱。避免使液相色谱系统或色谱柱停留在高浓度盐溶液中仍然很重要。因此, 采用四元液相色谱系统使其他通道能够用于有机改性剂和水或其他冲洗溶剂。有必要使用异丙醇, 以确保准确测定更高阶的 DARs 并延长色谱柱寿命^[1]。

- 硫酸铵是 HIC 中常用的盐, 因为它能够诱导疏水性蛋白质与色谱柱发生相互作用, 但它也增加了发生沉淀的可能性。避免沉淀的理想方法是用高浓度硫酸铵稀释样品, 使样品基质尽可能接近初始流动相^[2]。其优势如下:
 - 更出色的峰形和灵敏度
 - 进样前提前了解样品是否沉淀, 避免样品沉淀到柱头
- 在梯度结束时, 使用相对缓慢的反向梯度运行几分钟。用 2-3 倍柱体积进行再平衡 (用户指南)
 - 由于盐浓度变化导致粘度急剧变化, 需要逐渐恢复到初始流动相, 以防止色谱柱损坏
- 升高温度是运行高粘度流动相的常用方法, 但不建议用于 HIC, 因为会导致蛋白质峰形变差
- 2 mol/L 硫酸铵的浓度相当大。如果使用纯度较低的盐, 色谱图的基线会发生漂移
 - 可以采用 [OpenLab CDS 空白扣除](#) 滤除基线漂移^[3]

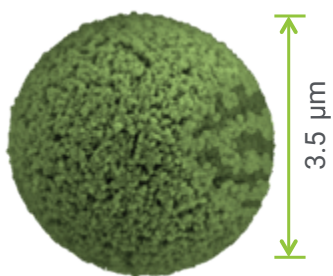


图 4. AdvanceBio HIC (孔径 450 Å)

Agilent PLRP-S 色谱柱:

监测完整 ADCs 和亚基的 DAR

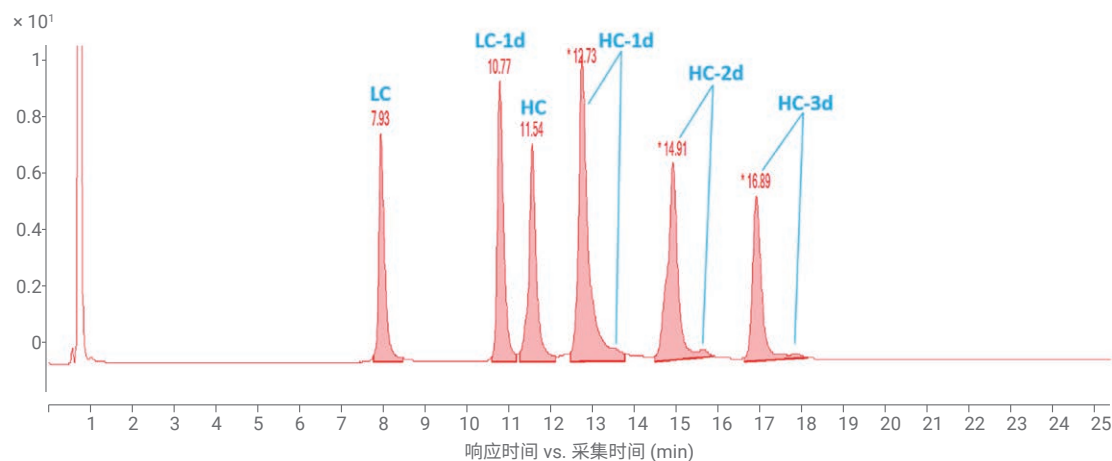


图 5. 利用反相色谱分离还原的维布妥昔单抗 (brentuximab vedotin) 在 280 nm 波长下的紫外吸收光谱, 并通过质谱来确定峰归属 ([S991-6559CHCN](#))

PLRP-S

- 虽然反向使用色谱柱通常对色谱柱没有危害, 但也应该尽量避免, 除非需要尝试除去堵塞柱前筛板的颗粒物 (参见“[色谱柱维护](#)”)
- 刚开始时采用低流速, 然后缓慢地提升到所需操作流速, 以防止压力过高
- 始终使用高纯度试剂和色谱级溶剂配制流动相。使用前对所有的流动相进行脱气和过滤
- 可以使用在线过滤器来保护色谱柱并延长其使用寿命
- 避免在 PLRP-S 色谱柱中使用 100% 水相洗脱液, 这会显著缩短色谱柱使用寿命, 并导致峰宽增加和对称性变差

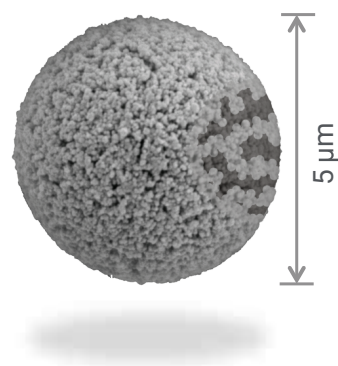


图 6. PLRP-S (孔径 1000 Å)

Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱:

监测单体、二聚体、聚集体和降解物

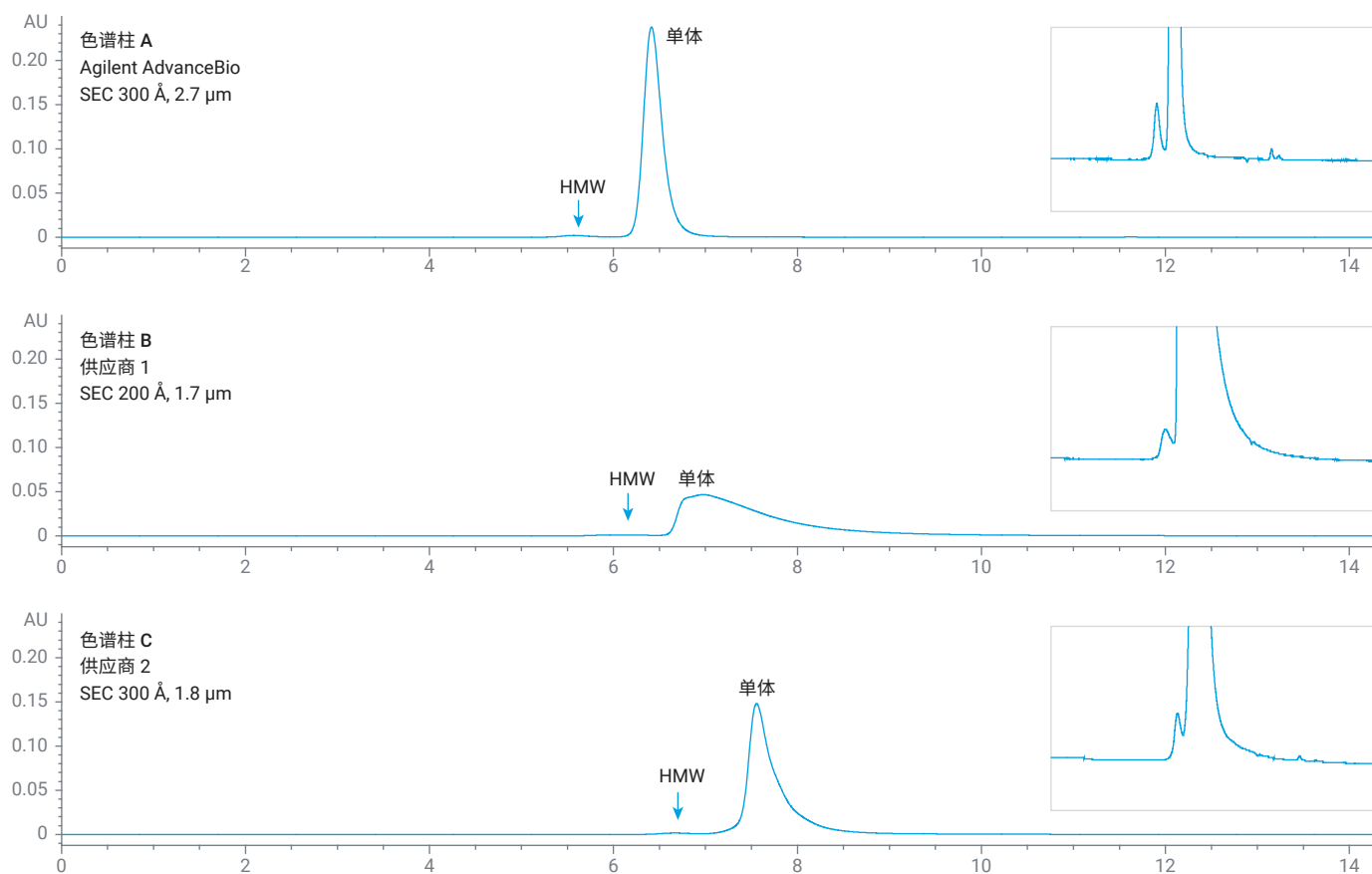


图 7. 用于分析 Lys 连接的恩美曲妥珠单抗 (trastuzumab emtansine) 的 AdvanceBio SEC 300 Å (2.7 μm) 色谱柱。色谱柱 B 表现出更强的次级相互作用，表现为峰分离度降低。色谱柱 C 提供的峰形稍窄，但分离度也不如 AdvanceBio 色谱柱 ([5994-3276EN](#))

体积排阻色谱 (SEC)

聚集体分析是 ADC 表征的另一关键质量属性。这种分析很复杂，因为存在连接至抗体的细胞毒性药物，而这些药物可能诱导聚集并产生更复杂的杂质谱。SEC 对于聚集体和片段的定量仍然是有效的，但更具有挑战性。ADCs 通常比单独的 mAbs 具有更强的疏水性，因此更容易受到非特异性相互作用的影响。选择具有惰性亲水键合表面化学性质的固定相很重要，其能够大幅减少次级相互作用，而不需要可能影响聚集状态的有机改性剂。

非变性 LC/MS 方法还能够测定半胱氨酸连接和赖氨酸连接的 ADC DAR。安捷伦开发了一种 2D-LC/MS 方法^[10]，用于在非变性 LC/MS 条件下表征完整的半胱氨酸连接的 DARs。该工作流程使用 Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱、Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱和高灵敏度 MS 方法来准确测定具有各种 DARs 的所有 ADCs 的完整质量数。类似地，安捷伦使用 Agilent AdvanceBio SEC 200 Å (1.9 μm) 色谱柱和配备安捷伦喷射流离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统开发了一种非变性 LC/MS 方法^[11]。该方法大幅减少了流动相中有机溶剂和酸的干扰，是分析赖氨酸连接的 ADCs 的理想选择。

- 长色谱柱可提高分离度 — 非常适合从单体中分离更高阶的聚集体
- [AdvanceBio SEC 300 Å \(2.7 μm\) 色谱柱](#)有多种柱长和内径可供选择，可快速准确地定量 ADCs 聚集体和单体 ([用户指南](#))
- pH 7.4 的水相流动相 PBS 为半胱氨酸连接和赖氨酸连接的 ADCs 提供了出色的分离度^[6]
- 更高的盐浓度不会提高 ADCs 的峰分离度^[6]

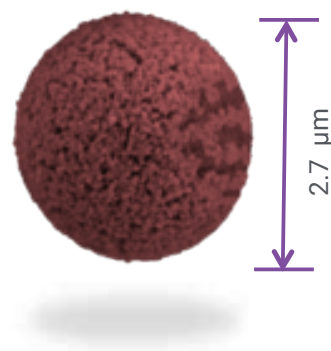


图 8. AdvanceBio SEC (孔径 300 Å)

轻松挑选和订购信息

要从安捷伦在线商城订购下表中列出的商品，请单击“我的列表 #”标题链接将商品添加至您的“收藏产品”列表中。然后输入您需要的产品数量，将产品添加至购物车并继续结算。您的列表便会保留在“收藏产品”下，供您将来订购时使用。

如果这是您首次使用“收藏产品”，系统会要求您输入电子邮件地址进行账户验证。如果您已有安捷伦账户，可以直接登录。但是，如果您尚未注册安捷伦账户，则需要注册账户。该功能仅在启用了电子商务功能的地区有效。您也可以通过客户服务中心或经销商渠道订购所有物品。

描述	部件号
“我的列表”中的样品前处理备件	
Captiva 一次性注射器, 5 mL, 100/包	9301-6476
Captiva 优级针头过滤器, PES, 15 mm, 0.2 µm, 100/包	5190-5096
“我的列表”中的标准品	
Agilent-NISTmAb 标准品, 25 µL	5191-5744
Agilent NISTmAb, 4 × 25 µL	5191-5745
300 Å AdvanceBio SEC 校准标样	5190-9417
“我的列表”中的 AdvanceBio HIC 色谱柱	
AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm, 3.5 µm	685975-908
AdvanceBio HIC, 4.6 × 30 mm, 3.5 µm	681975-908
“我的列表”中的 AdvanceBio PLRP-S 色谱柱	
PLRP-S 1000 Å, 1.0 × 50 mm, 5 µm	PL1312-1502
PLRP-S 1000 Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm	PL1912-1502
PLRP-S 1000 Å, 4.6 × 50 mm, 5 µm	PL1512-1502
PLRP-S, 1000 Å, 5 µm, 2.1 × 50 mm, 带 PEEK 内衬	PL1912-1502PK
PLRP-S, 1000 Å, 5 µm, 2.1 × 100 mm, 带 PEEK 内衬	PL1912-2502PK

描述	部件号
“我的列表”中的 AdvanceBio SEC 色谱柱	
AdvanceBio SEC 300 Å 液相色谱柱, 4.6 × 150 mm, 2.7 µm	PL1580-3301
AdvanceBio SEC 300 Å 液相色谱柱, 4.6 × 300 mm, 2.7 µm	PL1580-5301
AdvanceBio SEC 300 Å 液相色谱柱, 7.8 × 150 mm, 2.7 µm	PL1180-3301
AdvanceBio SEC 300 Å 液相色谱柱, 7.8 × 300 mm, 2.7 µm	PL1180-5301
AdvanceBio SEC 300 Å 液相色谱保护柱, 4.6 × 50 mm, 2.7 µm	PL1580-1301
AdvanceBio SEC 300 Å 液相色谱保护柱, 7.8 × 50 mm, 2.7 µm	PL1180-1301
AdvanceBio SEC 200 Å 液相色谱柱, 4.6 × 150 mm, 1.9 µm	PL1580-3201
AdvanceBio SEC 200 Å 液相色谱保护柱, 4.6 × 30 mm, 1.9 µm	PL1580-1201
AdvanceBio SEC 200 Å 液相色谱柱, 4.6 × 300 mm, 1.9 µm	PL1580-5201
AdvanceBio SEC 200 Å 色谱柱, 1.9 µm, 2.1 × 150 mm, 带 PEEK 内衬	PL1980-3201PK
AdvanceBio SEC 200 Å 色谱柱, 1.9 µm, 2.1 × 50 mm, 带 PEEK 内衬	PL1980-1201PK
“我的列表”中的 HPLC 备件	
超低扩散工具包, 生物, 用于 1290 Infinity II 生物系统	5004-0007
超低扩散工具包, 用于 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系列	5067-5189
“我的列表”中的溶剂和试剂	
InfinityLab LC/MS 级超纯乙腈, 1 L	5191-4496
InfinityLab LC/MS 级超纯水, 1 L	5191-4498
甲酸 — 纯度 99.5%	G2453-85060

描述	部件号
“我的列表”中的色谱柱接头	
Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接接头 (用于色谱柱入口连接)	5067-5965
Agilent InfinityLab Quick Connect 快速连接毛细管 MP35N 0.12 × 105 mm (用于 Quick Connect 快速连接接头)	5500-1578
Agilent InfinityLab Quick Turn 接头 (用于色谱柱出口连接)	5067-5966
Quick Turn 毛细管, MP35N, 0.12 × 280 mm (用于 Quick Turn 接头)	5500-1596
用于 Quick Turn 接头的安装工具	5043-0915
毛细管, MP35N, 0.17 × 100 mm, SL/SL, ps/ps (用于连接 SEC 保护柱和色谱柱)	5500-1278
毛细管, MP35N, 0.12 × 90 mm, SL/SL, ns/ns (用于连接 PLRP-S 保护柱和色谱柱)	5004-0018
“我的列表”中的溶剂处理备件	
InfinityLab Stay Safe 溶剂瓶安全盖起始工具包	5043-1222
InfinityLab 溶剂瓶, 透明, 1 L	9301-6524
InfinityLab 溶剂瓶, 棕色, 1 L	9301-6526
溶剂瓶, 透明, 2 L	9301-6342
溶剂瓶, 棕色, 2 L	9301-6341
InfinityLab Stay Safe 吹扫瓶, 1 L	5043-1339
InfinityLab 废液瓶, GL45, 6 L, 带 Stay Safe 安全盖 (不包括活性炭过滤器 5043-1193)	5043-1221
带时间标签的 InfinityLab 活性炭过滤器, 58 g (与 5043-1221 配套使用)	5043-1193
“我的列表”中的溶剂过滤备件	
InfinityLab 溶剂过滤组件	5191-6776
InfinityLab 溶剂过滤烧瓶, 玻璃, 2 L	5191-6781
尼龙滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μm, 100/包	5191-4341
再生纤维素滤膜, 47 mm, 孔径 0.2 μm, 100/包	5191-4340
溶剂瓶玻璃过滤器, 溶剂入口, 20 μm	5041-2168
“我的列表”中的样品容器	
A-Line 螺口样品瓶, 2 mL, 棕色, 带书写签, 100/包	5190-9590
蓝色固定螺口盖, PTFE/硅橡胶隔垫, 100/包	5190-7021
样品瓶, 螺口, 透明, 高回收率, 5 mL, 用于液相色谱, 30/包	5188-5369
预开口 PTFE/硅橡胶隔垫, 16 mm, 100/包	5188-2758
瓶盖, 螺口, 用于 6 mL 样品瓶, 100/包	9301-1379
InfinityLab 96 孔板, 2.0 mL, 圆孔, U 形, 聚丙烯, 45 mm, 30/包	5043-9302
InfinityLab 96 孔板, 2.2 mL, 方孔, U 形, 聚丙烯, 41 mm, 30/包	5043-9300

参考文献

- 用于抗体药物偶联物 (ADC) 药物/抗体比率 (DAR) 分析的 AdvanceBio HIC 色谱柱
[5994-0149ZHCN](#)
- A Trio of Techniques on the Road to Complete CQA Characterization: Glycosylation, Aggregation, and DAR (完整表征 CQA 的三种技术: 糖基化、聚集和 DAR)
[5994-2097EN](#)
- 高盐 — 高重现性
[5994-2691ZHCN](#)
- 用于 mAb 和 ADC LC/MS 分离的 PLRP-S 聚合物型反相色谱柱
[5991-7163CHCN](#)
- 使用 UHPLC/Q-TOF 联用系统测定抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/抗体比率 (DAR)
[5991-6559CHCN](#)
- Evaluation of SEC Columns for Analysis of ADC Aggregates and Fragments (用于分析 ADC 聚集体和片段的 SEC 色谱柱的评估)
[5994-3276EN](#)
- Analysis of Antibody-Drug Conjugates Using Size Exclusion Chromatography and Mass Spectrometry (使用体积排阻色谱和质谱分析抗体药物偶联物)
[5991-6439EN](#)
- Analysis of Monoclonal Antibodies (单克隆抗体的分析)
[5991-6376EN](#)
- Jakob W. Buecheler, Matthias Winzer, Jason Tonillo, Christian Weber, and Henning Gieseler Molecular Pharmaceutics 2018 15 (7), 2656-2664 DOI: [10.1021/acs.molpharmaceut.8b00177](#)
- Characterization of Antibody-Drug Conjugates Using 2D-LC and Native MS (使用二维液相色谱和非变性质谱表征抗体药物偶联物)
[5994-4328EN](#)
- 使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子非变性质谱分析
[5994-1739ZHCN](#)

注: ADC DAR 计算器升级 (部件号 G4994AA) 可用于 MassHunter DAR 计算器软件, 该软件旨在研究从 ADC 获得的解卷积 LC/MS 样品数据的 DAR 比率。请联系当地的安捷伦客户服务中心了解订购信息。

Agilent CrossLab 服务

CrossLab 代表了安捷伦集服务和消耗品于一体的独特解决方案，以支持客户获得工作流程的成功以及更高的生产力和运行效率等重要成果。安捷伦通过 CrossLab 在每一次互动中为您提供深刻见解，助您实现业务目标。CrossLab 提供方法优化、灵活的服务计划以及针对各种技能水平的培训。我们还有许多其他产品和服务来帮助您管理仪器和实验室，确保实现理想性能。

如需了解关于 Agilent CrossLab 的更多信息，以及洞察敏锐、成就超群的示例，请访问：www.agilent.com/crosslab。

如需了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/advancebio

如需获取技术问题的答案和安捷伦社区的资源，请访问：

community.agilent.com

安捷伦客户服务中心：

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/chem/ordering-guides

DE73791623

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，2022
2022 年 11 月 17 日，中国出版
5994-5089ZHCN

Agilent
CrossLab
From Insight to Outcome

 **Agilent**
Trusted Answers