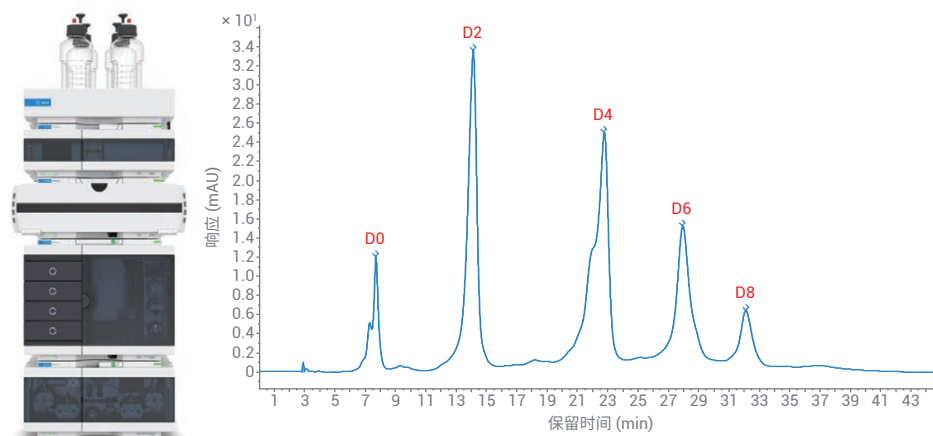


高盐 — 高重现性

使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过疏水相互作用色谱分析抗体药物偶联物



作者

Sonja Schneider
安捷伦科技有限公司

摘要

通常使用疏水相互作用色谱 (HIC) 测定药物/抗体比率 (DAR)。这种温和的非变性分析方法的洗脱液含有高浓度腐蚀性盐，对液相色谱 (LC) 系统提出了挑战。

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统包括高速泵及其完全不含铁的流路，非常适合用于生物色谱条件，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR。经计算，DAR 为每个抗体 3.7 个药物分子。所得结果具有良好的重现性，证明 1290 Infinity II 生物液相色谱仪作为新一代安捷伦高端液相色谱系统，生成的数据具有最高可信度。“空白扣除”是 Agilent OpenLab CDS 的一项软件功能，可以消除由于硫酸铵纯度较低造成的基线漂移，从而实现平滑积分。

前言

抗体药物偶联物 (ADCs) 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 (mAbs)^[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 ADCs^[2] (如本妥昔单抗 ADC, 商品名为 Adcetris, 由 Takeda 原研) 将小分子连接到部分还原 mAb 的游离巯基上^[3,4]。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、2、4、6、8 个药物分子的混合物。与 mAb 偶联的平均药物分子数量是 ADC 最重要的质量属性之一, 因为它直接影响 ADC 的安全性和有效性。DAR 决定了可以递送到所需组织的有效载药量^[5]。

HIC 是分离每个抗体的载药量不同的半胱氨酸连接的 ADC 分子的参考技术^[6]。相对疏水性随 ADC 载药量的增加而增加, 因为与 mAb 连接的小分子通常相对具有疏水性。因此, HIC 非常适用于监测 DAR。

HIC 是一种可以保持天然蛋白结构的非变性分析技术。它通常在中性 pH 条件下进行, 可以使用从高到低的盐梯度分离蛋白质。分离原理与蛋白质盐析实验相同^[6]。在流动相 A 中使用高浓度盐缓冲液, 蛋白质失去水化层, 保留在固定相的疏水表面。流动相 B 通常为相同的缓冲液 (主要是磷酸盐), 不添加盐。随着流动相 B 在梯度中的占比增加, 蛋白质重新形成水化层并从色谱柱中洗脱。加入少量有机溶剂 (如异丙醇) 也有助于从色谱柱中洗脱蛋白质。

1290 Infinity II 生物液相色谱是新一代安捷伦高端液相色谱系统, 专为生物色谱条件 (如 2 mol/L NaCl^[7]、高达 8 mol/L 尿素的高盐浓度, 以及如 0.5 mol/L NaOH 或 0.5 mol/L HCl 的高/低 pH 溶剂) 而设计。样品流路完全不含不锈钢 (SST) 或铁; 贯穿 Multisampler、大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。这种材料可以减少高浓度盐缓冲液的潜在腐蚀, 避免因铁离子存在引起的蛋白质修饰 (如氧化、蛋白质复合物形成)。

本应用简报介绍了使用 HIC 测定本妥昔单抗 ADC 的 DAR, 评价了保留时间和峰面积的精度。此外, 还展示了 OpenLab 2 数据处理方法中的“空白扣除”功能过滤漂移基线的优势。

实验部分

设备

Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统, 包括以下模块:

- Agilent 1290 Infinity II 生物高速泵 (G7132A)
- Agilent 1290 Infinity II 生物 Multisampler (G7137A), 配备样品恒温箱 (选件 #101)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (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

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) 溶于一半水、一半溶剂 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 + 20% 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。然后，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 值调回 7（加入大量盐可改变 pH 值）。将 200 mL 异丙醇和 800 mL 配制好的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 7）混合并加入 1 L 棕色空瓶中（→ 缓冲液 B）。配制的缓冲液均使用 0.2 μm 滤膜过滤。

注：与 mAb 偶联的疏水性药物小分子的存在导致整体疏水性相应增加。因此，有必要在流动相中加入一些有机改性剂（此处加入 20% 异丙醇）。

方法

表 1. 盐梯度色谱条件

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 + 20% 异丙醇
梯度	0 min 时 30% B，30 min 时 100% B 停止时间：45 分钟 后运行时间：10 分钟
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 1290 Infinity II 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最佳性能。

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。HIC 分析既可以表征药物连接异构体的分布，也可以测定 DAR。

虽然链间二硫键被偶联的药物破坏和占据，但抗体链间的共价键和非共价键力相结合足以使 mAb 在分析过程中保持完整形态。这是由于 HIC 在温和的非变性条件下进行，使其成为分析半胱氨酸连接 ADCs 的理想选择。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^[6]。

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）。

公式 1.

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

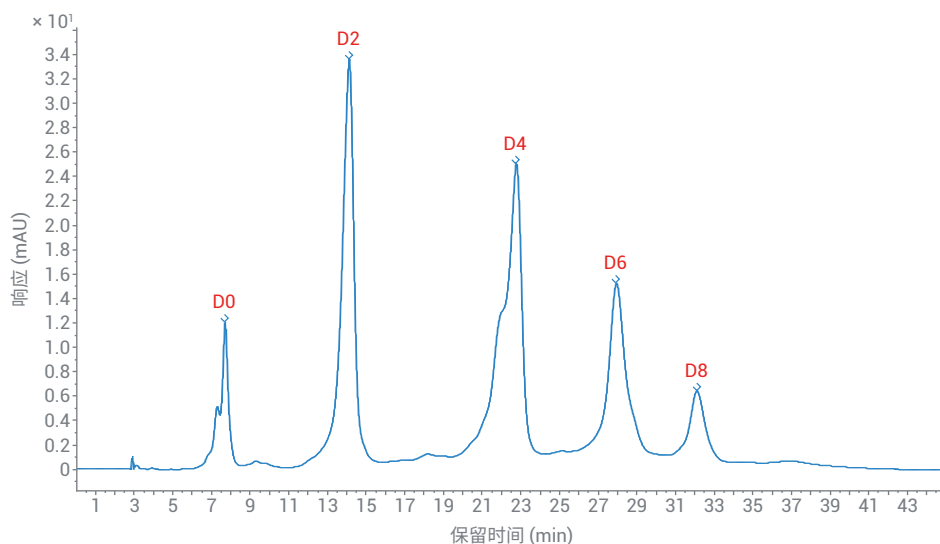


图 1. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分析本妥昔单抗 ADC。D0–D8 表示不同的 DAR 异构体

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 3.7 (见表 2)。这一数值与文献一致^[8]。

我们还评估了保留时间 (RT) 和峰面积的精度 (图 2)。经过 7 次后续运行, 经计算 RT 的相对标准偏差 (RSD) 低于 0.081%, 表明 RT 具有良好的精度。峰面积的精度也十分出色, RSD < 0.282% (见图 2 的表)。

硫酸铵是 HIC 分析中一种极其常用的离液盐。通常使用的盐浓度范围为 1-2 mol/L, 这个浓度相当大。如果在分析中使用较低纯度的盐 (有时从盐晶体的颜色即可看出), 色谱图的基线会发生明显漂移, 造成潜在的积分误差。为了解决这个问题, 可使用一种称为“空白扣除”的软件功能利用空白进样过滤基线漂移。此功能可在 OpenLab 2 的数据处理方法中找到 (参见图 3)。图 4 显示了应用该功能之前和之后具有不同基线行为的色谱图。

表 2. DAR 异构体结果

DAR 异构体	RT (min)	峰面积	峰面积%	DAR 计算值
D0	7.68	378.116	7.59	0
D2	14.12	1537.829	30.84	0.6196
D4	22.78	1756.026	35.22	1.415
D6	27.98	951.983	19.13	1.1506
D8	32.15	340.176	6.79	0.5482
			DAR	3.733

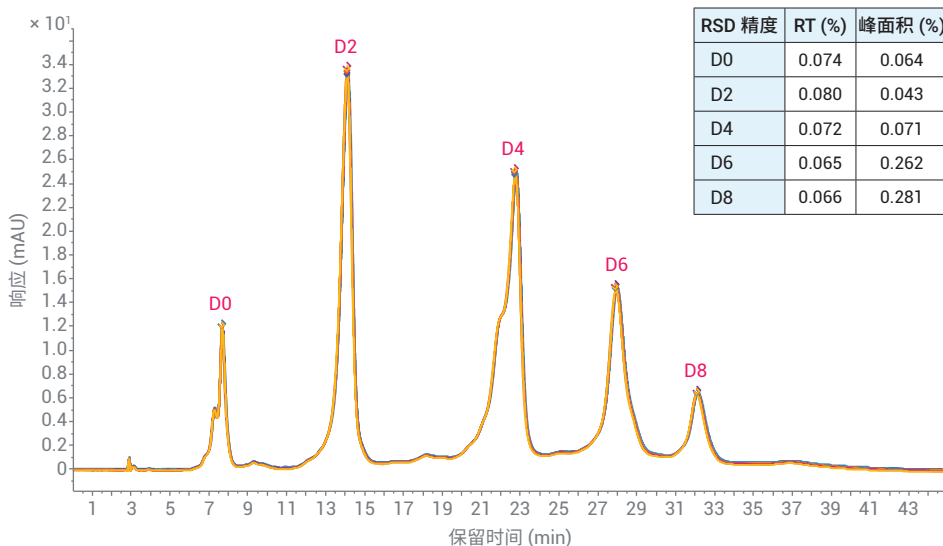


图 2. 使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统分离本妥昔单抗 ADC (7 次后续运行的叠加色谱图)

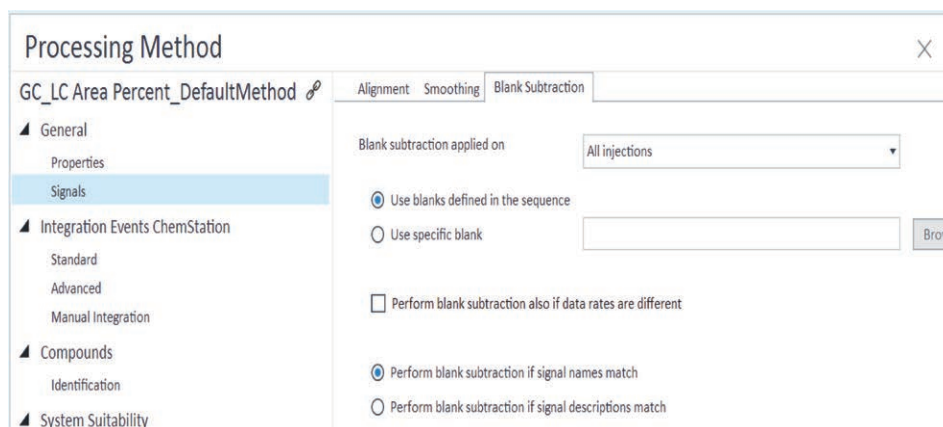


图 3. Agilent OpenLab CDS 2 的数据处理方法中“空白扣除”功能的屏幕截图

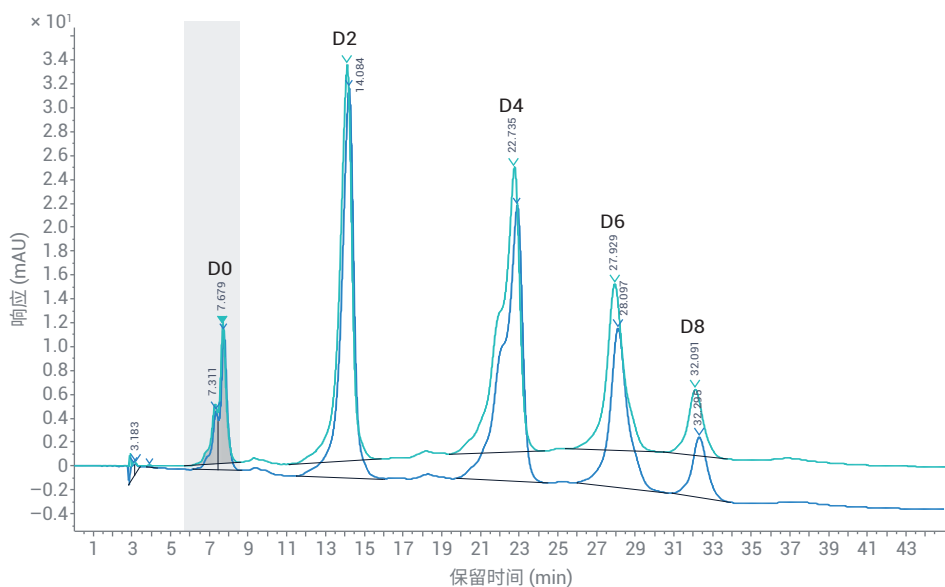


图 4. 空白扣除前(蓝色)和扣除后(绿色)的 HIC 色谱图比较

结论

在 Infinity II 1290 生物液相色谱系统上使用 HIC 法分析了本妥昔单抗 ADC。5 种预期 DAR 异构体均得到很良好分离，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 3.7 个药物分子。7 次后续运行的精度分析显示了 RT 和峰面积的极佳重现性。HIC 中使用的洗脱液含有高浓度的腐蚀性盐，对液相色谱系统带来了挑战。由于具有完全不含铁样品流路，1290 Infinity II 生物液相色谱系统非常适合在生物色谱条件下使用，可避免对系统造成潜在的腐蚀性损坏。

OpenLab 2 软件的空白扣除功能使用户可在分析中使用纯度更低的硫酸铵，而不会对结果产生负面影响。只需扣除空白运行即可校正基线，以实现平滑的积分计算。

1290 Infinity II 生物液相色谱仪的生物兼容性硬件与 OpenLab 2 的新软件功能相结合，产生的数据具有最高可信度。

参考文献

1. 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
2. Marcoux, J. *et al.* Native Mass Spectrometry and Ion Mobility Characterization of Trastuzumab Emtansine, a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1210–1223
3. Younes, A. *et al.* Brentuximab Vedotin (SGN-35) for Relapsed CD30-Positive Lymphomas. *N. Eng. J. Med.* **2010**, *363*(19), 1812–1821
4. Schneider, S. Analysis of Cysteine-Linked Antibody Drug Conjugates (半胱氨酸连接的抗体药物偶联物的分析), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5991-8493EN, **2017**
5. Wakankar, A. *et al.* Analytical Methods for Physicochemical Characterization of Antibody Drug Conjugates. *mAbs* **2011**, *3*(2), 161–172
6. 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
7. High Stakes. High Performance. High Confidence: Agilent 1290 Infinity II Bio LC (卓越性能, 可靠结果, 不负重托: Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统), 安捷伦科技公司产品样本, 出版号 5994-2376ZHNCN, **2020**
8. van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, *4*(4), 458–465

www.agilent.com

DE.9605902778

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, 2020
2020年10月12日, 中国出版
5994-2691ZHNCN

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

