

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

使用 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪

作者

Andrew Coffey 和
Sandeep Kondaveeti
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了 AdvanceBio HIC 色谱柱的特性及其在抗体药物偶联物 (ADC) 分析中的应用。疏水相互作用色谱 (HIC) 是一种分离相互间疏水性逐渐增加的生物分子的方法。这种技术非常适合用于 ADC 的分析, 因为这些复杂分子的疏水性通常高于未修饰的抗体。该技术可提供高分离度, 能够分离具有细微疏水性差异的物质, 包括那些具有不同药物/抗体比率 (DAR) 的 ADC。HIC 的优点之一在于洗脱所用的条件温和, 可确保生物分子保持在未变性状态。这有利于对半胱氨酸连接的 ADC 的分析。

前言

HIC 使用含盐流动相以减小生物分子溶解度，有利于这些分子吸附到 HIC 固定相上。通过梯度洗脱减小盐浓度，能够使分子按照疏水性逐渐增加的顺序洗脱。分离过程类似于反相色谱，但是无需使用通常会导致蛋白质变性的离子对试剂和高浓度有机溶剂组分。这对分析通过半胱氨酸连接的 ADC 来说非常重要。用作有效载荷的小分子连接到部分还原的单克隆抗体 (mAb) 的自由巯基上，但这会导致多分散分布 (图 1)。测量这种分布 (称为 DAR) 对于确定所获得的 ADC 的效价至关重要。

实验部分

仪器与材料

所有化学品和试剂均为 HPLC 级或更高级别，且均购自 Sigma-Aldrich (现属于 Merck) 或 VWR Scientific。水经由 Milli-Q A10 水纯化系统 (Millipore) 纯化。

仪器

Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱仪包括：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置 (选件编号 100)
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器 (选件编号 019)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池 (选件编号 028)

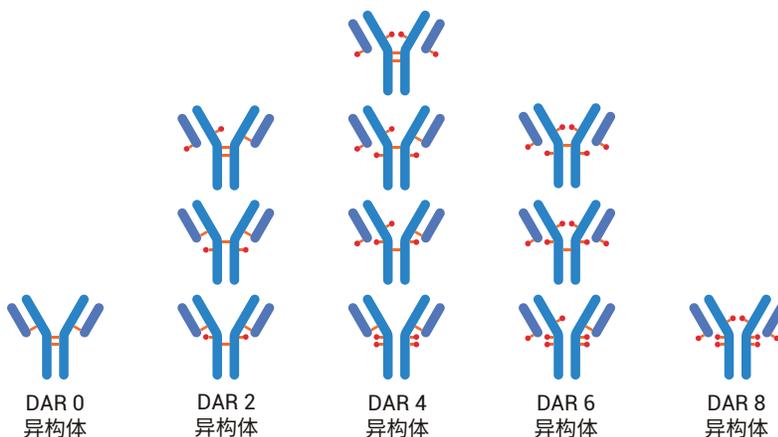


图 1. 具有不同数量和位置的有效载荷组分的半胱氨酸连接的 ADC 的多分散分布

软件

Agilent OpenLab 2.2 CDS

方法条件

	HPLC 条件
色谱柱	AdvanceBio HIC 4.6 × 100 mm (部件号 685975-908) AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm (部件号 681975-908)
流动相	洗脱液 A) 50 mmol/L 磷酸钠, pH 7.0 洗脱液 B) 2 mol/L 硫酸铵 (溶于 50 mmol/L 磷酸钠中), pH 7.0 洗脱液 C) 异丙醇 洗脱液 D) HPLC 级水
流速	0.5 mL/min
柱温	25 °C
进样量	5 µL
总运行时间	31 分钟

典型梯度曲线 (见图 2)

时间	%A	%B	%C
0	50	45	5
15	75	0	25
20	75	0	25
21	50	45	5
31	50	45	5

结果与讨论

HIC 中使用的高浓度盐意味着采用全生物惰性液相色谱是非常有利的。如果附带密封垫清洗和进样针清洗等避免盐析问题的附加功能，那么将更加有利。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。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。与 mAb 偶联的疏水性药物小分子的存在导致 mAb 分子的

总体疏水性发生显著改变。因此，需要在流动相中添加一些有机改性剂（参见方法条件和梯度曲线部分）。

使用 HIC 能够分析处于完整状态的半胱氨酸连接的 ADC（图 2）。如果采用反相技术，将会分离未通过半胱氨酸键连接的重链和轻链。反相色谱可用于分析半胱氨酸连接的 ADC，但是仅在这些分子完全还原的情况下才能实现¹。

通过对不同 DAR 异构体的峰面积积分，能够计算总体 DAR（公式 1）。

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

公式 1.

表 1 显示了计算得到的该样品的值。DAR 4.04 与预期值以及之前观察到的值一致²。

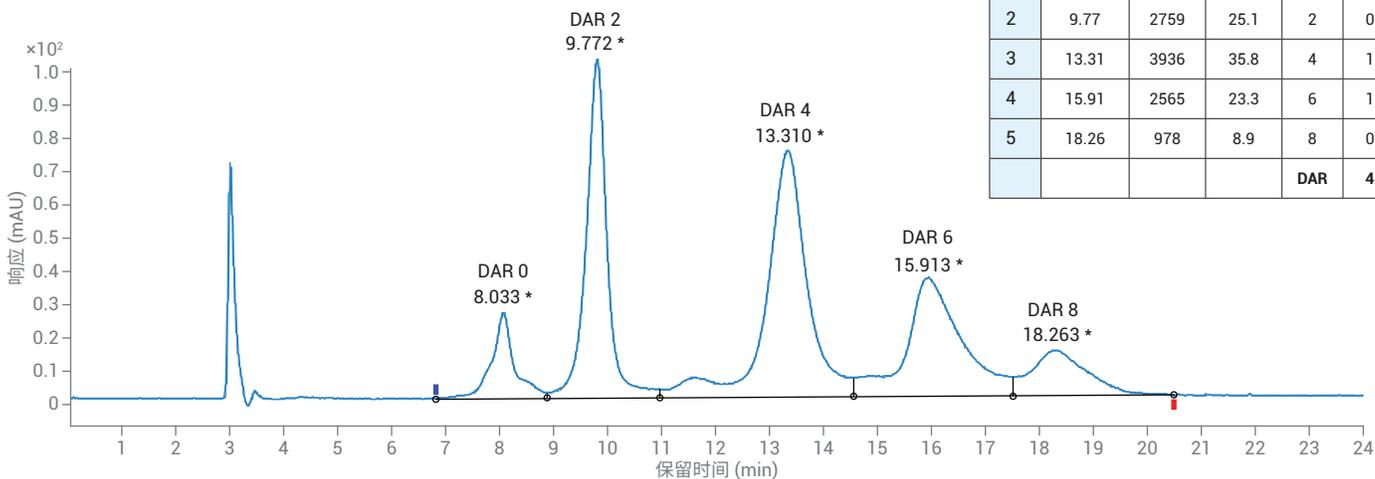


图 2. 本妥昔单抗 (Adcetris) 的 HIC 分离

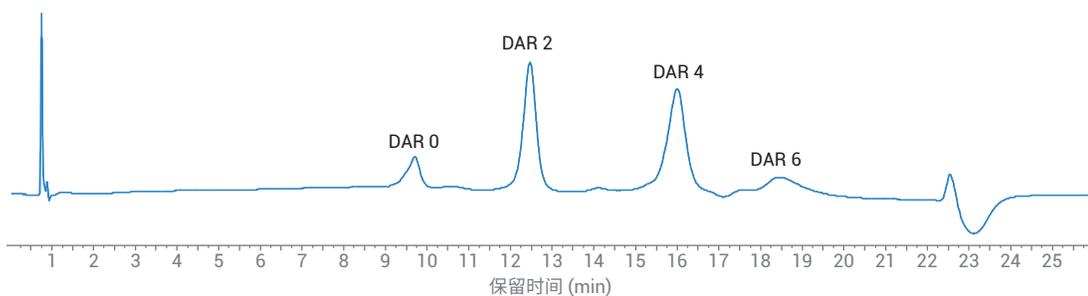
表 1. 峰面积与 DAR 结果

编号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积百分比	DAR	
1	8.03	763	6.9	0	0.00
2	9.77	2759	25.1	2	0.50
3	13.31	3936	35.8	4	1.43
4	15.91	2565	23.3	6	1.40
5	18.26	978	8.9	8	0.71
				DAR	4.04

在样品前处理过程中应小心操作，以确保样品完全溶解且不存在 DAR 异构体歧视；DAR 0 的亲水性高于 DAR 8，并且能够选择性地溶解于流动相中。如果所有样品未完全溶解，则会导致误差。

在流动相条件中包括异丙醇梯度非常重要，否则 DAR 6 和 DAR 8 异构体将可能吸附到色谱柱上。图 3A、3B 和 3C 表明，在异丙醇浓度不足的情况下，疏水性较强的 DAR 6 和 DAR 8 异构体被保留。

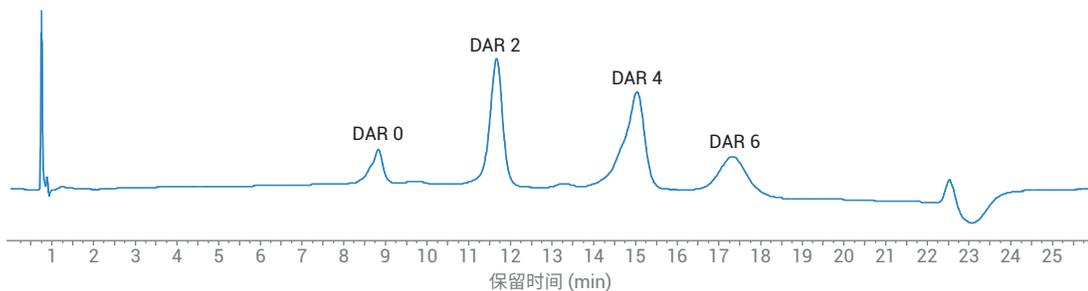
A 异丙醇梯度 5-10%



A. 5-10% 梯度曲线

时间	%A	%B	%C
0	20	75	5
15	90	0	10
20	90	0	10
21	20	75	5
26	20	75	5

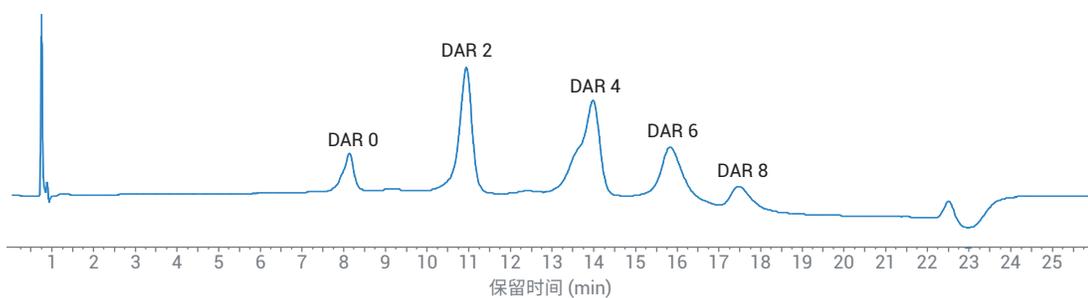
B 异丙醇梯度 5-15%



B. 5-15% 梯度曲线

时间	%A	%B	%C
0	20	75	5
15	85	0	15
20	85	0	15
21	20	75	5
26	20	75	5

C 异丙醇梯度 5-20%



C. 5-20% 梯度曲线

时间	%A	%B	%C
0	20	75	5
15	80	0	20
20	80	0	20
21	20	75	5
26	20	75	5

图 3. 异丙醇梯度对 ADC DAR 异构体分离的影响

通过使用适当的流速和柱长，并在梯度中使用所需量的有机改性剂，较短的 3 cm 色谱柱（图 4）的分离速度比在较长的 10 cm 色谱柱（图 5）上采用较慢梯度时

的分离速度快得多。表 2 和 3 中的结果表明，从这些色谱图中得到的 DAR 值几乎完全相同。

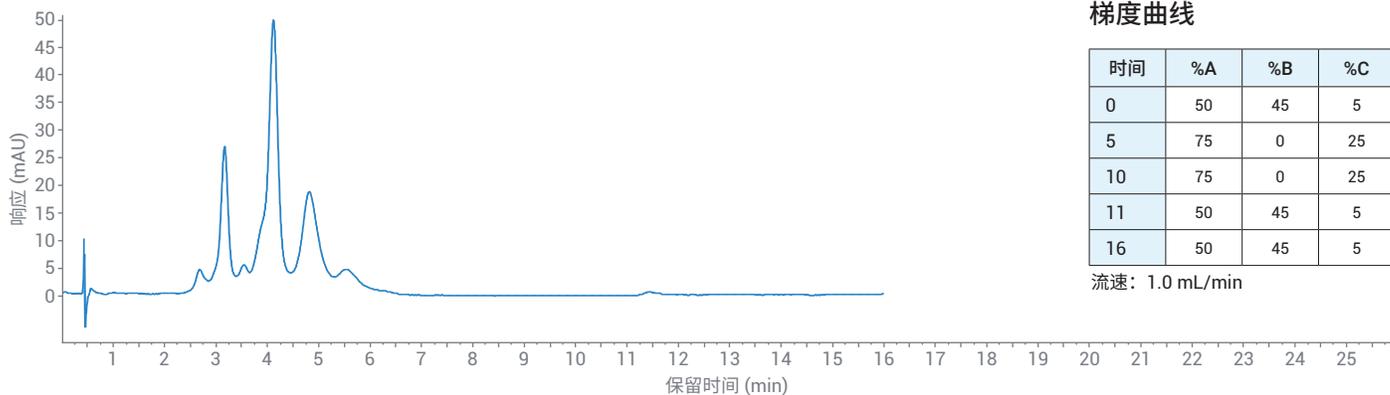


图 4. ADC 模拟物在 AdvanceBio HIC 4.6 × 30 mm 色谱柱上的快速 (8 min) 分离

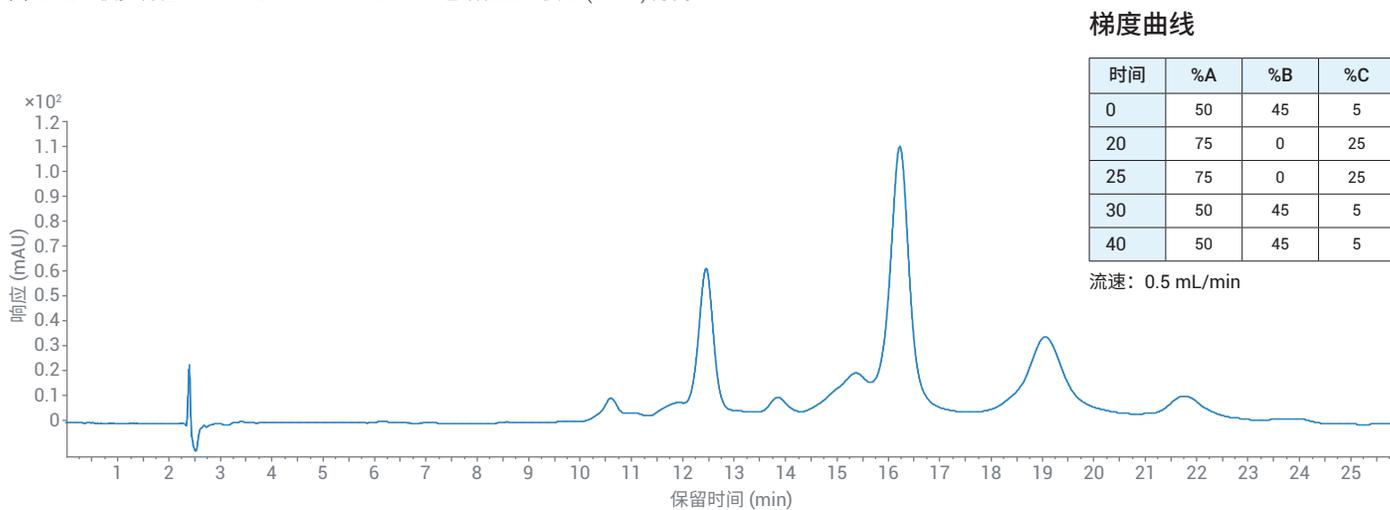


图 5. ADC 模拟物在 AdvanceBio HIC 4.6 × 100 mm 色谱柱上的缓慢 (24 min) 分离

表 2. 由 8 min 分离（图 4）得到的 DAR 值

编号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积百分比	DAR	
1	2.66	61.5	3.2	0	0.0
2	3.14	321.4	16.9	2	0.3
3	4.10	894.1	46.9	4	1.9
4	4.80	471.1	24.7	6	1.5
5	5.52	158.0	8.3	8	0.7
				DAR	4.4

表 3. 由 24 min 分离（图 5）得到的 DAR 值

编号	保留时间 (min)	峰面积	峰面积百分比	DAR	
1	10.61	304.3	3.0	0	0.0
2	12.46	1768.9	17.2	2	0.3
3	16.22	4905.3	47.7	4	1.9
4	19.04	2420.5	23.5	6	1.4
5	21.76	879.1	8.6	8	0.7
				DAR	4.4

结论

我们已经证明，通过控制流动相组成并选择合适的流速和色谱柱尺寸，能够使用 AdvanceBio HIC 色谱柱快速准确地分析 ADC 的 DAR 值。

参考文献

1. S. Zuo, 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), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-6559CHCN, **2016**
2. S. Schneider, 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**

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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, 2018
2018 年 7 月 26 日, 中国出版
5994-0149ZHCN