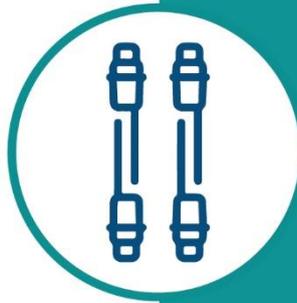




TOSOH



使用TSKgel HIC-ADC Butyl进行高分辨率DAR分析

客户面临的挑战

- ▶ 高DAR值组分分离效果不佳。
- ▶ DAR值定量分析结果重现性欠佳。

东曹的解决方案

TSKgel® HIC-ADC Butyl色谱柱

- ▶ 实现DAR值的高分辨率分离。

做了什么？

- ▶ 使用TSKgel HIC-ADC Butyl和参比柱对6种抗体偶联药物进行了分析，比较了分离度和重现性方面的性能指标。

结果如何？

- ▶ 高DAR值组分在TSKgel HIC-ADC Butyl上的分离效果更优，提升了DAR计算的稳健性和重现性。

TSKgel HIC-ADC Butyl在抗体偶联药物表征方面优于常规色谱柱，尤其对高DAR组分具有更高的分离度、更好的重现性以及更强的质控兼容性。

客户权益

生成可靠的DAR数据以满足法规合规要求，并能确保后续DAR测定的可信度。

TOSOH BIOSCIENCE

**SEPARATION
& PURIFICATION**

CONNECTING MINDS.
TOUCHING LIVES.



基于疏水相互作用色谱法对标准ADC平台的深度表征

Elsa Wagner, Anne Humbert, Laurence Zanna, Jean-François Haeuw (法国Jubilant Biosys公司)

抗体偶联药物 (ADC) 是一类快速发展的生物药, 通过将单克隆抗体的特异性与细胞毒性药物的强效治疗作用相结合而发挥作用。药物抗体比 (DAR) 作为ADC的关键质量属性, 直接影响药物的有效性、稳定性及安全性。

半胱氨酸偶联ADC的分析, 传统上会采用疏水相互作用色谱法 (HIC), 但该方法在分离高DAR值组分时仍存在困难。在本应用笔记中, 我们探究了一款专为ADC分析开发的新型色谱柱的性能表现。研究结果表明, 该色谱柱对多种半胱氨酸偶联ADC (包括高DAR值的ADC) 的分离效果显著, 是此类治疗药物的表征和质控技术的重要突破。

实验条件

- 色谱柱: TSKgel® HIC-ADC-Butyl (5 µm, 4.6 mm ID × 3.5 cm L)
- HIC参比柱 (2.5 µm, 4.6 mm ID × 3.5 cm L)
- 流动相: A: 1.5 mol/L 硫酸铵 / 25 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.0)
B: 25% 异丙醇 / 25 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.0)
- 梯度: 0 - 0.5 min 10% B
0.5-12.5 min 从10% B-100% B (线性梯度)
- 流速: 0.8 mL/min
- 检测: UV@280 nm
- 样品: 5 种已经FDA批准的ADC及1种处于临床开发阶段的ADC (见表1, 进样量20 µg), 未偶联单抗 (进样量5 µg), 用流动相A按1:1比例稀释

结果和讨论

奥瑞他汀和PBD偶联ADC的表征

首先, 为了验证方法的通用性, 我们采用HIC法分析了一组具有载荷异质的且平均DAR值在2-4之间的ADC的DAR分布。作为对照, 同步进样未偶联单抗用于识别D0峰 (数据未显示)。图1展示了ADC在TSKgel HIC-ADC Butyl上的分离色谱图, 以及与常规参比柱的对比结果。

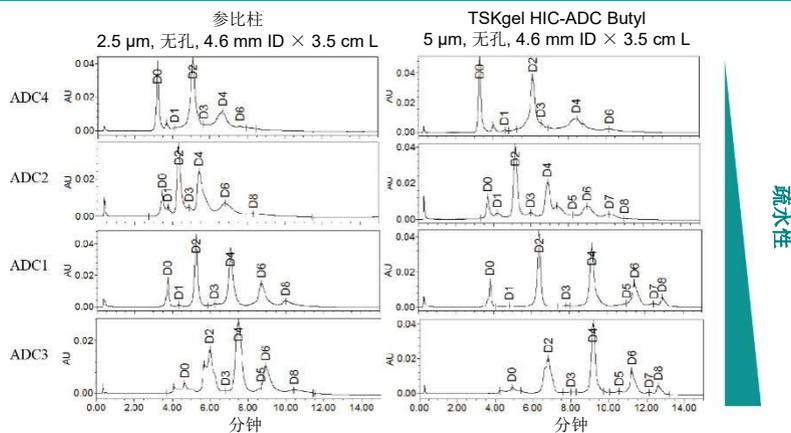
所有ADC在两种色谱柱上均实现了保留和洗脱。主要差异体现在晚洗脱组分 (DAR6、DAR7和DAR8) 的洗脱时间和峰形上。与参比柱相比, 这些组分在TSKgel HIC-ADC Butyl上的洗脱时间更晚, 且峰形更清晰 (例如图1中的ADC1、ADC2、ADC3)。

对不同ADC的比较揭示了保留时间上的差异, 这与其整体疏水性不同有关。洗脱时间与连接器+载荷复合物的AlogP值 (辛醇/水分配系数) 相关, 该值可指示其疏水性 (表1)。其中AlogP值最低的ADC4洗脱速度最快, 而ADC1和ADC3的洗脱时间最长。

表1 ADC样品概述

ADC	药物 (作用机制)	DAR	AlogP (连接器-载荷复合物的辛醇/水分配系数)
ADC 1: 维布妥昔单抗 (Brentuximab Vedotin)	奥瑞他汀衍生物 (微管破坏作用)	4	4.79
ADC 2		4	3.24
ADC 3		4	4.79
ADC 4	PBD (DNA断裂作用)	2	2.15
ADC 5	SN-38或DXd (拓扑异构酶抑制剂)	8	1.95
ADC 6		8	0.29

图1 采用HIC对一组ADC的分析（各峰已根据相应的DAR组分进行标注）



为了进一步对比，我们对ADC1分析了理论塔板数（TP）、DAR2峰的不对称性（As）以及分离度（DAR2与DAR4之间）等性能参数（见表2）。新型HIC-ADC色谱柱的性能优于参比柱，具体表现为TP值更高（表明分离性能更佳），且分离度更好。尽管其粒径更大，但通过均一的粒径分布、优化的颗粒化学特性及配体密度，仍实现了性能提升。在不对称因子方面，两款色谱柱表现相近：参比柱的As因子为1.1（略有拖尾），而HIC-ADC色谱柱的As因子为0.9（略有前延）。

表2 ADC1的分离性能参数

性能参数	参比柱			TSKgel HIC-ADC Butyl		
	平均	SD	SD(%)	平均	SD	SD(%)
理论塔板数 (DAR2)	4085	422	10.3	5963	187	3.1
不对称性 (DAR2)	1.1	0.04	3.9	0.9	0.01	0.9
分离度 (DAR4-DAR2)	4.3	0.07	1.6	7.0	0.11	1.6

高DAR拓扑异构酶偶联ADC平台的表征

与ADC 1-4不同，所测试ADC中的ADC5和ADC6具有均一的载荷分布（8个药物分子 / mAb），且由于其连接器-载荷结构的AlogP值较低，所以疏水性显著更低。为了便于比较，将未偶联单抗的色谱图与ADC的色谱图进行了叠加（图2）。ADC的色谱轨迹显示出一个主峰，该峰在未偶联单抗出峰后约0.5分钟（ADC5）或超过2分钟（ADC6）时洗脱（图2）。值得注意的是，对于ADC6，代表DAR6的肩峰在主峰之前洗脱，且在TSKgel HIC-ADC Butyl上的分离效果优于参比柱。因此，后续的DAR计算结果显示其DAR值为7.9（图2）。

TSKgel HIC-ADC Butyl在DAR测定中表现出低变异性

对TSKgel HIC-ADC Butyl评估的第二个方面是平均DAR值计算。为此，在3个不同日期重复进行了分析，期间更换了分析人员并重新制备了样品。表3展示了计算得到的DAR值及其变异性的比较结果。结果显示，对于大多数ADC样品而言，与参比柱相比，使用TSKgel HIC-ADC Butyl测定DAR的重现性更优。

图2 具有均一DAR8载荷分布的ADC分析（已标注DAR组分）

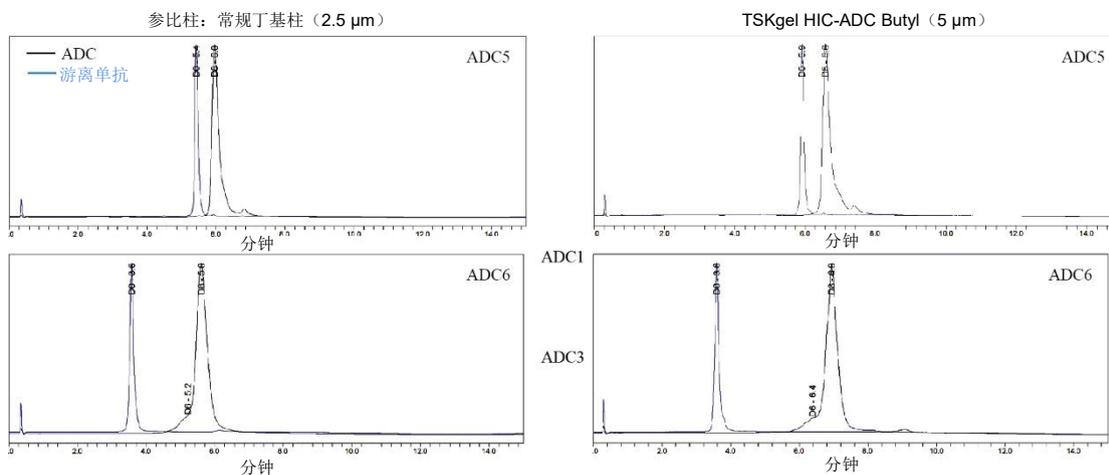


表3 DAR测定的稳定性

		ADC1	ADC2	ADC3	ADC4	ADC5	ADC6
参比柱	平均DAR	4.0	3.6	3.7	2.4	8	7.9
	(%SD)	(3.3 %)	(5.3 %)	(4.0 %)	(4.2 %)	(0 %)	(0.3 %)
TSKgel HIC-ADC Butyl	平均DAR	3.8	3.6	3.7	2.5	8	7.9
	(%SD)	(1.6 %)	(3.3 %)	(0.5 %)	(2.4 %)	(0 %)	(3.8 %)

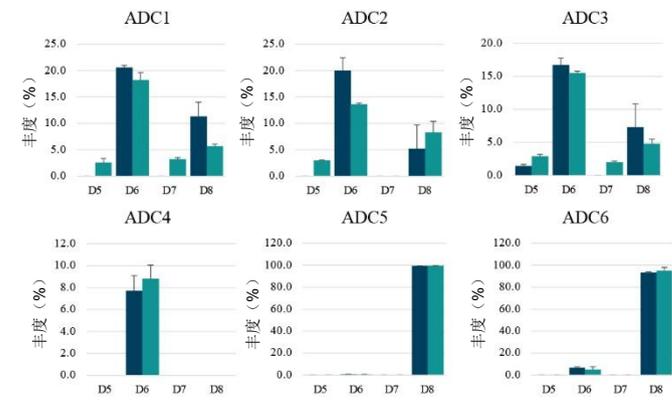
在分离具有电荷分布异质性的ADC中高DAR值组分上的优异表现

为了考察两种色谱柱在平均DAR计算上的稳健性，我们对每种DAR组分进行了定量研究。主要有两项发现：其一，中等DAR组分在TSKgel HIC-ADC Butyl上的分离效果更佳，因此可实现定量分析，而在参比柱上未被识别（例如ADC1和ADC2中的DAR5，ADC1和ADC3中的DAR7）。

其二，高DAR值组分（例如DAR6和DAR8）在参比柱上分析时，与TSKgel HIC-ADC Butyl相比，其面积百分比测定结果的变异性更大。需注意的是，高DAR值组分的面积对整体DAR计算的影响更大，因此对高DAR值组分面积进行更可靠的定量，可显著提高平均DAR计算的准确性与稳健性。

图3 高DAR组分定量分析的稳健性

对所有高DAR值组分（DAR5-8）的相对峰面积进行定量分析。实验在不同日期由不同实验人员重复进行三次。蓝色条表示参比柱，绿色条表示TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱。误差线表示标准偏差。

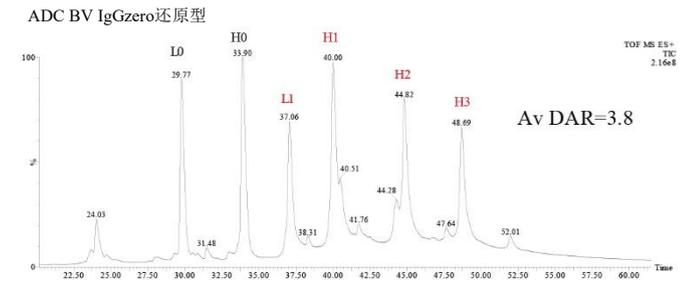


DAR测定与LC-MS的比较

为了验证HIC分离后的DAR计算结果，我们还在变性条件下使用RP-LC-MS对ADC1进行了分析。ADC样品经还原后解离为轻链和重链。通过ESI-TOF质谱（Waters Synapt G2Si仪器）实施的质量测定显示，存在未偶联轻链（L0）和偶联单个药物的轻链（L1）。重链则或者未偶联（H0），或者携带最多3个药物（H1-3）。质谱定量分析得到的平均DAR值为3.8（图4），这与使用TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱进行HIC分析算出的DAR结果一致（表3）。

图4 通过LC-MS测定ADC1的DAR

DAR测定通过还原型ADC样品的质谱分析实现：基于质量测定（解卷积）验证轻链和重链的偶联状态，并通过总离子流色谱图（TIC）中的峰面积进行定量。



结论

本应用笔记对采用创新颗粒技术的新型HIC色谱柱与传统化学结构的参比柱进行了性能对比。通过对一组具有不同电荷和平均DAR值的ADC样品进行评估，其结果表明新型TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱适用于广泛的分子类型。值得注意的是，其优异的分离性能带来了更高的稳健性（尤其是在高DAR (>5)组分的定量分析方面），并且能够检测到参比柱无法分离的DAR组分（如DAR5、DAR7），从而实现了准确的平均DAR计算。

将TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱通过非变性HIC法测得的平均DAR值，与RP-MS法的测定结果进行对比，两者完全一致。这表明HIC是一种操作简便且更适合质量控制的平均DAR测定方法。TSKgel HIC-ADC Butyl色谱柱有效解决了传统HIC色谱柱的局限性（尤其是在高DAR值变体难以获得良好峰形方面）为ADC表征提供了可靠且稳健的分析工具。

产品信息

货号	产品描述
0023538	TSKgel HIC-ADC-Butyl (5 μm, 4.6 mm ID × 3.5 cm L)

Tosoh Bioscience和TSKgel是Tosoh Corporation的注册商标。