

疏水作用色谱法 (HIC) 在抗体药物偶联物 (ADC) 药物抗体比值 (DAR) 和药物分布测定中的应用

LC-248

摘要： 本文使用岛津生物兼容液相系统 (Nexera Bio) 建立了一种疏水作用色谱 (HIC) 方法用于抗体药物偶联物 (ADC) 中药物抗体比值 (DAR) 和药物分布的测定。Nexera Bio 系统通过对关键部位的惰性化升级，在耐受高压的前提下，升级的惰性表面降低了生物大分子在不锈钢管路中的吸附，并且可耐受高盐洗脱体系，更适合于生物大分子样品的分析。

关键词： 抗体药物偶联物 DAR 疏水作用色谱 HIC Nexera Bio

药物抗体比值 (DAR) 是抗体药物偶联物 (ADC) 的一个关键属性，是药物研发过程重要的质控环节。ADC 药物已经发展至第三代，特异性偶联技术能够产生稳定的药物抗体比，对于 ADC 的药效和安全性都有很大的贡献。

疏水作用色谱是可以检测抗体药物偶联物 DAR 值的一种技术，与紫外 / 可见吸收光谱法相比，疏水作用色谱法能将不同 DAR 值的组分分离开，从而能直接测定不同 DAR 值组分的比例，而这在稳定性试验中是非常有用的，因为游离小分子药物与偶联到抗体上的

小分子药物会有相似的吸收，在紫外 / 可见光谱检测中，游离小分子药物的释放不一定导致 DAR 测量结果的降低，而色谱法能够确定游离药物的释放情况。

Nexera Bio 生物兼容液相可耐受高盐环境，通过梯度洗脱，降低盐浓度，增加有机相比比例，可将偶联不同药物数量的 ADC 分离。本文使用岛津生物兼容液相系统 (Nexera Bio) 建立了一种疏水作用色谱 (HIC) 方法用于抗体药物偶联物 (ADC) 中药物抗体比值 (DAR) 和药物分布的测定。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 Nexera Bio 高效液相色谱仪，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20A

输液泵：LC-20AD XR

检测器：SPD-M20A

自动进样器：SIL-20AC XR

脱气机：DGU-20A 3R

色谱工作站：Labsolutions Ver. 5.99 SP2

1.2 分析条件

色谱柱：SHIMSEN Ankylo HIC Butyl (100 × 4.6 mm I.D., 5.0 μm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, PN: 380-01215-20)

洗脱液：A: 100 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) + 2.0 M 硫酸铵

B: 100 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) / 异丙醇 = 75/25

梯度洗脱：0~15.0 min (0 → 100% B), 15.1~20.0 min (100% A)

流速：1.0 mL/min

进样体积：5 μL

洗脱时间：20 min

检测波长：280 nm

1.3 供试品的制备

供试品溶液：取某 ADC 药物用超纯水溶解并稀释至 10 mg/mL，直接进样。

■ 结果与讨论

2.1 药物分布及 DAR 值测定结果

疏水作用色谱一般用来测定半胱氨酸连接的 ADC 药物，ADC 药物研发使用的单抗有 4 对链间二硫键，抗体通过部分还原使链间二硫键转换成游离的半胱氨酸残基，半胱氨酸残基中的巯基与连接子中的马来酰亚胺基反应形成 ADC，一般连接的小分子数量为 0、2、4、6 和 8，如图 1 所示。因为疏水作用色谱条件为非变性且相对温和，不会引起抗体的轻链与重链的分离，保持完整的状态。通过疏水性的增加可分离连接不同数量药物的抗体，未偶联药物的抗体疏水性最弱，最先被洗脱；连接 8 个药物的抗体疏水性最强，最后被洗脱。

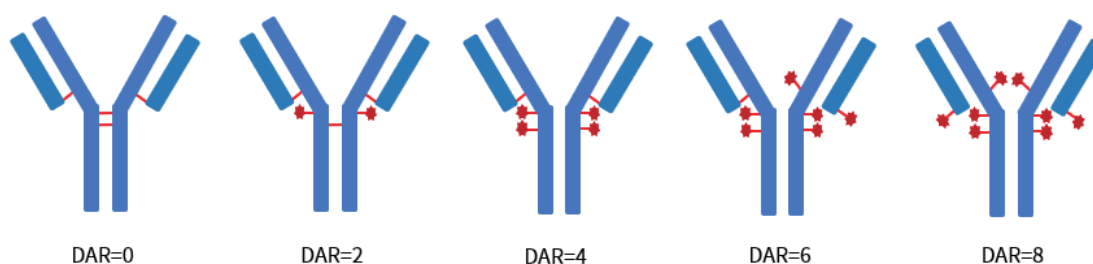


图 1 不同药物负荷 ADC

图 2 是实际样品的图谱，结合相关文献资料可从图中看到不同 DAR 值 ADC 的色谱峰的分布情况，峰面积百分比代表特定药物数量连接的 ADC 的相对分布。通过峰面积百分比和偶联药物个数计算加权平均 DAR。结果见表 1，ADC 药物的平均 DAR 为 4.082。

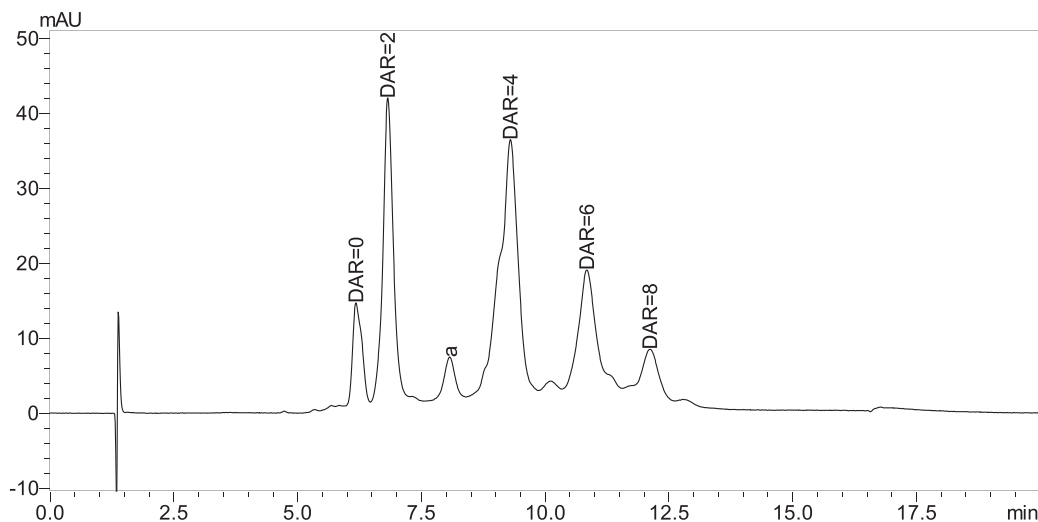


图 2 ADC 药物疏水作用色谱图

表 1 药物负荷分布和 DAR 计算

峰名称	药物负荷	峰面积百分比 /%	加权峰面积 (药物负荷 * 峰面积) /%
DAR=0	0	6.952	0
DAR=2	2	21.614	43.228
a	3	5.618	16.854
DAR=4	4	33.174	132.696
DAR=6	6	22.845	137.070
DAR=8	8	9.797	78.376
平均 DAR	4.082		244,560

注：平均 DAR= Σ (加权峰面积) /100；
谱图中较小的 a 峰是偶联 3 个药物的组分。

2.2 重复性

取供试品溶液连续进样 6 针进行重复性测试，色谱图如图 3 所示，统计结果见表 2，保留时间的 RSD 在 0.04-0.07% 之间，峰面积的 RSD 在 0.37-0.74% 之间，说明液相系统的稳定性良好。

表 2 6 次进样数据重复性结果

峰名称	保留时间 RSD/%	峰面积 RSD/%
DAR=0	0.07	0.46
DAR=2	0.06	0.37
DAR=4	0.05	0.48
DAR=6	0.04	0.74
DAR=8	0.04	0.56

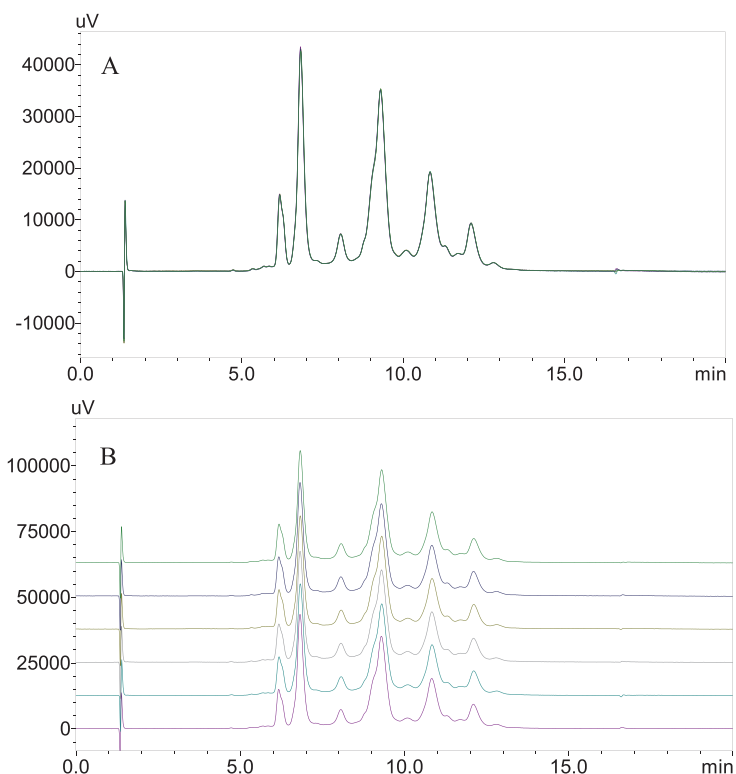


图 3 6 次进样重叠谱图 (A) 和基线移位谱图 (B)

2.3 不同批次样品结果

取两个不同批次的样品上机检测，可以看到不同批次样品之间的 DAR 值分布具有相似性，但也存在差异，使用这种方法可以比较不同样品的结果，对生产工艺进行批间一致性的评价，对产品进行质量控制研究。

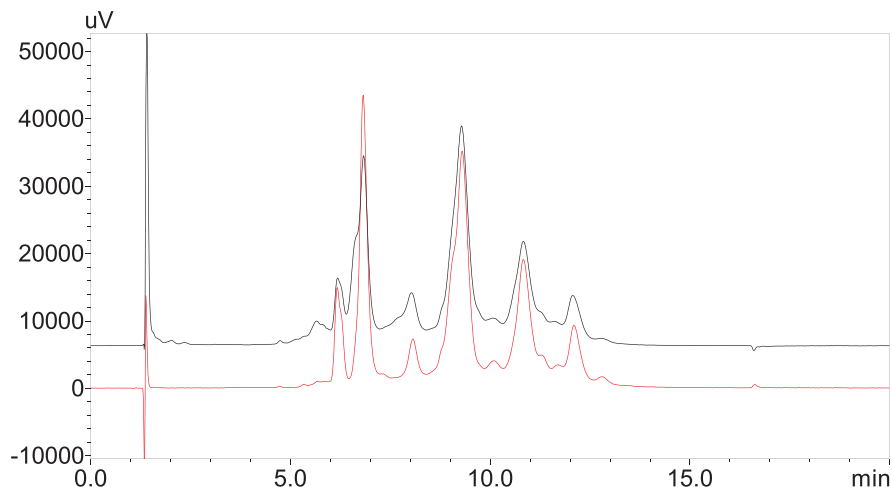


图 4 两批样品 DAR 值分布谱图比对（红色：批次 1；黑色：批次 2）

表 3 两批样品 DAR 结果

批号	批次 1	批次 2
平均 DAR	4.082	3.876

■ 结论

本文使用岛津生物兼容液相系统（Nexera Bio）建立了一种疏水作用色谱方法用于抗体药物偶联物药物分布和药物抗体比测定。此系统可耐受高浓度盐，更适合于生物大分子样品的分析，结合 SHIMSEN Ankylo HIC Butyl 色谱柱，方法简便稳定，重复性好，可广泛应用于利用半胱氨酸偶联的 ADC 药物的分析，在药物分布、DAR 值测定等环节发挥重要作用，还可应用于批间一致性评价，评估偶联工艺的稳定性。

岛津应用云

