



## ■ 使用体积排除色谱法 (SEC) 分析 mAb、ADC 杂质

mAb 和 ADC 杂质 (如聚集体和降解物) 是影响药物疗效、不良反应、药物稳定性的重要因素<sup>3)</sup>。通常使用 SEC 对此进行评价。此次聚集体分析, 是使用 mAb 标准品 (市售) 和含有相同 mAb 偶联小分子化合物的 ADC 标准品 (市售)。分析条件见表 2、3。在 mAb 分析中, 5 分钟内完成了多聚体、单体及降解产物的色谱分离, 如图 2 所示。在 ADC 的聚集体评价中, 固定相与 ADC 之间疏水性相互作用, 常会导致色谱峰展宽, 从而无法准确进行聚集体评价 (图 3A)。因此, 为了抑制样品与固定相之间的疏水性作用, 流动相中添加了 15% 的异丙醇<sup>4)</sup>。结果表明, 分离效果良好 (图 3B)。

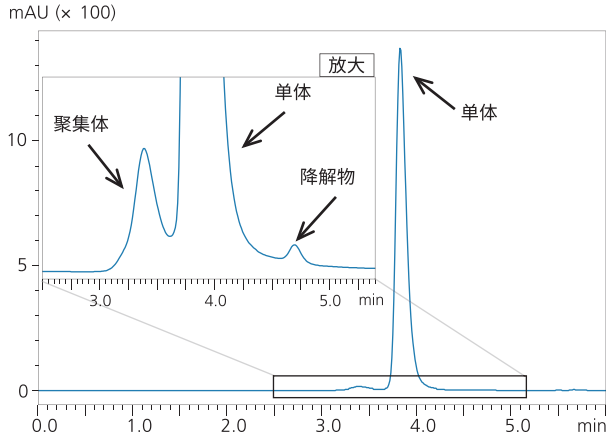


图 2 mAb 聚集体分析的色谱图

表 2 mAb 杂质分析条件 (图 2)

|      |   |
|------|---|
| 系统   | Nexera XS inert   |
| 色谱柱  | TSKgel UP-SW3000 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)                               |
| 保护柱  | : TSKgel 保护柱 UP-SW DC   |
| 等度洗脱 |   |
| 流动相  | : 含 100 mmol/L Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) |
| 流速   | : 0.4 mL/min  |
| 柱温   | : 25 °C   |
| 样品瓶  | : TORAST™-H 玻璃瓶 <sup>5)</sup>   |
| 进样量  | : 5 μL  |
| 样品   | : NIST mAb (10 mg/mL)   |
| 检测   | : 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)   |

\*5: 370-04301-01

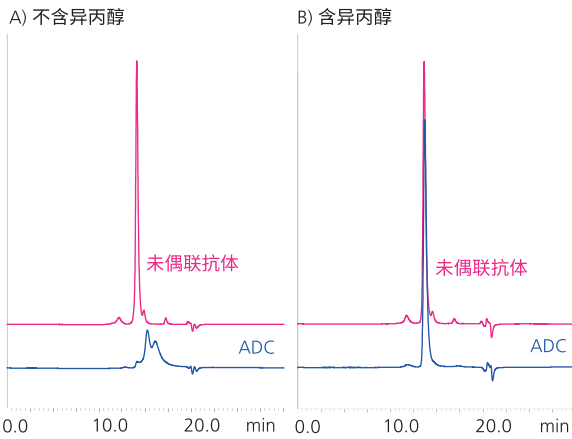


图 3 mAb 及 ADC 色谱图

表 3 mAb 及 ADC 分析条件 (图 3)

|       |   |
|-------|---|
| 系统    | : Nexera XS inert   |
| 色谱柱   | : TSKgel UP-SW3000 (300 mm×4.6 mm I.D., 2 μm)             |
| 保护柱   | : TSKgel 保护柱 UP-SW DC                                     |
| 等度洗脱  |   |
| 流动相 A | : 含 250 mmol/L KCl 的 200 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.0)              |
| 流动相 B | : 含 250 mmol/L KCl 的 200 mmol/L 磷酸钾 (pH 7.0) / 异丙醇= 85:15 |
| 流速    | : 0.2 mL/min  |
| 柱温    | : 25 °C   |
| 样品瓶   | : TORAST-H 玻璃瓶 <sup>5)</sup>                              |
| 进样量   | : 5 μL  |
| 样品    | : 未偶联抗体 (0.5 mg/mL), ADC (5 mg/mL)                        |
| 检测    | : 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)                           |

\*5: 370-04301-01

## ■ 使用离子交换色谱法 (IEX) 分析电荷异构体 (电荷变异体)

由于 mAb 结构复杂并具有不均匀性, 因此该类药物中会存在电荷异构体与电荷变异体<sup>3)</sup>。电荷差异会对单抗药物稳定性和有效性产生影响, 因此必须对电荷变异体进行准确评价。根据电荷强度的不同, IEX 可分离 mAb 电荷变异体。按照表 4 所示条件, 此次实验对 3 种 mAb 进行电荷变异体评估。在每个样品中, 均成功检测到多种电荷变异的多个色谱峰 (图 4)。

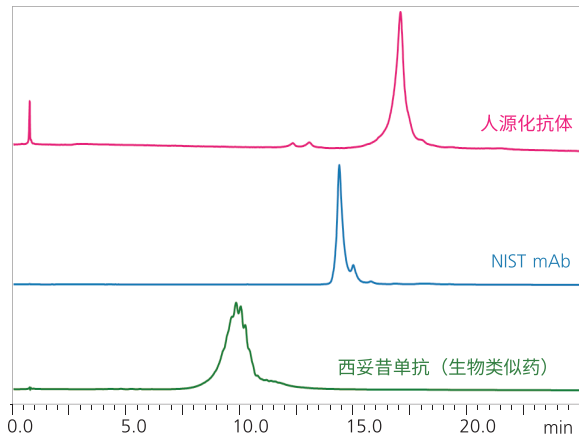


图 4 3 种 mAb 的色谱图

表 4 mAb 的电荷变异体分析条件 (图 4)

|       |  |
|-------|--|
| 系统    | : Nexera XS inert  |
| 色谱柱   | : TSKgel CM-STAT (100 mm×4.6 mm I.D., 7 μm)                |
| 梯度模式  | : 0 – 55% B (0– 30 min)                                    |
| 流动相 A | : 20 mmol/L 2-吗啉乙磺酸 (pH 6.0)                               |
| 流动相 B | : 含 500 mmol/L NaCl 的流动相 A                                 |
| 流速    | : 0.8 mL/min   |
| 柱温    | : 25 °C  |
| 样品瓶   | : TORAST-H 玻璃瓶 <sup>5)</sup>                               |
| 进样量   | : 5 μL   |
| 样品    | : 人源化抗体 (1 mg/mL)、NIST mAb (5 mg/mL)、西妥昔单抗 (生物仿制药 5 mg/mL) |
| 检测    | : 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)                            |

\*5: 370-04301-01

## ■ 利用疏水色谱法 (HIC) 分析 ADC 的药物抗体偶联比

ADC 中偶联小分子的异质性会影响 ADC 药物疗效。本文将介绍使用 HIC 进行单抗异构体和 ADC 异质性的分析方法。

在未经过前处理的情况下，对一种市售 ADC 模拟物进行分析，并按照表 5 所示的条件，评价药物抗体偶联比 (DAR)。最终成功分离小分子药物结合数为 0~6 的不同 ADC (图 5)。

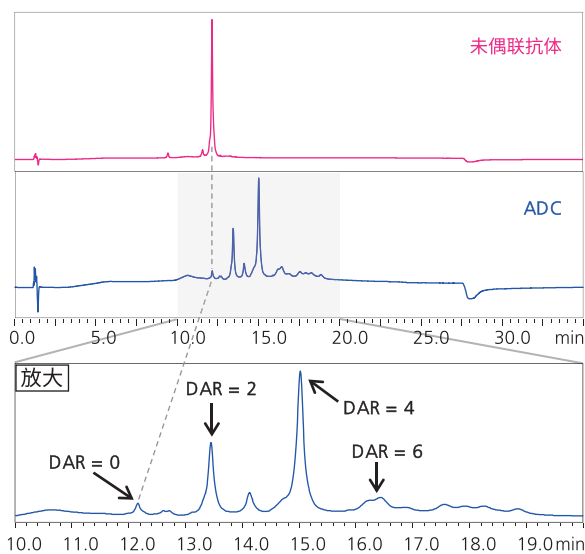


图 5 DAR 分析结果

表 5 DAR 分析条件 (图 5)

|       |  |
|-------|--|
| 系统    | : Nexera XS inert                                    |
| 色谱柱   | : TSKgel Butyl-NPR<br>(100 mm × 4.6 mm I.D., 2.5 μm) |
| 梯度模式  | : 0 – 100% B (0–20 min)                              |
| 流动相 A | : 含 1.5 mol/L 硫酸钠的 25 mmol/L 磷酸钠<br>缓冲液 (pH 7.0)     |
| 流动相 B | : 25 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) /<br>异丙醇= 80:20          |
| 流速    | : 0.5 mL/min   |
| 柱温    | : 35 °C  |
| 样品瓶   | : TORAST-H 玻璃瓶 <sup>5</sup>                          |
| 进样量   | : 10 μL  |
| 样品    | : 未偶联 mAb (0.5 mg/mL), ADC (5 mg/mL)                 |
| 检测    | : 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)                      |

\*5: 370-04301-01

## ■ 结论

本文介绍了有关抗体药物、抗体偶联药物质量控制的各种分析案例和分析条件优化技术。体积排除色谱法，可迅速且良好地分离 mAb。对 ADC 的分析，SEC 通过抑制 ADC 与固定相间的疏水性相互作用，同样分离情况良好。离子交换色谱法，利用电荷强度差异，完成了酸性和碱性电荷变异体的分离。疏水色谱法，基于小分子化合物结合数的不同，实现半胱氨酸连接 ADC 的分离。

在抗体药物分析或任何使用含高浓度腐蚀性盐的流动相的分析中，Nexera XS 耐腐蚀性能表现优异，提供了高度稳定的实验数据。

### < 参考文献 >

- 1) ICH Q6B, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, 国际人用药品注册技术协调会, www.ich.org
- 2) 厚生劳动省医药食品安全局审查管理课, Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products (2001 年 5 月 1 日医药审发第 571 号)
- 3) 生物制药手册, 第 4 版。生物制剂生产和质量控制 (株式会社时报)
- 4) 荒川力, 江岛大辅, 津本浩平, Pete Gagnon: 色谱溶剂优化, 日本生化学第 80 卷第 1 期, pp.45 -51, (2008).

Nexera、TORAST 为岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

TSKgel、TSKgel STAT、TSKgel NPR 为东曹株式会社的注册商标。

岛津应用云



岛津企业管理 (中国) 有限公司  
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2022 年 3 月