

使用尺寸排阻色谱法分析蛋白类药物的聚集体

藤村 大树、安藤 惠美子、铃木 里沙

特点描述

- ◆ 通过抑制色谱柱填料与样品间的静电作用和疏水性作用，提高单克隆抗体和抗体偶联药物与其聚集体和片段的分离。
- ◆ 即使用高浓度盐流动相进行分析，也可获得高重现性的数据。

简介

蛋白质因生产和储存过程中的温度、pH、浓度等的变化，易发生聚集。单克隆抗体（mAb）和抗体偶联药物（ADC）等蛋白质类药物的聚集，会影响药物的安全性和有效性¹⁾。因此要监测生产和储存过程中所产生的聚集体。常用的监测方法是使用尺寸排阻色谱法（SEC），按照组分分子体积由大到小的顺序洗脱的分离模式。但众所周知，mAb与填料之间的静电作用，ADC与色谱柱填料之间的疏水性作用会产生吸附，难以将单体与聚集体和片段进行分离^{2), 3)}。为确保数据采集的可靠性，需要考虑这些次要的相互作用。

本文介绍了使用岛津尺寸排阻色谱柱“Shim-pack™ Bio Diol”，分析mAb和ADC聚集体的案例。使用“Nexera XS inert”系统，该系统对高浓度盐的流动相具有耐腐蚀性，可抑制管道内样品的吸附。

试剂及分析条件

称量市售的1 mg mAb、0.5 mg ADC，分别加入1 mL、0.5 mL超纯水，配制为1 mg/mL溶液供分析。mAb和ADC的分析条件分别如表1和表2所示。通过向流动相中添加盐，可抑制导致mAb分析中发生吸附的静电作用³⁾。比较了在100 mmol/L磷酸缓冲液流动相中添加150 mmol/L氯化钠和未添加氯化钠的分析结果。此外，为抑制疏水性作用，通常采用乙醇和乙腈等有机溶剂作为流动相^{2), 3)}。另一方面，SEC色谱柱一般耐压较低，因此本文采用粘度较低的乙腈作为流动相，通过改变100 mmol/L磷酸缓冲液流动相的添加量，研究了ADC的分离条件。

mAb的聚集体分析

图1所示为使用未添加及添加150 mmol/L氯化钠的流动相时的色谱图。同时还包括单体色谱峰附近（5.5~8.7分钟）洗脱的聚集体（图1中-1）、片段（图1中-3）的色谱峰图。流动相中未添加氯化钠时，单体的色谱峰（图1中-2）出现拖尾，而流动相中添加150 mmol/L氯化钠时，拖尾得到抑制。与此同时，聚集体和片段的色谱峰分离也得到改善。由此可知，添加氯化钠后，色谱柱填料与mAb间的静电作用得到抑制，提高了分离效果。

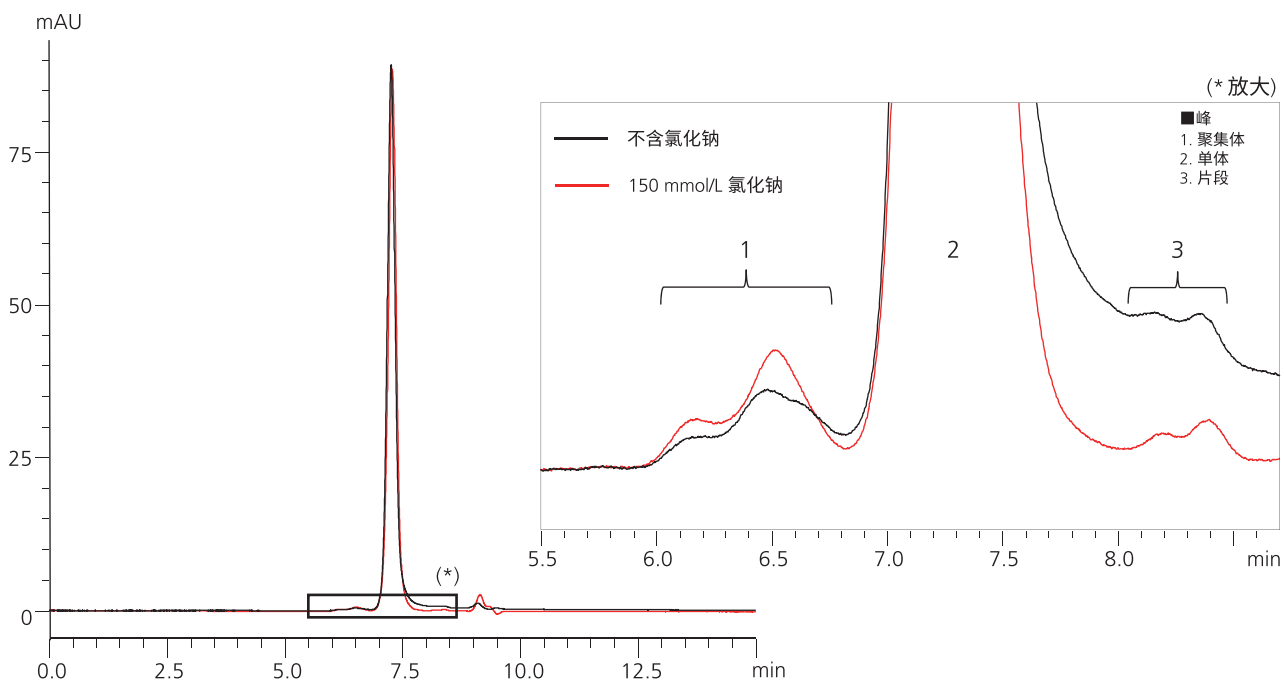


图1 流动相中添加/未添加氯化钠时 mAb 的色谱图比较

ADC 的聚集体分析

进行 ADC 聚集体分析时，考察了流动相中乙腈浓度的影响。如图 2 放大图所示，未添加乙腈时，单体的色谱峰出现展宽且拖尾。而添加乙腈时，随着加标浓度的升高，色谱峰形状得到改善。由此可知，添加乙腈对 ADC 与色谱柱填料间的疏水性作用具有抑制效果。ADC 与填料间疏水性作用的程度因与抗体结合的低分子药物疏水性程度和结合数而有所不同，因此需要根据 ADC 的种类，研究最佳的有机溶剂浓度。但是，需要注意的是添加过多的有机溶剂可能引起样品变性。

结论

本文介绍了使用 Nexera XS inert 系统，采用 Shim-pack Bio Diol 色谱柱分析单克隆抗体 (mAb) 及抗体偶联药物 (ADC) 聚集体的案例。进行这些分析时，由于盐浓度和有机溶剂的浓度对分离有较大影响，因此需要研究合适的流动相种类和浓度，避免样品和填料之间产生次要的相互作用。

虽然包含高浓度盐的流动相、以及在缓冲液中加入有机溶剂的流动相具有提高分离的效果，但是对于普通的 HPLC 系统来说，条件过于苛刻。此次使用具有优异的耐腐蚀性的 Nexera XS inert 系统，以最佳流动相条件完美地完成了分析，改善了单体与聚集体和片段的分离。

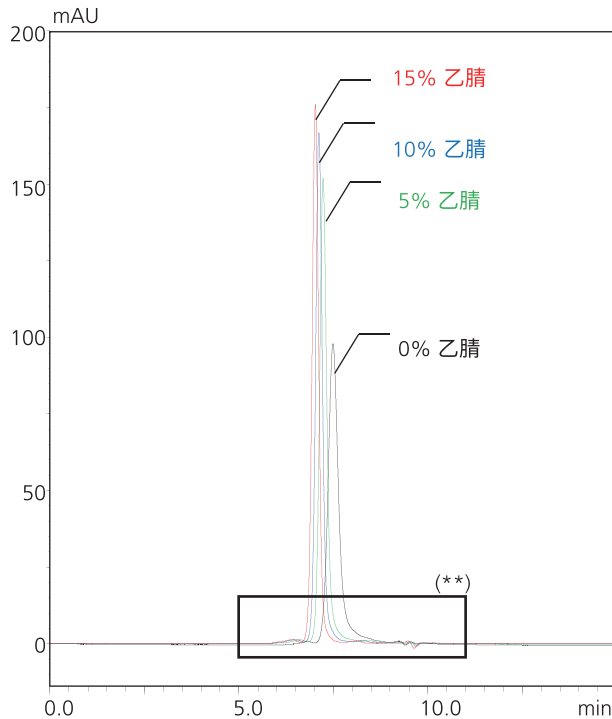


图 2 流动相中乙腈浓度对分离的影响

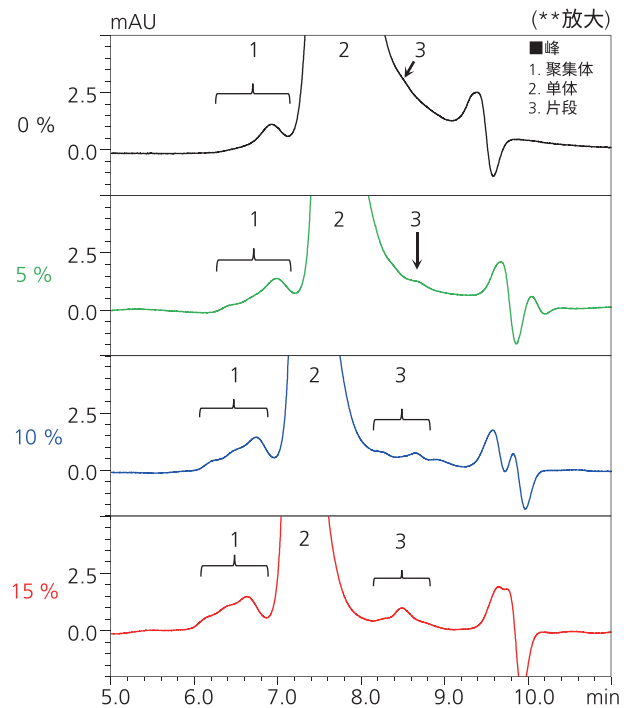
表 1 mAb 的分析条件

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: Shim-pack Bio Diol-300 ¹ (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
流动相	: 含或不含 150mmol/L 氯化钠的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.9)
流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 25 °C
样品瓶	: TORAST™-H 玻璃瓶 (SGLC) ²
进样体积	: 5 μL (1 mg/mL mAb)
检测器	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)

*1: P/N 227-31010-01、*2: P/N 370-04301-01

表 2 ADC 的分析条件

系统	: Nexera XS inert
色谱柱	: Shim-pack Bio Diol-300 (150 mm × 4.6 mm I.D., 2 μm)
流动相	: 0, 5, 10, 15% 乙腈的 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.9)
流速	: 0.2 mL/min
柱温	: 25 °C
样品瓶	: TORAST-H 玻璃瓶 (SGLC)
进样体积	: 5 μL (1 mg/mL ADC)
检测器	: 280 nm (SPD-M40, UHPLC 惰性流通池)



参考文献

- 1) Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. AAPS J., 8, E501-E507 (2006).
- 2) Striegel, A. M.; Yau, W. W.; Kirkland, J. J.; Bly, D. D. Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, (2009).
- 3) 荒川力, 江岛大辅, 津本浩平, Pete Gagnon 利用溶剂抑制色谱法, 生化学第 80 卷第 1 期, pp.45 -51, (2008).

Nexera、Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。

TORAST 是 SGLC 株式会社的商标。

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