

ADC药物(DS-8201)中游离小分子测定-液相色谱法

陆珺

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

ADC是将单克隆抗体药物 (Monoclonal antibodies, mAbs) 的高特异性和小分子化学药物的强细胞毒性相结合的药物, 用以提高肿瘤药物的靶向性、减少毒副作用。一般而言, ADC药物由抗体 (Antibody或mAb)、连接子 (Linker)、细胞毒性药物 (Cytotoxin, 或称有效荷载 (Payload)) 三个部分组成: 通过mAb将药物输送至目标肿瘤细胞, 使ADC获得高度的靶向性; Linker负责连接抗体和细胞毒性有效荷载; Payload负责杀伤肿瘤细胞。

Trastuzumab deruxtecan (DS-8201; ENHERTU®) 是由第一三共和阿斯利康合作开发的新型HER2靶向ADC。Deruxtecan是毒性药物DX-8951 的衍生物 (Dxd) 和连接子马来酰亚胺-GGFG 肽的偶联物。在ADC偶联工艺中, 多余的Deruxtecan会被除去。但是可能仍有微量的残留。此外, 在药物的存储过程中, Deruxtecan也可能从ADC上脱落。而游离小分子毒素无靶向性, 且毒性高, 会影响ADC药物的安全性。因此, 监测ADC药物中的游离小分子毒素的含量非常重要。

目前反相色谱法测定游离小分子的常规方法是在ADC药物中加入有机溶剂对蛋白进行沉淀, 取上清液进行分析, 通过外标法进行小分子定量分析。这种方法的缺点在于: 游离小分子浓度很低, 进一步稀释样品影响检出灵敏度。而本文选取了一款大孔径核壳型填料的低吸附反相C4柱, 样品不沉淀直接进样, 游离小分子和ADC药物可以实现良好的分离。并且大孔径核壳型C4色谱柱对于蛋白的吸附低, 蛋白不易残留。

关键词

ADC; 游离小分子毒素; RP-HPLC; 核壳柱; Biozen Widedpore C4

化合物信息

表1. 化合物信息

中文名称	CAS号	分子式	分子量
Deruxtecan	1599440-13-7	C ₅₂ H ₅₆ F ₈ N ₉ O ₁₃	1034.05
Trastuzumab-deruxtecan	1826843-81-5	N/A	N/A

实验部分

3.1仪器、试剂与材料

3.1.1主要仪器设备

Thermo U3000高效液相色谱仪

3.1.2试剂材料

实验用水、乙腈、异丙醇、三氟乙酸均为色谱级。

3.1.3样品

Trastuzumab-deruxtecan样品为客户提供, 平均DAR值约为4。浓度为1.0 mg/mL;

Trastuzumab-deruxtecan标准品购自第一三共。用纯水稀释为1mg/mL。

Deruxtecan浓度为10.34mg/mL, 用50%乙腈逐级稀释。

3.2色谱条件

色谱柱: Biozen Widedpore C4 (4.6×50mm, 2.6μm, 400Å); P/N:00B-4786-E0

流动相A相: 0.1%三氟乙酸水;

流动相B相: 0.1%三氟乙酸乙腈: 异丙醇 (1:1);

流速: 0.8 mL/min;

柱温: 50 °C;

波长: 215nm;

进样量：2 μ L；
梯度程序见表2：

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.8	90	10
10.0	0.8	50	50
15.0	0.8	10	90
15.1	0.8	90	10
20.0	0.8	90	10

3.3结果与讨论

3.3.1 色谱柱的选择

本文考察了核壳型反相 C4 和 C8 柱，发现 Deruxtecan 和 ADC 的分离度在 C4 柱上更好，且 Deruxtecan 的峰形对称性也更好。而 ADC 在短柱上的响应比长柱更高。所以最终选择了 Biozen Widepore C4 的 50mm 短柱。

3.3.2 Deruxtecan 的峰形

取 1.0mg/mL 的 Deruxtecan 稀释液 0.2 μ L 上样，上样量约为 200ng，可以看到 Deruxtecan 的峰型是非常尖锐的，主峰不对称度为 0.94，塔板数 59817。主峰前可以观察到两个小峰，推测分别为 linker 和 payload。

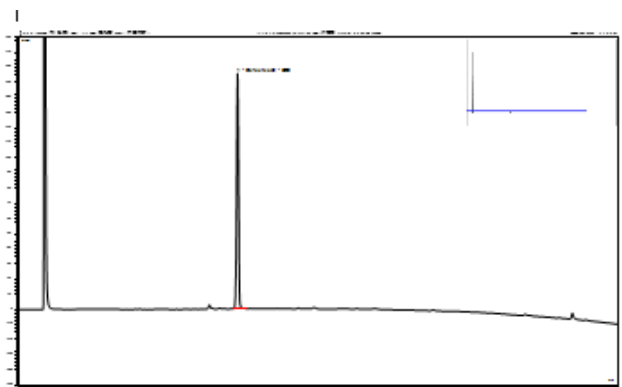


图1. Deruxtecan 在 Biozen Widepore C4 色谱柱上的峰形

3.3.3 色谱条件的选择

梯度有机相比例从 10% 起始，以 4%/min 升至 50% 后再快速升至 90%，然后回到 10% 平衡，总时长 20min。以高比例水相起始和平衡主要考虑 ADC 样品中可能含有水溶性的辅料和盐；有机相上升至 90% 主要考虑偶联过程中，可能引入的疏水性杂质的残留。

一般反相色谱柱分析抗体类蛋白时所使用的柱温在 70 $^{\circ}$ C 或更高，但考虑到 Deruxtecan 的稳定性，本

文柱温设置为 50 $^{\circ}$ C。发现这种核壳型的 C4 色谱柱上，ADC 不需要高柱温就可以出峰。

该 ADC 样品为工艺研究的样品，其中可以检测出其中含有游离的 Deruxtecan，按照外标法可以计算得到游离小分子的含量约为 0.38%。

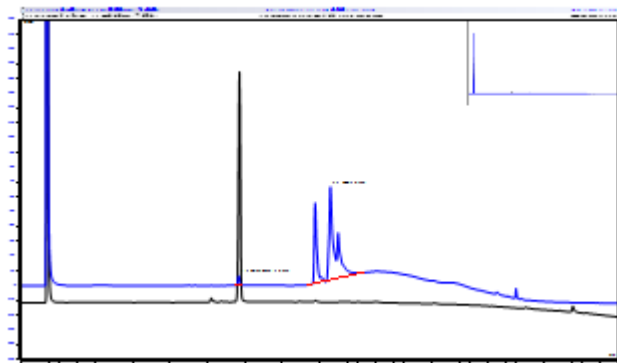


图2. Deruxtecan 和 ADC (DAR4) 的色谱图叠加

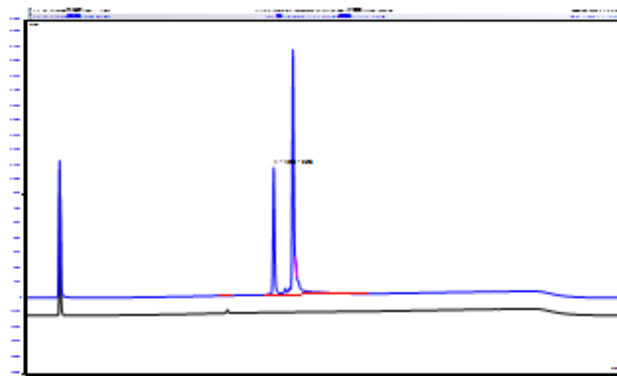


图3. Deruxtecan 和 ADC (DAR8) 的色谱图叠加

3.3.4 不同上样量 Deruxtecan 的面积对比

分别取 Deruxtecan 稀释液按照上样量 200ng, 10ng, 1ng 进样分析，得到的峰面积分别为 9.3417、0.4580、0.0543。当时上样量为 1ng 时 Deruxtecan 的 S/N 为 11.0，达到 S/N > 10，可以近似认为该点为 LOQ。

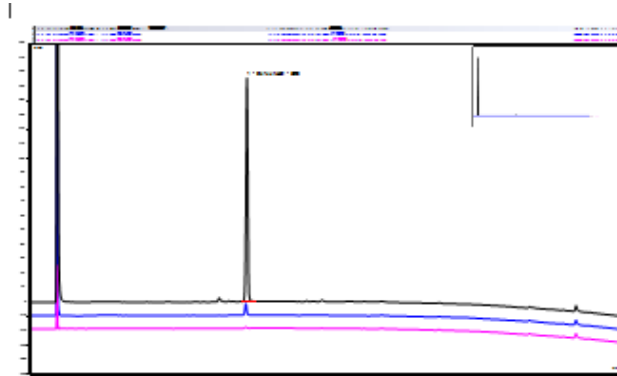


图4 Deruxtecan 不同上样量叠图

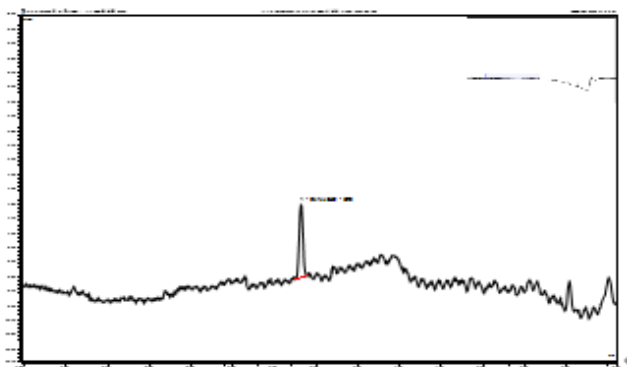


图5 Deruxtecan 1ng上样局部放大图

3.3.5 Deruxtecan的进样残留

在进样1mg/mL的Deruxtecan溶液0.2uL后，紧接着进样0.2uL纯水做为空白对照，来测试进样残留的情况。空白样品中测得Deruxtecan的峰面积约为前一针峰面积的0.3%。

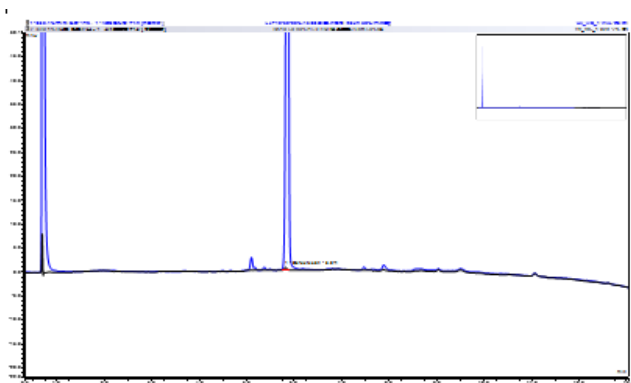


图5 Deruxtecan 200ng上样和空白图对比

结论

在本应用使用了 Biozen Widepore C4 400Å 2.6μm, 4.6×50mm的色谱柱，对于这种2.6um核壳型的填料，可以同时兼容HPLC和UPLC的平台。当代表色谱柱分离性能的L/dP保持一致的前提下，只需要重新选择不同仪器平台适合的内径及设置配套的流速，使得色谱柱获得一致的线速度的情况下，不同的仪器平台上可以使用相同的流动相梯度条件，不需要二次开发，可以节约方法开发人员的时间。

该方法不需要对ADC样品进行蛋白沉淀或者提取，可以直接进样，方法有效简便。

在该应用中，能够有效的分离ADC药物中的游离小分子和主成分。并且因为大孔径核壳型填料和C4固定相带来的低吸附的性能和尖锐的峰型，可以使得检测的灵敏度较高，可以满足实际分析中的应用要求。



Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息,
请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

Confidential - Company Proprietary

