

ADC药物(DS-8201)的聚集体测定

陆璐

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

由于ADC的药物偶联的小分子具有一定的疏水性, 在生产过程或者储存过程中形成聚集体的倾向有所增加。因此, 在放行检测测试和稳定性检测中, 都需要精确和有效的方法来测量聚合和碎片。

体积排阻色谱法 (SEC) 是用于表征蛋白聚集体的标准方法, 一般使用磷酸盐缓冲液作为洗脱溶剂。但使用水性流动相对 ADC 药物 进行 SEC 分析时, 往往得到的峰形不佳, 且聚集体和单体之间的分离度不佳。这可能是疏水性的小分子毒物和固定相之间的非特异性相互作用引起的。为解决这个问题, 我们会往 SEC 流动相中添加少量有机改性剂。但有机改性剂也增加破坏聚集体或者造成色谱柱寿命缩短的风险。因此采用具有高亲水性键合相和高惰性的柱硬件的SEC柱就显得尤为重要, 因为高惰性的表面会大大减小ADC分子和色谱柱填料和柱硬件之间的次级相互作用, 从而确保色谱峰获得良好分离且峰形尖锐, 且尽可能减少或者避免添加任何有机改性剂。

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。

本应用使用Biozen 的200A孔径的dSEC-2 色谱柱对 DS-8201 进行聚集体分析。分别考察了两种规格 (3um, 7.8mm*300mm 和1.8um, 4.6mm*150mm) 的分离结果。

关键词

聚集体; DS-8201; SEC; Biozen dSEC-2; BioTi

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	C52H56F N9O13	1034.05
Trastuzumab	180288-69-1	N/A	N/A
Trastuzumab- deruxtecan	1826843-81-5	N/A	N/A

中文名称	CAS号	分子式	分子量
Deruxtecan	1599440-13-7	C52H56F N9O13	1034.05
Trastuzumab	180288-69-1	N/A	N/A
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

磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氯化钾为分析纯, 乙腈为色谱纯, 屈臣氏蒸馏水

3.1.3 样品

Trastuzumab- deruxtecan购自第一三共, DAR 值为8。用纯水稀释为浓度为1.0 mg/mL; Deruxtecan购自MCE, 浓度为10.34mg/mL, 用50%乙腈逐级稀释至0.01mg/mL。

3.2 色谱条件

色谱柱1: Biozen dSEC-2 (3um, 200A 300*7.8mm) ; P/N: 00H-4788-K0;

色谱柱2: Biozen dSEC-2 (1.8um, 200A 150*4.6mm) ; P/N: 00F-4787-E0;

流动相A相: 200mM磷酸钾缓冲液+250mM氯化钾 pH 6.2;

流动相B相: 乙腈;

流速1: 0.8 mL/min;

流速2: 0.3 mL/min

柱温: 30 °C;

波长: 280nm;

进样量: 10 µL (柱1) ; 5µL (柱2)

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
30.0	0.8	90	10

3.3 结果与讨论

3.3.1 有机改性剂的比例和选择

选择分析抗体类蛋白常用的磷酸盐缓冲液作为流动相对DS-8201进行聚集体的分离时，发现主峰峰形总体来说较为正常，略微拖尾，推测因为小分子药物的疏水性和ADC中存在的异质性分子导致，聚集体和主峰分离度为2.06。随后，我们逐步加入不同比例的有机改性剂，发现当乙腈的添加比例达到10%的时候，聚集体的检出百分比最高，主峰不对称度为1.28。当进一步增加乙腈的浓度到15%时，主峰拖尾进一步减小，但峰高，聚集体响应和分离度都略有降低。当用异丙醇作为有机改性剂，我们发现色谱柱背压较乙腈有明显的增高，所以将流速适当调低。具体结果参见表3。

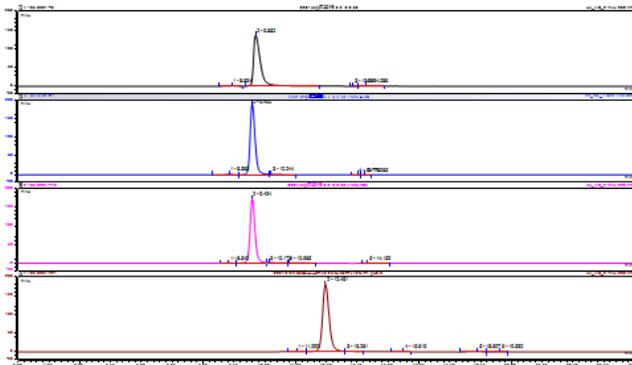


图1.从上之下分别为DS-8201在不同比例有机相中的峰形（具体参见表3）。流动相条件4流速为0.6mL/min，其余为0.8mL/min。

表3. 流动相和积分结果

流动相	主峰不对称度	聚集体百分比	理论塔板数	聚集体分离度
纯水相	1.95	0.80%	6726	2.06
添加10%乙腈	1.28	0.89%	11303	2.35
添加15%乙腈	1.17	0.63%	11550	2.26
添加15%异丙醇	1.21	0.49%	11199	2.26

3.3.2 DS-8201、曲妥珠单抗和Deruxtecans的保留时间对比

因为Deruxtecans上含有肽键，所以在214nm下有

紫外吸收，因此在该波长下可以观察到DS-8201、曲妥珠单抗的保留时间基本相同，大约在9.6min；14.0min左右为buffer峰。Deruxtecans在15.1min左右出峰，可以和DS-8201以及buffer很好的分离。

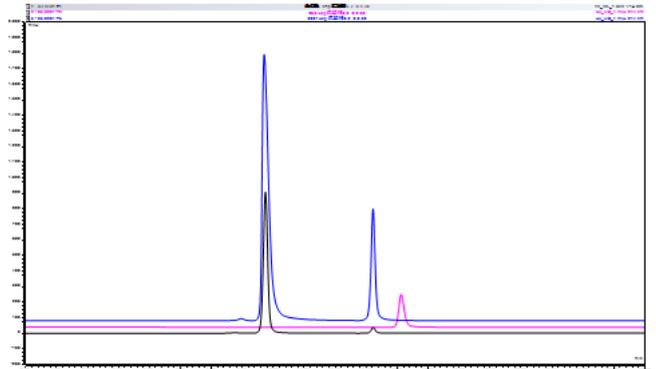


图2. DS-8201 (蓝)、曲妥珠单抗 (黑) 和Deruxtecans (红) 的保留时间对比

3.3.3 色谱柱规格和通量的对比

本实验观察了1.8um, 4.6*150mm (UPLC高通量) 和3um, 7.8*300mm (HPLC) 两种不同规格dSEC-2柱的结果。详见表4。

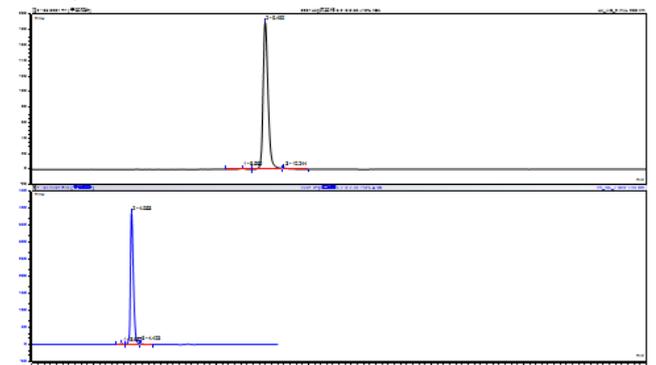


图3.3um, 7.8*300mm (黑) 和1.8um, 4.6*150mm (蓝) 的对比谱图

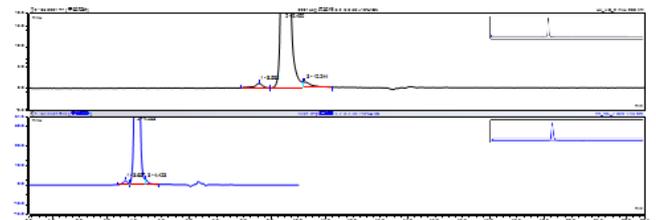


图4.上图的局部放大图

表4. 色谱柱参数和积分结果

柱规格	主峰不对称度	聚集体百分比	聚集体分离度	主峰保留时间
3um, 200A 300*7.8mm	1.28	0.89%	2.35	9.490
1.8um, 200A 150*4.6mm	1.39	0.77%	1.53	4.053

可以看到使用1.8um粒径的dSEC-2柱时，柱长从HPLC的300mm缩短为150mm，仍然可达到聚集体和片段的分离，分析时间从原来的20min一针缩短到10min一针。可以使分析通量提高一倍。4.6mm小内径的色谱柱也可以节约样品的，减少上样量，相同的上样量，小内径色谱柱的色谱峰高为常规7.8mm内径的2倍。

但是在使用1.8um小粒径SEC的时候有一点需要提醒的是为了达到柱效的最大化，需要在UPLC仪器上使用，因为UPCL的管路死体积足够小。而4.6mm内径的SEC柱对于仪器的柱前体积非常敏感，死体积可以引起色谱峰展宽，从而掩盖碎片的分离。

结论

在本应用使用了Biozen dSEC-2 200Å 的SEC色谱柱，对于ADC药物的聚集体进行分析。同时考察了适合于HPLC和UPLC两种仪器平台的色谱柱，结果表

明都可以对聚集体和碎片进行良好的分离。HPLC SEC是一种抗体类蛋白聚集体检测的稳健方法可以用于QC放行；而UPLC SEC则可以大大提高实验通量，特别适合于早期研发阶段样品量大的情况，节约研发人员的时间。

Biozen dSEC-2的高亲水性改性的硅胶修饰技术使得和ADC分子的次级作用得到改善，方法开发简单，使用乙腈作为有机改性剂可以获得较低的背压，对色谱柱更加友好。另外，dSEC-2特有的孔控制技术也使得这款色谱柱具有柱床稳定，耐压，批次重现性好的特点。



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

phenomenex®