

ADC药物的DAR值测定---反相色谱法

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

小分子毒素抗体比DAR (drug-to-antibody ratio) 是ADC药物独特的重要质量属性, 它代表抗体偶联小分子毒性药物的平均数量。

DAR值分析常见的模式为HIC, 该模式下根据分子疏水性逐渐增加的顺序洗脱。荷载小分子药物最多的分子由于疏水性最强最后洗脱, 分离过程类似于反相色谱, 但是随着ADC药物的payload不断发展, 近期科研工作者发现对于偶联较强亲水性payload的ADC药物而言, 不同荷载分子之间的疏水性差异不是特别明显, HIC模式下无法很好的分离不同载药数量的ADC分子。

此时反相色谱在就成为一种适合的替代方案, 该方法特别适合基于半胱氨酸偶联的ADC。通过对ADC药物进行还原, 使抗体还原为轻链和重链, 含不同数量小分子载药数的轻链和重链依据载药数量从少到多依次洗脱。再通过计算各轻、重链的峰面积百分比, 并结合每个峰偶联小分子药物的个数, 计算加权平均DAR值。

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, 是一种较为亲水性的payload。

本应用使用Biozen 的400A孔径的WidePore C4色谱柱对 DTT还原后的Trastuzumab- deruxtecan供试品进行分析, 并计算其平均DAR值。

关键词

平均DAR值; DS-8201; 反相; Biozen WidePore C4; BioTi; 核壳柱

化合物信息

表1. 化合物信息

中文名称	CAS号	分子式	分子量
GGFG-Dxd	1599440-13-7	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

三氟乙酸, 乙腈为色谱纯, 屈臣氏蒸馏水

3.1.3样品

Trastuzumab- deruxtecan对照品购自第一三共, DAR值为8。用纯水稀释为浓度为1.0 mg/mL;

Trastuzumab- deruxtecan供试品, 由客户慷慨赠送, 先用纯水稀释为浓度为1.0 mg/mL;再用1M DTT还原后上样。

Trastuzumab购自MCE; 先用纯水稀释为浓度为1.0 mg/mL;再用1M DTT还原后上样。

3.2色谱条件

色谱柱: Biozen WidePore C4 (2.6um, 400A 150*4.6mm) ; P/N: 00F-4786-E0;

流动相A: 0.1%TFA水;

流动相B: 0.1%TFA乙腈;

流速: 0.5 mL/min;

柱温: 60 °C;

波长: 215nm;

进样量: 10 µL

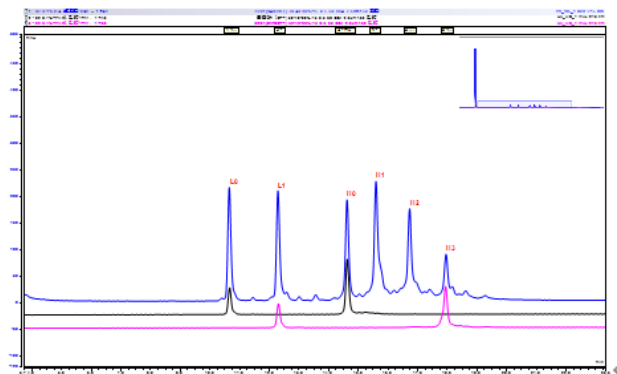
梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.5	70	30
20	0.5	60	40
25	0.5	10	90
25.1	0.5	70	30
30.0	0.5	70	30

3.3结果与讨论

通过对 Trastuzumab- deruxtecan 供试品 Trastuzumab单抗和Trastuzumab- deruxtecan对照品进行还原（100ug蛋白中加入5uL 1M DTT，37°C分别孵育半小时和一小时），我们可以在反相色谱上通过梯度优化，清晰的分离轻链和重链以及荷载不同小分子数量的轻重链。



通过对峰面积进行加权计算，我们可以计算得供试品的平均DAR值为3.98。

Peak Name	Drug Load	Peak Area (%)	Weighted Peak Area (%)
L0	0	48.85	0
L1	1	51.15	51.15
H0	0	18.74	0
H1	1	32.32	32.32
H2	2	31.52	63.04
H3	3	17.42	52.26
Weighted Average DAR		3.98	

结论

在本应用使用Biozen 的400A孔径的WidePore C4 色谱柱对 DTT还原后的Trastuzumab- deruxtecan供试品进行DAR值分析。该柱采用核壳技术结合丁基的键合相，可以大幅减少蛋白与固定相的次级作用，改善蛋白回收率，峰形和残留的问题，三键键合技术的C4固定相能够耐受90度的高温；Bio Ti生物惰性的钛合金柱硬件也最大程度的减少了对生物基质样品的干扰，保证分析结果的稳健可靠。



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

