

抗体-药物偶联物的完整分析

使用台式X500B QTOF质谱仪分析曲妥珠单抗-恩他辛抗体-药物偶联物

Intact Analysis of Antibody Drug Conjugates

Trastuzumab Emtansine Analysis using Benchtop X500B QTOF Mass Spectrometer

Wen Jin¹, Suya Liu¹, Doug Simmons¹, Ian Moore¹, Sean McCarthy² and Sibylle Heidelberger¹

71 Four Valley Dr. Concord, ON L4K 4V8, Canada

500 Old Connecticut Path, Framingham, MA, 01701, USA

引言

抗体-药物偶联物 (ADCs) 是一类新兴的生物治疗药物。这些药物采用特定的连接子将抗体和小分子细胞毒药物连接起来, 因而ADCs既具有单克隆抗体的靶向特异性, 又可以通过细胞毒性分子有效杀死目标感染细胞。然而ADCs的结构组成非常复杂, 在分析表征过程中将会涉及到抗体主链和抗体上结合的细胞毒药物两个部分的表征, 其中药物抗体比 (DAR值) 的分析检测是ADCs药物评估中重要指标。目前已经有研究表明, 抗体上结合药物的数量会显著影响ADCs的安全性和有效性, 因此必须开发有效的方法对其进行表征和监测^[1-3]。

本文基于SCIEX公司推出的紧凑型X500B QTOF高分辨质谱系统, 提出了一种新型简便的ADCs分析方法快速准确地计算DAR值。该系统使用SCIEX OS软件进行数据采集, 并且搭配BioPharmaView™ 2.0.1软件进行数据处理, 不仅可以对ADCs进行常规表征, 也可以对ADCs糖基化和去糖基化两种形态进行分析, 分别得到准确的DAR值。

实验部分

样品分为原始的含有糖基化的ADCs, 以及使用PNGase F酶 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) 脱去N-糖的脱糖ADCs, 具体步骤参照PNGase F酶的使用说明。

LCMS分析仪器配置: 台式X500B QTOF高分辨质谱联接Exion LC™系统, 并且搭载SCIEX OS操作系统。表1列出了使用Exion LC™系统分离过程中使用的液相色谱条件, 表2列出了使用台式

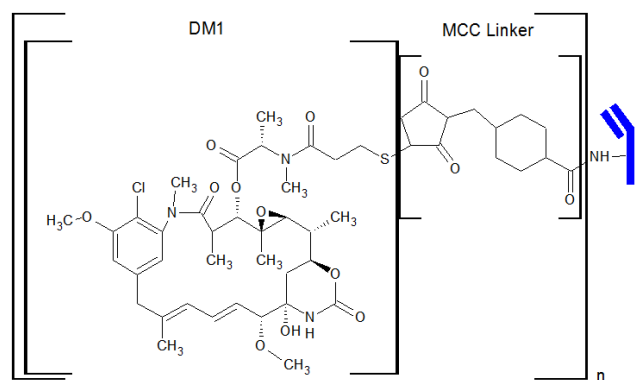


图1. 曲妥珠单抗-恩他辛的分子结构图。T-DM1由一个曲妥珠单抗主链、多个MCC连接子以及DM1药物组成, DM1是一种细胞毒性药物, DM1与MCC连接子反应后与通过赖氨酸残基与抗体结合。

X500B QTOF高分辨质谱分析过程中用到的各种参数。所得到的数据使用BioPharmaView™软件进行从原始质谱图到完整蛋白分子量的数据处理, 并计算DAR值。

表1. Exion LC™液相色谱条件。

Column	Agilent Poroshell 300SB-C8 1.0 x 75mm 5 μm
Mobile phase A	0.1 % Formic acid in water
Mobile Phase B	0.1% Formic acid in acetonitrile
Flow rate	0.2 mL/min
Column Temperature	75 °C

表2. X500B QTOF质谱分析条件。

Source parameters:	
CUR	30
GS1	50
GS2	50
Ion Spray Voltage	5000 V
Source Temperature	400°C
TOFMS mass range	900 – 4000 m/z
DP	250 V
Accumulation time	0.5 s
Time bins to sum	80
Intact Protein Mode (IPM)	On
Large Proteins (>70kDa)	On
Decrease Detector Voltage	On
DP	250 V

结果与讨论

糖基化的T-DM1

在本研究中，我们选用曲妥珠单抗-恩他辛 (T-DM1)作为研究对象，主要用于治疗HER-2阳性转移性乳腺癌。T-DM1由曲妥珠单抗通过赖氨酸残基共价结合具有细胞毒性的DM1药物分子，结构如图1所示。当T-DM1被靶细胞内化后，细胞毒性药物分子将被释放，来执行它的作用。因此，在T-DM1药物开发和生产过程中，药物分子与抗体结合效果即DAR值的测定是药效评估必不可少的关键一环。

本文首先通过X500B质谱平台来测定糖基化T-DM1的DAR值。如图2A所示，由于ADCs分子中含有多种糖基化修饰，所以分析得到的原始质谱图非常复杂。我们借助BioPharmaView™软件的重建算法，生成了高质量的完整分子量图。由图B，我们可以看到一系列不同DAR值完整蛋白分子量的信号。这些ADCs分别是由0-8个药物分子与曲妥珠单抗相连。每个DAR值对应的完整分子量图中都能够看到清晰的糖型轮廓，且各个轮廓分布均一致。

通过对每一个DAR值对应的完整分子量图进行分析（图3），我们清楚地看到了各个主要糖型的轮廓。其中有三组峰的质量差为221 Da，而不是219 Da，初步判断是连接子自身的质量造成的。此前有报道称，这是由于赖氨酸残基发生了化学交联反应。曲妥珠单抗与MCC连接子的初始反应过程中将会产生一种中间体。在某些条件下，由于赖氨酸的位置更加接近该中间体，从而发生了两者之间的链间交联反应。针对这种情况，我们可以通过计算质量数的差值来判断，因为该连接子的质量数为221 Da。^[2]

利用BioPharmaView™，DAR值可以根据不同药物偶联抗体的重建峰面积分布来计算。图4中可以看到，DAR值的计算结果为3.49，与文献中报道的3.5值吻合较好^[1-3]。

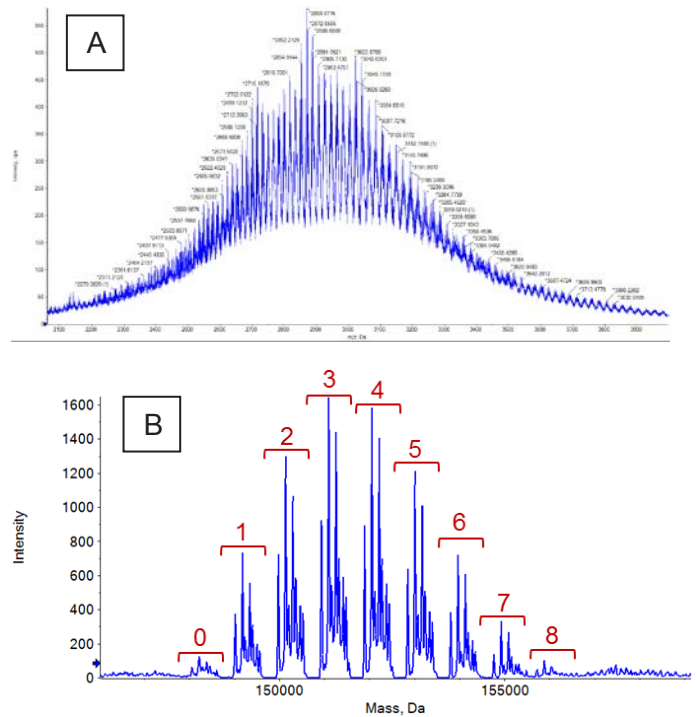


图2. T-DM1原始质谱图(A)和完整分子量图 (B)。原始质谱图(2A)既包括不同的糖基化修饰又包含不同DAR值的信息，因而增加了抗体谱的一般复杂程度，而经过BioPharmaView™软件处理后得到了完整分子量图，并且计算出样本中有0-8个药物分子连接在曲妥珠单抗上。

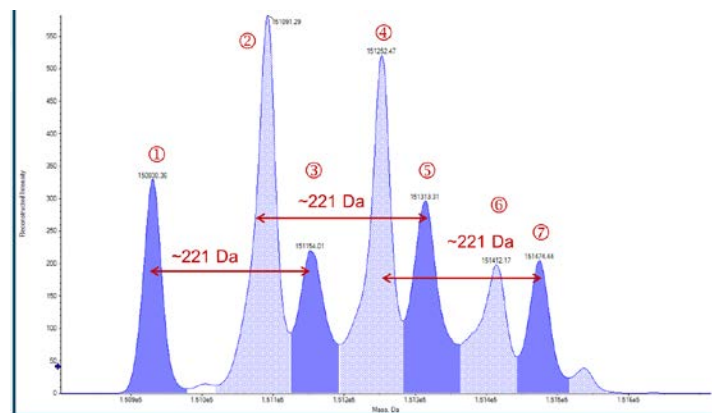


图3. 3个药物分子结合的曲妥珠单抗-恩他辛完整分子量图。图上可以发现主要的糖型为1: G0F/G0F, 2: G0F/G1F, 3: G1F/G1F和4: G1F/G2F。除此之外，图上还观察到质量数增加了一个MCC连接子的信号。

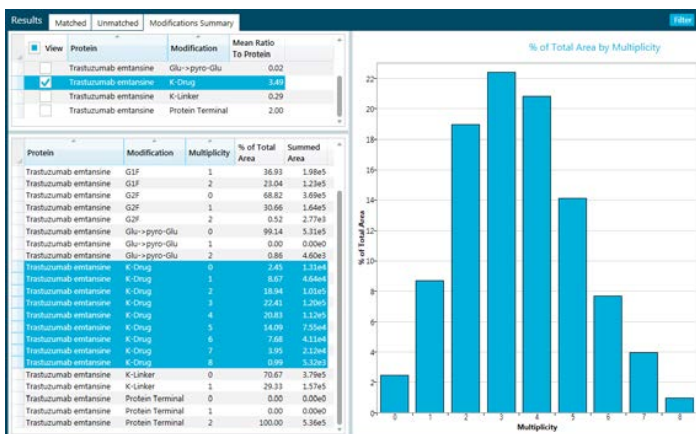


图4. 使用BioPharmaView™计算曲妥珠单抗-恩他辛的DAR值。软件给出了非常直观的表格和图形，显示了不同比值的分布情况，并在右上角用高亮显示出计算结果：3.49。

脱糖基化的 T-DM1

我们使用PNGase F酶去除N-糖链，得到脱糖基化的T-DM1。由于与糖型相关的峰被去除，我们得到一个复杂度相对较低的原始质谱图（如图5A所示）。在图5B中，我们可以清楚地看到由糖型导致的复杂性已经降低。此外，在不同DAR值对应的每簇信号中，质量数增加221 Da的峰信号仍然非常明显，这一现象进一步证实了我们前文的推断。

去糖基化曲妥珠单抗-恩他辛的完整分子量图进一步证实了图2中对糖型的分析结果。通过对原始曲妥珠单抗-恩他辛和脱糖基化曲妥珠单抗-恩他辛这两种样本进行检测，均得到了相同的结果，即有0-8个药物分子连接在曲妥珠单抗主链上。利用BioPharmaView™软件计算得到的DAR结果也与文献报道一致。^[2]

结论

通过实验结果证明，SCIEX台式X500B QTOF高分辨质谱系统可以为广大生物制药的分析工作者提供非常高质量的数据。X500B QTOF的超高分辨可以识别糖基化和与抗体结合的药物分子数量，因此对结构复杂的ADCs类药物的分析质控具有很好的应用。也正是X500B QTOF超高的质量精度帮助我们判定了221 Da质量偏差的归属：所得到的数据结果与Jacobson等人的研究结论完全吻合，曲妥珠单抗 - MCC连接子中间体与赖氨酸残基会发生交联反应，而221Da正是对应于一个MCC连接子。数据处理和谱图的重建采用BioPharmaView™软件进行，分析速度快，计算结果准确：含糖基化的样本通过软件计算得到的DAR值为3.49，非常接近与文献中给出的DAR值3.5。^[2]

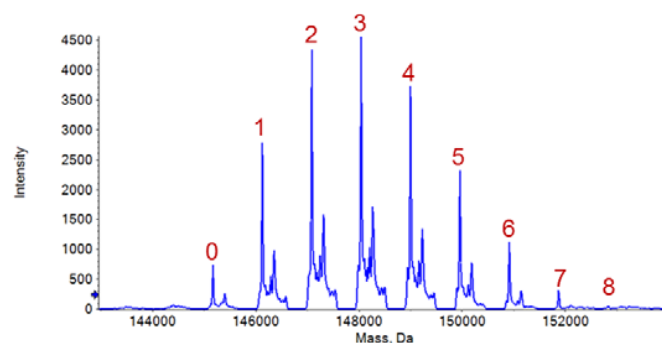
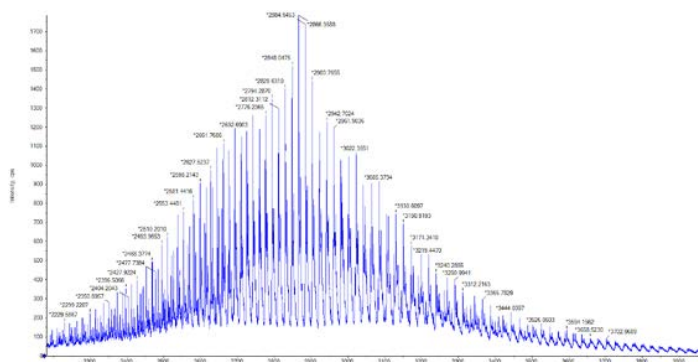


图5. 5A：脱糖基化T-DM1的原始质谱图，5B：由5A重建得到的：脱糖基化T-DM1的分子量图。

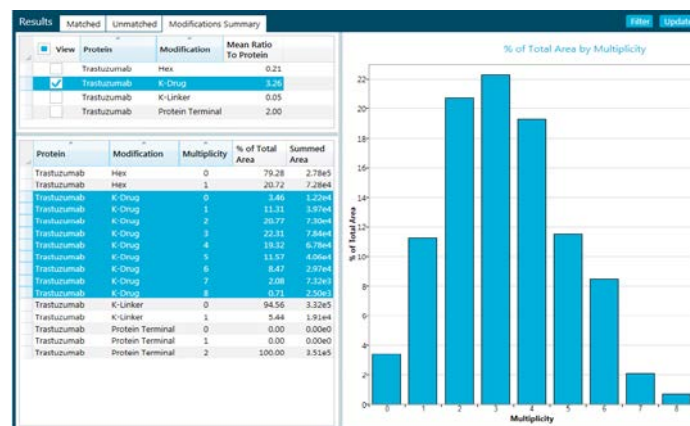


图6. 去糖基化的曲妥珠单抗-恩他辛的DAR计算结果。使用0-8个药物分子的偶联物（左下对话框中高亮标出）来计算得到DAR值（左上对话框中高亮标出）为3.26。

参考文献

- [1] Michael T. Kim, Yan Chen, Joseph Marhoul and Fred Jacobson. Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine-Linked Antibody Drug Conjugate. *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 1223-1232
- [2] Yan Chen, Michael T. Kim, Laura Zheng, Galahad Deperalta, and Fred Jacobson. Structural Characterization of Cross-Linked Species in Trastuzumab Emtansine (Kadcyla). *Bioconjugate Chem.* 2016, 27, 2037-2047
- [3] Liuxi Chen, Lan Wang, Henry Shion, Chuanfei Yu, Ying Qing Yu, Lei Zhu, Meng Li, Weibin Chen, and Kai Gao. In-depth structural characterization of Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate. *MABS*, 2016, VOL. 8, NO. 7, 1210-1223

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-5468-ZH-B



SCIEX中国公司

北京分公司
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808 1388
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419 7200
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司
地址：广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510 0200
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX