

## 利用BioAccord系统通过非变性质谱法分析抗体偶联药物(ADC)

---

Henry Shion, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

---

### 摘要

本应用简报将展示BioAccord系统在非变性条件下分析抗体偶联药物(ADC)的性能。

### 优势

利用分析型体积排阻色谱(SEC)和基于非变性LC-MS分析的BioAccord系统测定Lys和Cys偶联ADC的药物偶联比(DAR)。

---

### 简介

药物偶联比(DAR)是ADC的一种关键质量属性(CQA)，因为它直接影响ADC的治疗效果和药代动力学。在ADC开发过程和商业化生产运营中，DAR的测定（和监测）至关重要。非变性电喷雾质谱（非变性质谱）已成为分析共价复合蛋白质治疗药物和非共价蛋白质复合体的有力工具。在非变性质谱条件下，使用兼容MS的非变性缓冲液体系

对蛋白质进行电喷雾电离。

这些LC-MS分析条件使许多蛋白质能够保持折叠状态，这些状态表现出特征性低电荷态，与分析变性蛋白相比，需要在更宽和更高的质荷比( $m/z$ )范围内具有出色的灵敏度。非变性质谱面临多种独有的难题，包括在尝试使用注入式MS时，需要在分析前进行大量样品净化，并要求操作人员拥有更高的技术水平以获得并解析实验结果。之前，我们致力于通过将在线SEC与现有MS技术联用来简化非变性质谱数据的采集<sup>1,2</sup>，促进样品脱盐和缓冲液交换，以研究半胱氨酸偶联ADC药物。本研究采用BioAccord系统来改善非变性质谱法分析半胱氨酸偶联ADC和赖氨酸偶联ADC的易用性。

BioAccord系统是一种小体积、高性能的台式系统，其经过精心地开发和设计，具有简单的用户界面，还配备自动系统设置和自检功能。

---

## 结果与讨论

BioAccord系统由ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统组成，该系统配备与ACQUITY RDa检测器（紧凑型oa-TOF MS）串联的光学检测器（TUV或FLR）。该系统在UNIFI科学信息系统下运行，通过组合自动化数据采集、处理和报告功能，为法规依从性和非法规依从性实验室提供精简的流程式解决方案，包括自动化实现对ADC表征进行DAR计算。

### 半胱氨酸偶联ADC分析

半胱氨酸偶联ADC分析采用非变性质谱分析法，需要在非变性条件下保持非共价连接的ADC分子完整，从而确定ADC样品的DAR值和载药量分布。本研究将BioAccord系统直接与分析型SEC色谱柱（ACQUITY UPLC BEH SEC 蛋白分析专用柱, 200Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm, 部件号186008471）联用进行等度洗脱（50 mM醋酸铵( $\text{NH}_4\text{OAc}$ )，运行时间10分钟）。

在这些SEC条件下，ADC亚基保持在近天然状态，保持四级结构相互作用，产生的表面积远小于利用酸性-有机流动相进行典型的反相分离时所发现的变性、未折叠形式。在非变性电喷雾质谱条件下，蛋白质带电量比反相条件下少，并且在所得质谱图中，较小的电荷峰簇出现在较高的 $m/z$ 范围内。如图1所示，BioAccord系统的扩展质量范围（高达 $m/z$  7000）满足高 $m/z$ 测量的需要，并展示了复杂的非糖基释放半胱氨酸偶联ADC的检测结果。这些结果与之前在其他高分辨率质谱系统上分析得到的ADC样品谱图一致<sup>1,2</sup>，在BioAccord和之前的QTof MS系统之间获得了相当的DAR值（图1和表1）。

组合原始谱图电荷峰簇（图1，左图）、放大单电荷态（中图）和去卷积谱图（右图）显示了在BioAccord系统上获得的裸抗体mAb和三个水平（低、中、高）偶联ADC的结果。裸mAb谱图中显示了所有三个浓度水平的偶联样品中针对各种偶联形式（0、2、4、6和8）重复的糖基化模式。在UNIFI数据处理工作流程内，利用去卷积谱图中各糖型的加合积分峰面积自动计算总平均DAR和载药量分布，如之前的文献所详述<sup>1</sup>。

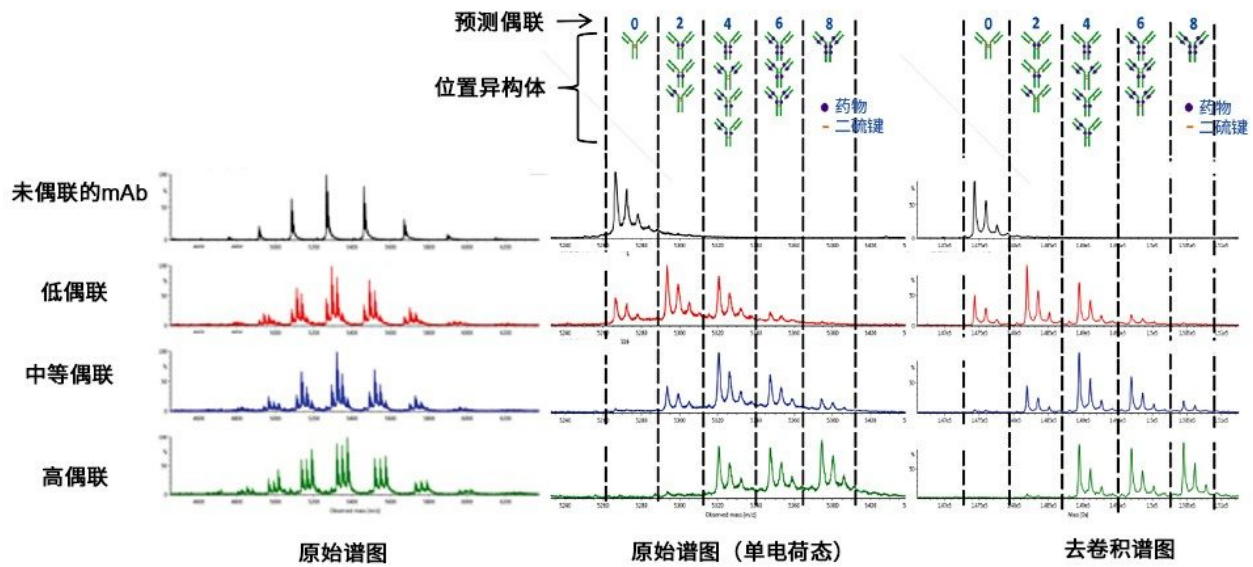


图1.利用BioAccord系统进行非变性质谱分析，在不经糖基释放处理的情况下得到标准品(mAb)以及低、中和高偶联水平半胱氨酸偶联ADC样品的多电荷峰簇的组合原始谱图（左图）、组合原始谱图的放大区域（单电荷态）（中图）和去卷积谱图（右图）。比较三种不同半胱氨酸偶联ADC样品随载药量增加的药物分布。

半胱氨酸偶联ADC载药量分布和DAR													
	低				中				高				
	HIC	QTof1	QTof2	Tof	HIC	QTof1	QTof2	Tof	HIC	QTof1	QTof2	Tof	
ADC 2	0.81	0.74	0.64	0.68	0.38	0.41	0.35	0.36	0.07	0.09	0.05	0.05	
ADC 4	1.14	1.17	1.37	1.36	1.67	1.57	1.81	1.82	1.23	1.11	1.19	1.15	
ADC 6	0.75	0.60	0.64	0.65	1.61	1.45	1.51	1.47	1.72	1.72	1.86	1.85	
ADC 8	0.12	0.21	0.05	0.10	0.78	0.97	0.70	0.75	2.95	3.05	2.98	2.96	
DAR	2.83	2.72	2.70	2.79	4.44	4.40	4.37	4.40	5.97	5.97	6.07	6.01	

**QTof 1** 去糖基化样品，于2014年在Xevo G2-S上运行  
**QTof 2** 非去糖基化样品，于2017年在Vion上运行  
**Tof** 非去糖基化样品，于2018年在BioAccord上运行

表1.HIC (UV)和三个非变性SEC-MS实验中的总平均DAR和药物分布比较，所有三种载药量下的结果一致。结果表明，使用正交方法（HIC与MS）或者不同QTof或Tof MS系统（Xevo G2-S、Vion IMS QTof MS和BioAccord系统）能够实现一致的DAR测量。BioAccord系统具备自动化数据采集、处理和报告DAR计算结果的精简工作流程，能够有效进行ADC的非变性LC(SEC)-MS分析，以确定批号间、批次间可比性。

## 赖氨酸偶联ADC数据

在无需进行样品糖基释放的情况下，对赖氨酸偶联ADC Kadcyra（曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)）进行LC(SEC)-MS分析获得原始谱图和去卷积谱图（图2）。已有文献详细介绍过使用非变性质谱方法分析共价赖氨酸偶联ADC的优势<sup>2</sup>。在去卷积谱图的峰上标记出检测到的偶联药物数量。利用UNIFI计算得出的DAR值为3.46，与药品生产商报告的DAR (3.50)较为一致<sup>3</sup>。同样，结果与之前使用Vion IMS QTof系统得到的研究结果相当<sup>2</sup>。

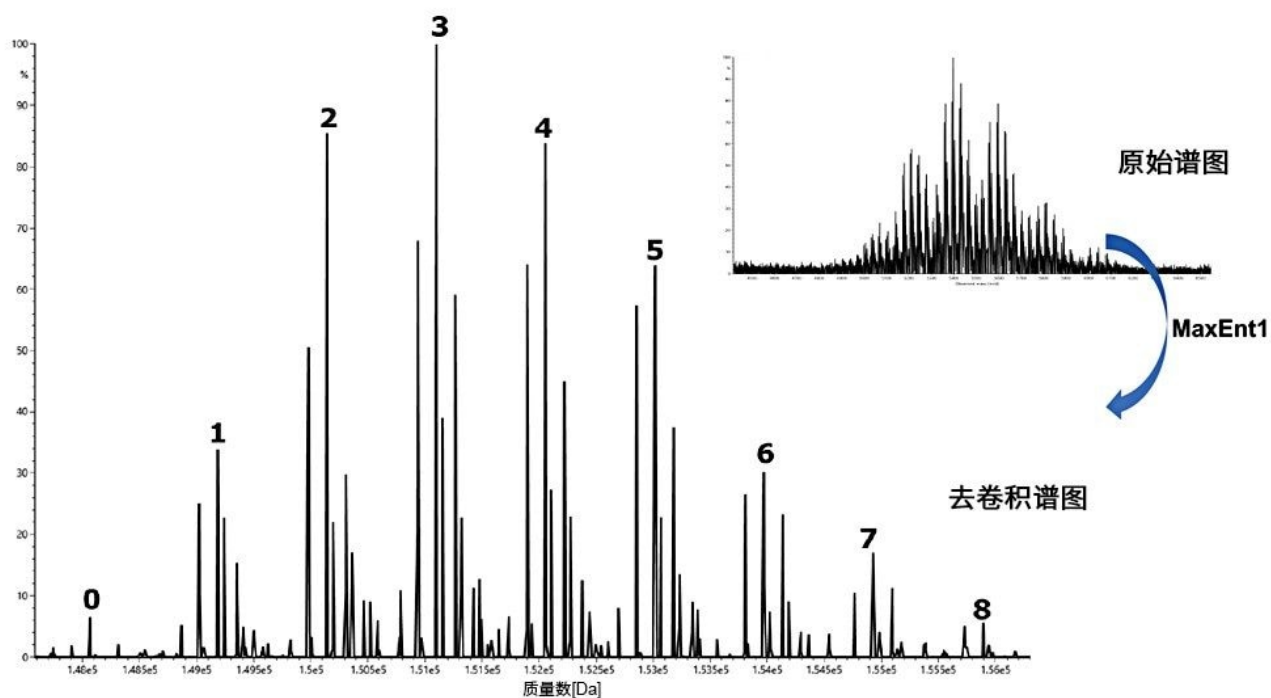


图2.利用BioAccord系统对赖氨酸偶联ADC Kadcyra（曲妥珠单抗-美坦新偶联物(T-DM1)）进行LC(SEC)-MS分析得到的原始谱图和去卷积谱图。去卷积谱图上标记的数字代表检测到的药物数量（偶联至完整蛋白水平的曲妥珠单抗上）。计算出的平均DAR为3.46，公布的DAR为3.50<sup>3</sup>。实验在ADC药物不经糖基释放处理的情况下进行。

## 结论

在本应用简报中，我们证明BioAccord系统非常适用于对半胱氨酸偶联ADC和赖氨酸偶联ADC进行LC(SEC)-非变性质谱分析。平均DAR和载药量分布结果与疏水作用色谱(HIC)分离（配备TUV检测）产生的结果以及利用前几代QToF MS系统所得到的结果相当。BioAccord系统简化了操作并具备可配置的合规功能，即使是MS经验不足的科学家也能轻松应用，有助于组织更容易地部署质谱仪，以支持ADC的开发和生产过程。本技术简报及其他介绍BioAccord系统的已出版应用文献<sup>4-8</sup>表明，BioAccord系统功能广泛，适用于支持生物治疗药产品质量属性的常规分析。

---

## 参考资料

1. H. Shion *et al*, Development of Integrated Informatics Workflows for the Automated Assessment of Comparability for Antibody Drug Conjugates (ADCs) Using LC-UV and LC-UV/MS. Waters Application Note. 720005366EN. 2015.
2. H. Shion *et al*, Analytical Scale Native SEC-MS for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Characterization. Waters Application Note. 720006368EN. 2018.
3. L. Chen *et al*, In-depth structural characterization of Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate. *MAbs*. 2016 Oct; 8(7): 1210–1223.
4. H. Shion 等人, 在数据完整性环境下进行可重现的完整分子量例行分析. 沃特世应用纪要. 720006472ZH. 2019.
5. N. Ranbaduge 等人, 使用BioAccord系统进行常规肽谱分析. 沃特世技术简报. 720006466ZH. 2019.
6. X. Zhang 等人, 使用BioAccord系统进行游离N-糖分析. 沃特世技术简报. 7200006474ZH. 2019.
7. H. Shion 等人, 使用BioAccord系统实现单克隆抗体轻链和重链质谱分析的平台方法. 沃特世技术简报. 7200006529ZH. 2019.
8. X. Zhang. 等人, 使用BioAccord系统提高生物类似药N-糖分析的工作效率和可信度. 沃特世技术简报. 7200006545ZH. 2019.

---

## 特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720006570ZH, 2019年5月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号