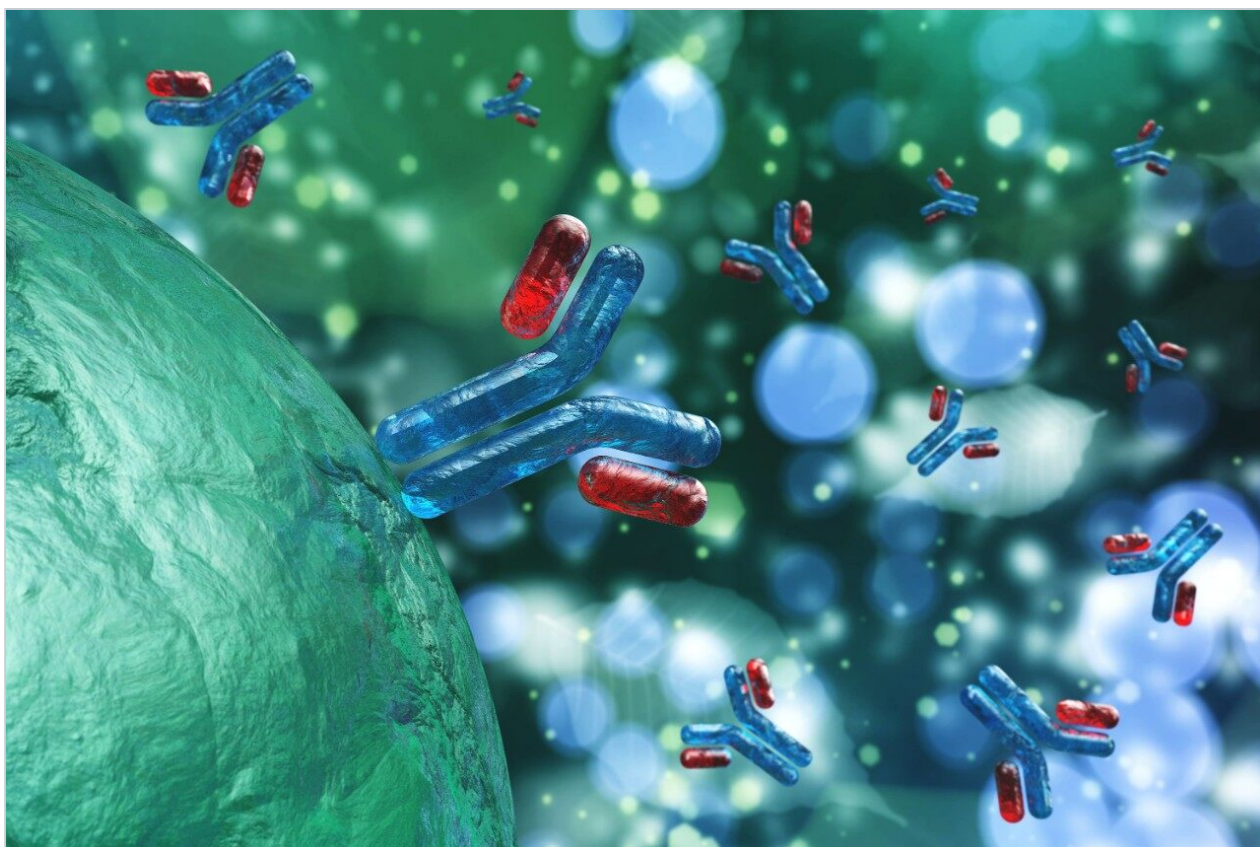


应用纪要

在SYNAPT XS上使用非变性SEC LC-MS工作流程分析半胱氨酸偶联的抗体偶联药物(ADC)

Henry Shion, Colette Quinn, Scott J. Berger, Ying Qing Yu

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

药物抗体偶联比(DAR)是抗体偶联药物(ADC)的关键质量属性(CQA)，因为它直接影响治疗效果和药代动力学。在ADC开发过程以及商业化生产和质量控制运营中，DAR的测定和监测至关重要。对于半胱氨酸偶联ADC，当通过桥接二硫键添加ADC分子时，为保持抗体亚基之间的非共价键完整，必须进行非变性质谱分析。因此，非变性质谱成为使用质谱法正确测量DAR以及完整分子中载药量分布的重要工具。本研究采用分析级非变性SEC LC-MS分析工作流程（图1），该工作流程使用SYNAPT XS进行非变性质谱检测，以分析多种具有不同载药量的半胱氨酸偶联ADC¹⁻³。然后将分析结果与上一代Q-ToF系统得到的结果进行比较，证明非变性SEC LC-MS工作流程（图1）在不同时间以及不同系统上的耐用性。

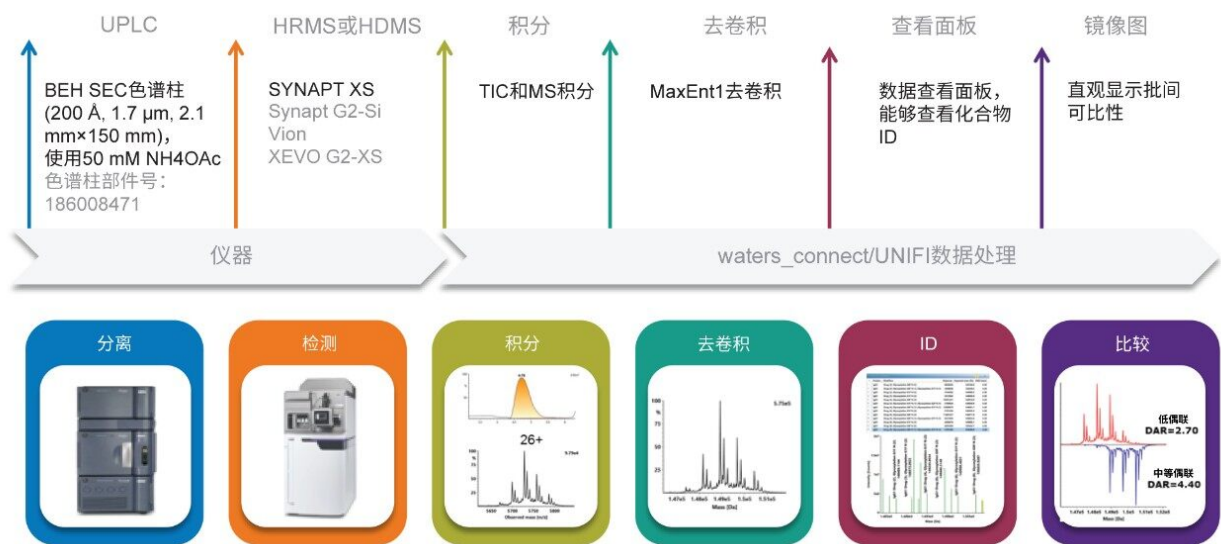


图1.分析级非变性SEC LC-MS分析工作流程。将生物分子上样至SEC色谱柱（ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 150 mm，部件号：186008471），在非变性条件下脱盐/分离，然后进行Q-ToF分析（Xevo G2-XS、Vion或者SYNAPT G2-Si或XS）。通过组合TIC峰下的扫描数据获得原始质谱图，然后进行去卷积和质心处理，以便定量。使用每个样品中检出的组分，通过强度平均自定义计算方法得出DAR值。

优势

- 分析前无需进行样品前处理
- 自动测量DAR和药物分布
- 常规且耐用的非变性LC-MS解决方案

- 精简的分析级SEC LC-MS分析工作流程

简介

近年来，非变性质谱法越来越受欢迎，因为它扩展了质谱法分析复合物及其他类型非共价相互作用的能力。取得此进展的原因之一是在线SEC LC-MS非变性分析的改进¹⁻³。在线SEC-MS可大幅减少样品前处理需求，自动完成分析过程，使方法更加常规且耐用。在反相LC-MS分析的变性条件下，生物分子中的非共价键断裂。如需获取高级结构的信息，可采用非变性LC-MS工作流程，通过使用MS兼容的挥发性缓冲液（例如乙酸铵）和电喷雾软电离质谱条件，使生物制剂保持天然或近天然状态，非共价相互作用完整。由于mAb生物治疗药物通常是以蛋白质-蛋白质或蛋白质-配体相互作用发挥效能，因此直接测量这种非共价相互作用对于表征此类分子非常重要。例如，半胱氨酸偶联的抗体偶联药物(ADC)即为小分子药物通过硫醇基（通常参与亚基内部和不同亚基间的连接）以共价方式连接至宿主抗体。这些硫醇基团（主要）通过还原两条重链或轻链与重链之间的链间二硫键产生。由于每个还原的二硫键均释放出两个游离硫醇基团，因此在理想情况下，预计上样的小分子药物将对出现2、4、6或8个连接位点，如图2所示。一旦这些二硫键发生裂解，将由亚基的残余非共价相互作用将半胱氨酸偶联的ADC分子保持在一起。

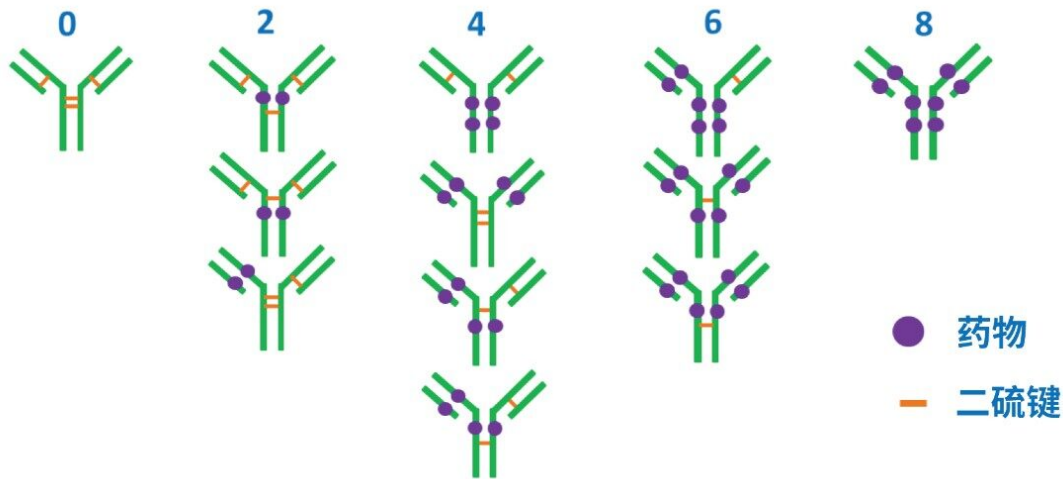


图2. IgG1抗体及其潜在的半胱氨酸偶联ADC载药量分布（包括异构体结构）。小分子药物通过连接亚基的还原二硫键连接至宿主抗体，每个抗体中通常观察到成对出现的2、4、6或8个药物分子。

药物抗体偶联比(DAR)是ADC的关键质量属性(CQA)，因为它直接影响治疗效果和药代动力学。要成功开发和生产ADC，必须测定DAR，并监测整个开发和商业化过程。反相LC-MS实验由于需要在酸性流动相条件下进行

，且洗脱步骤要求流动相的有机相组成较高，半胱氨酸偶联ADC将解离为半抗体或轻链和重链亚基复合体。因此，表征完整分子中半胱氨酸偶联ADC的DAR必须使用非变性质谱条件。本研究采用SYNAPT XS QToF系统进行分析级非变性SEC LC-MS分析，对一组具有不同载药量的半胱氨酸偶联ADC进行非变性质谱分析¹⁻³。将分析结果与上一代Q-ToF系统得到的结果进行比较，证明非变性SEC LC-MS工作流程（图1）在不同系统上表现的一致性。

结果与讨论

本研究在0.1 mL/min等度洗脱（50 mM乙酸铵）条件下进行SEC分析（ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200 Å, 1.7 μm, 2.1 mm x 150 mm, 部件号：[186008471 <https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/columns/186008471-acquity-uplc-protein-beh-sec-column-200a-17--m-21-mm-x-150-mm-1-.html>](https://www.waters.com/nextgen/in/en/shop/columns/186008471-acquity-uplc-protein-beh-sec-column-200a-17--m-21-mm-x-150-mm-1-.html)），运行时间10 min。非变性SEC LC-MS系统由ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统与SYNAPT XS质谱仪串联组成。使用MassLynx（1.4.2版）操作该系统以采集数据，并将数据导入waters_connect信息学平台内的UNIFI应用程序（或导入UNIFI科学信息系统，两者均为1.9.4版），从而简化数据处理和报告流程（包括自动完成DAR计算和药物分布比较）。

与反相LC-MS分析相比，在非变性质谱分析中，由于非变性SEC-MS条件使紧凑的非变性结构得以保持，生物样品在较高的质荷比下将携带较少的电荷。图3展示了裸抗体mAb和三种载样量（低、中和高）的偶联ADC的组合原始谱图电荷峰簇（左图，以 $m/z=5,600$ 为中心，荷峰簇中仅有5~6个主要电荷态）、单电荷态放大图（中图）和去卷积谱图（右图）。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waters_connect/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化自定义计算总平均DAR和载药量分布，如之前的文献所详述¹。

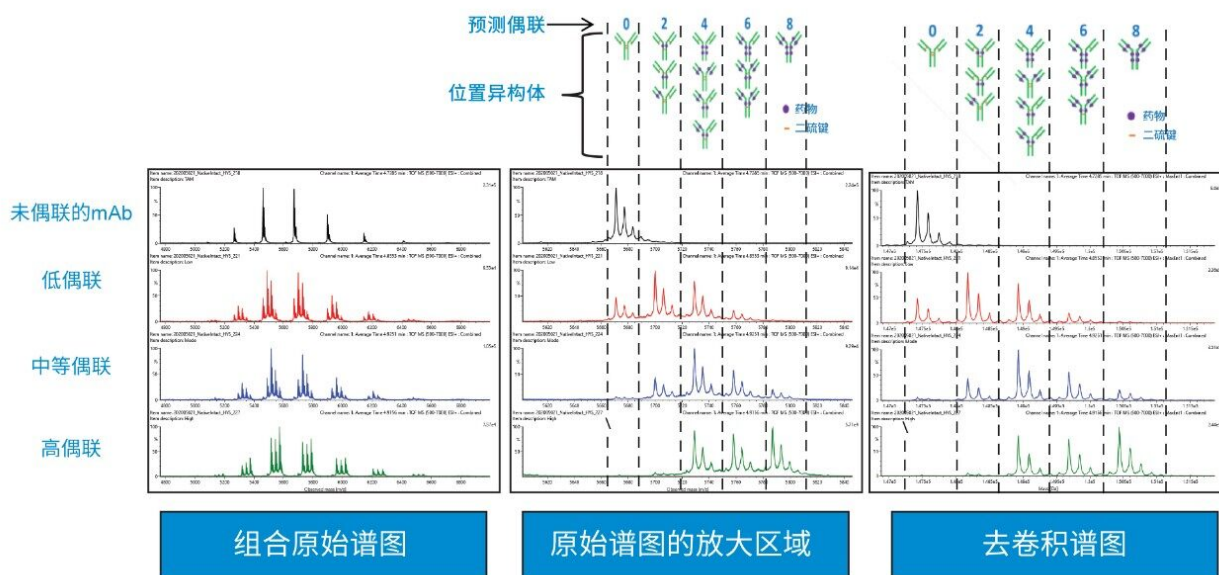


图3.组合的多电荷非变性原始质谱图展示了窄范围内的一组高 m/z 离子，其中显示了参比物质（裸 mAb ）以及低、中、高偶联水平的半胱氨酸偶联ADC样品中由糖型和ADC异质性引起的峰（左图）、组合原始谱图的（单电荷态）放大区域（中图）和去卷积谱图（右图）。数据来自进行非变性SEC LC-MS分析的SYNAPT XS HDMS系统。

表1比较了第三批ADC的DAR和载药量分布计算结果，数据来自HIC分析（2014年）¹，以及使用Xevo G2-S QToF系统（2014年）、Vion IMS QToF MS（2017年）和SYNAPT XS系统（本研究，2020年）进行的非变性SEC LC-MS分析。Xevo G2-S数据在ADC经PNGase F处理后采集，所有其他测量均使用糖基化抗体完成。这些实验结果表明，采用不同Q-ToF MS平台（Xevo G2-S、Vion IMS QToF MS和SYNAPT XS系统）在经过和不经过糖基化的情况下，即使时间推移，质谱法测量DAR的性能都能与正交方法(HIC vs MS)一致。总体而言，分析级非变性SEC LC-MS分析工作流程结果表明，其用于ADC非变性分析以确定批次可比性在DAR和载药量分布研究中非常有效。

半胱氨酸偶联ADC载药量分布和DAR												
	低				中等				高			
	HIC	QTof1	QTof2	SYNAPT XS	HIC	QTof1	QTof2	SYNAPT XS	HIC	QTof1	QTof2	SYNAPT XS
ADC 2	0.81	0.74	0.64	0.62	0.38	0.41	0.35	0.37	0.07	0.09	0.05	0.04
ADC 4	1.14	1.17	1.37	1.32	1.67	1.57	1.81	1.80	1.23	1.11	1.19	1.16
ADC 6	0.75	0.60	0.64	0.61	1.61	1.45	1.51	1.46	1.72	1.72	1.86	1.81
ADC 8	0.12	0.21	0.05	0.12	0.78	0.97	0.70	0.71	2.95	3.05	2.98	1.94
DAR	2.83	2.72	2.70	2.75	4.44	4.40	4.37	4.36	5.97	5.97	6.07	5.94

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
 SYNAPT XS 非去糖基化样品，于2020年在Synapt XS上运行

表1.HIC (UV)和三个非变性SEC LC-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 vs MS)或者不同的Q-ToF MS系统 (Xevo G2-S、Vion IMS QTof MS和SYNAPT XS) 能够实现一致的DAR测量。

结论

本应用简报介绍一种分析级非变性SEC LC-MS分析工作流程，该工作流程可在各种LC-MS系统上运用以分析半胱氨酸偶联ADC。SEC-MS分析工作流程提供了自动化样品操作，相比于注样分析具有效率优势，并且无需进行样品前处理（例如缓冲液交换和去糖基化）即可进行质谱分析以确定ADC分子的DAR和药物分布。

参考文献

1. Shion H, Birdsall R, Cubbedge S, and Chen W. 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 720005306EN <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005306en.pdf>> .2015 May.
2. Shion H, Yu Y, and Chen W. Analytical Scale Native SEC-MS for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Characterization.Waters Application Note 720006368EN <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006368en.pdf>> .2018 Aug.

3. Shion H, Yu Y, and Chen W. Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) by Native Mass Spectrometry on the BioAccord System.720006570EN <<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006570en.pdf>> .2019 May.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

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

SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <<https://www.waters.com/135020928>>

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/10195515>>

720007026ZH, 2020年10月