

使用ACQUITY™ Premier UPLC™和Xevo™ G3 QToF质谱仪进行完整赖氨酸偶联ADC的LC-MS分析

Samantha Ippoliti, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用简报介绍了使用ACQUITY Premier UPLC与Xevo G3 QToF质谱仪的联用系统分析完整赖氨酸偶联的抗体偶联药物(ADC)的情况。使用MaxEnt1去卷积数据计算药物抗体比(DAR)，这是一项衡量ADC治疗药物安全性和有效性的关键指标。在合规的waters_connect信息学平台上运行waters_connect™ UNIFI™应用程序的完整质量数工作流程，进行数据采集和处理。

优势

- ADC工作流程采用UNIFI应用程序中的自定义计算功能自动计算DAR，工作流程化繁为简，并降低了手动处理或报告错误的风险
- ACQUITY Premier UPLC系统采用高性能表面(HPS)，可延长系统正常运行时间，并提供一致的分析物回收率
- 高分辨率台式Xevo G3 QToF质谱仪，灵敏度高、稳定性好，能够检测生物分子

简介

近年来，抗体偶联药物(ADC)在改善癌症治疗方面的发展势头十分强劲。截至2023年，FDA已经批准了11种ADC治疗药物，可用于多种癌症类型¹⁻²。ADC是一种单克隆抗体(mAb)，通过连接子与药物毒素偶联，从而靶向递送至癌细胞。连接子-药物通常通过化学反应与mAb蛋白质序列中的赖氨酸或半胱氨酸偶联，或通过靶向位点蛋白质工程偶联。本应用简报的案例研究使用Kadcyla™（曲妥珠单抗-美坦新偶联物）作为模型分子，重点关注赖氨酸偶联类别的ADC。赖氨酸偶联的ADC往往表现出明显的异质性，这是因为序列中存在大量表面可及的赖氨酸残基，且该反应对任何给定位点均无特异性。这种偶联方式会得到一种连接子-药物基团以不同偶联水平连接到mAb的分布情况。

为评估整体药物分布和DAR，研究人员通常会对这些异质性ADC进行完整mAb LCMS分析。本应用简报展示了使用ACQUITY Premier UPLC与Xevo G3 QToF质谱仪的联用系统进行高质量、高灵敏度ADC分析的能力。使用合规的waters_connect信息学平台内的UNIFI应用程序自动采集和分析数据（图1）。



图1.使用ACQUITY Premier UPLC（BSM、FTN、TUV）与Xevo G3 QToF质谱仪的联用系统进行采集。使用waters_connect信息学平台内的UNIFI应用程序采集、处理和报告数据。

结果与讨论

在本应用简报中，我们使用PNGaseF酶处理曲妥珠单抗和Kadcyla（曲妥珠单抗-美坦新偶联物）ADC样品（去除N-糖基化修饰），以简化完整mAb和偶联mAb结构的反相LCMS分析。有关完整mAb RP-LCMS的方法详细信息，请参阅应用纪要[720007635ZH](#)³。本分析启用了智能数据捕获(IDC)功能，以实时降低背景噪音。

得到的合并原始谱图镜像图（图2）表明，糖基释放后的ADC（红色）与糖基释放后的未偶联曲妥珠单抗（蓝色）相比，复杂性明显更高。Xevo G3 QToF质谱仪只需500 ng柱上进样量即可检出这些复杂物质。利用UNIFI应用程序的完整蛋白质工作流程采集并分析数据。使用MaxEnt1去卷积和手动峰宽模型执行自动化数据处理，该模型使用手动测量的电荷态包络高端和低端峰的半峰全宽(FWHM)值。本例中测得的值均为0.8 m/z 。输入 m/z 范围为2200–3400，输出质量范围为140–155 kDa，输出分辨率为1.0 Da。最多执行25次MaxEnt1处理循环迭代以进行谱图去卷积。将得到的去卷积质量数（图3）与偶联0-10个连接子-药物的可变修饰进行质量比对，由于输出质谱的复杂性，50 ppm质量误差容差设置为平均预期质量精度的3倍。在去卷积谱图中检出了预期的DAR物质，以及额外的仅含连接子的系列。这些仅含连接子的物质为杂质，可通过本方法监测，但不计入DAR计算。如图4所示，观察到药物分布范围为0–9个偶联物质。

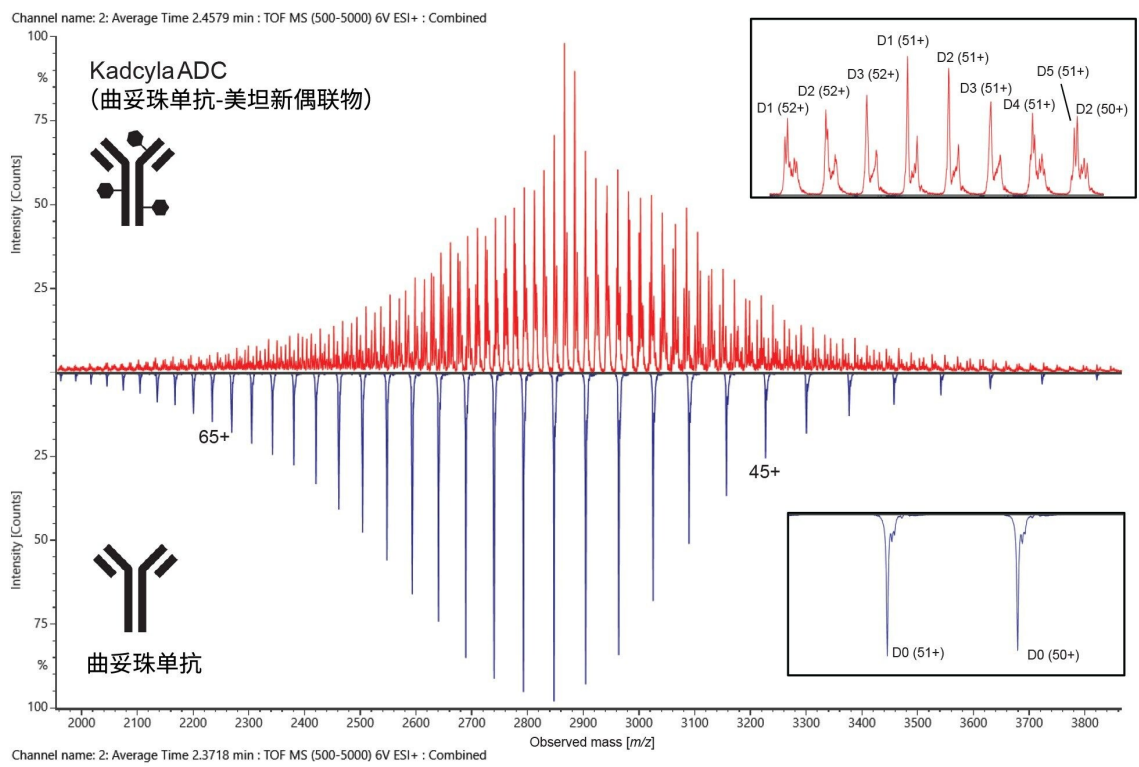


图2.糖基释放后的Kadcyła ADC (红色) 和未偶联曲妥珠单抗 (蓝色) 的组合原始 m/z 谱图镜像图，各自的右侧插图部分为部分放大图，以突出显示偶联样品的复杂性。

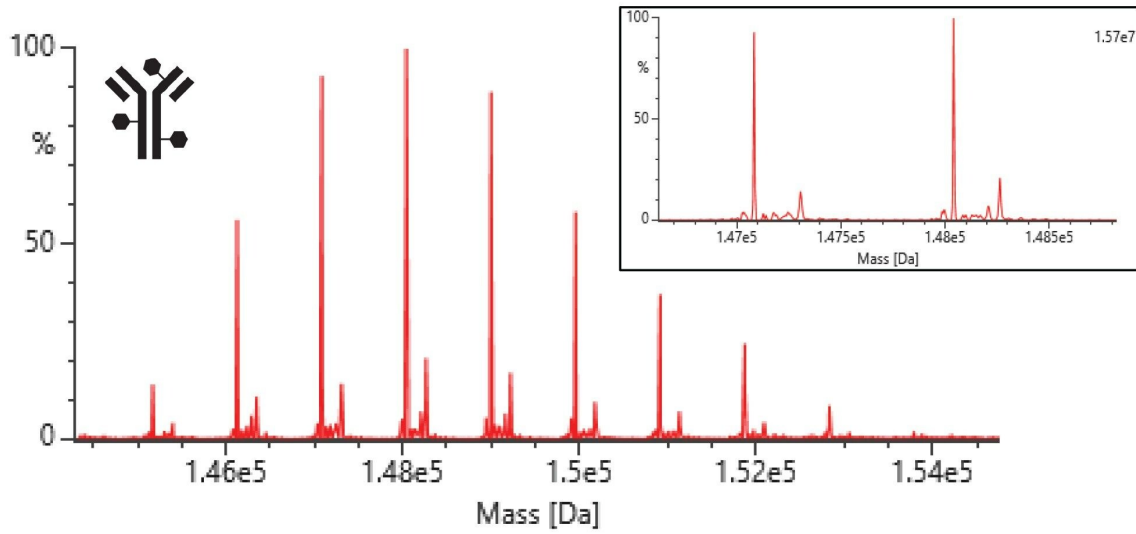


图3.糖基释放后的Kadcyla ADC的MaxEnt1去卷积谱图，插图为部分放大图，以突出显示微量物质的分辨率。

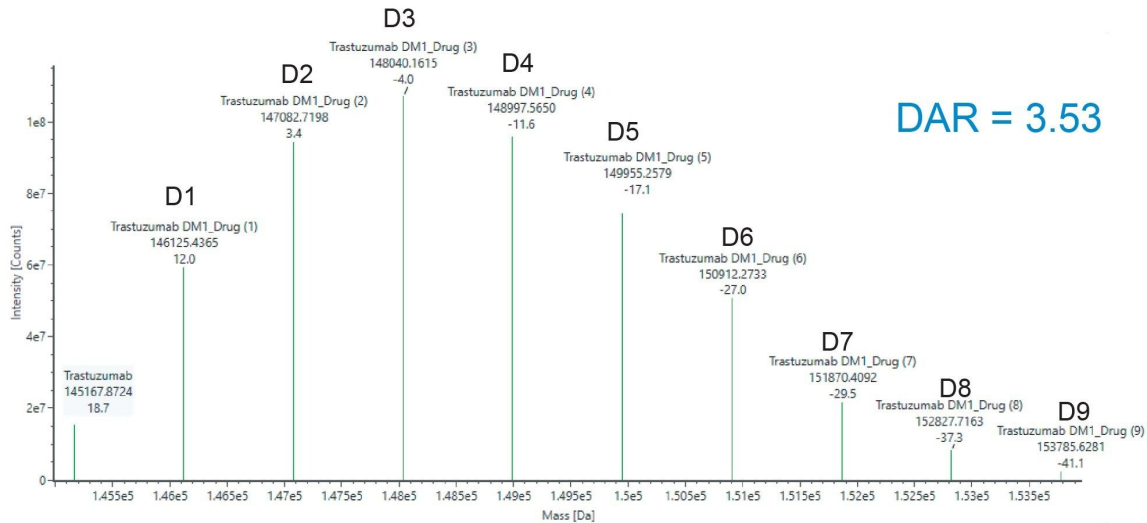


图4.Kadcyla ADC样品的去卷积质谱图（按峰面积确定质心），显示药物分布范围为0-9个药物，可用于DAR（药物抗体比）计算。图中显示了每种物质的质量精度值，该值远低于50 ppm的质量比对容差阈值。

DAR值是样品中未偶联和偶联物质响应的加权平均值，通常用作判断偶联过程一致性和ADC潜在效力的指标。通过使用自定义计算，可以在工作流程中实现DAR值的自动计算。UNIFI使用载药量和MS响应自动计算每种物质的加权平均值。该Kadcyla（曲妥珠单抗-美坦新偶联物）样品的DAR计算值为3.53，与之前发表的表征研究结果相当²。waters_connect部署的默认方法中包含一个自动执行DAR计算的模板，研究人员可利用该模板快速优化ADC DAR计算方法。

结论

ACQUITY Premier UPLC与Xevo G3 QToF质谱仪的联用系统为糖基释放后的Kadcyla（曲妥珠单抗-美坦新偶联物）ADC提供了高质量的完整mAb数据。UNIFI完整蛋白分析工作流程支持数据采集、自动化MaxEnt1去卷积、质量比对、DAR计算和报告，所有功能都在waters_connect信息学平台的合规架构内。Kadcyla是Genentech的商标。Xevo、waters_connect、UNIFI和ACQUITY是沃特世科技公司的商标。

参考资料

1. Gogia P, Ashraf H, Bhasin S, Xu Y. Antibody-Drug Conjugates: A Review of Approved Drugs and Their Clinical Level of Evidence. *Cancers (Basel)*.2023.15(15): 3886.
2. Chen L, Wang L, Shion H, Yu C, Yu YQ, Zhu L, Li M, Chen W, Gao K. In-Depth Structural Characterization of Kadcyla[®] (ado-trastuzumab emtansine) and its Biosimilar Candidate. *mAbs*.2016.8:7, 1210–1223.
3. Ippoliti S, Cornwell O, Reid L, Yu YQ, Harry E, Towers M. 使用Xevo G3 QToF系统通过完整和亚基RP-MS和IEX-UV-MS进行全面的生物类似药可比性评估.沃特世应用纪要 [720007635ZH](#).2022.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

Xevo G3 QToF <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3->

[qtof.html](#)>

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

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720008214ZH, 2024年1月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie](#)
[设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号