

抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/ 抗体比率 (DAR) 计算

利用自动化样品前处理和新型 DAR 计算器软件

应用简报

作者

Jing Chen 和 Steve Murphy
安捷伦科技公司

前言

抗体药物偶联物 (ADC) 是制药公司药物开发途径中快速发展的一类新型生物治疗药物。ADC 的制备方法是通过化学方法将具有生物活性的小分子药物与单克隆抗体相连。ADC 通过结合高效细胞毒性药物与靶标特异性抗体将细胞毒性药物直接送达病变组织，同时限制药物在非目标组织中的毒性。

药物/抗体比率 (DAR) 是抗体所连接药物数量的平均值，它是 ADC 的重要属性。由于低载药量会降低效力，而高载药量则会对药代动力学 (PK)¹ 和毒性产生负面影响，因此 DAR 值能够对药效产生影响。目前的偶联化学方法有赖氨酸侧链酰胺化或半胱氨酸链间二硫键还原，载药量通常为 0 ~ 8 个药物分子 (D0 ~ D8)/抗体。

LC/MS 是测定 ADC 的 DAR 和载药量分布的常用分析方法，也是鉴定不同种类载药 ADC 的关键方法。多数情况下可直接使用 LC/MS 分析完整 ADC 从而确定 DAR 值。而在需要有关轻链和重链的具体 DAR 信息时，则可能要在 LC/MS 分析前对 ADC 进行还原。此外，还可能需要在 LC/MS 分析前对 ADC 进行去糖基化以进一步降低谱图复杂性。

LC/MS 分析前的 ADC 样品前处理通常由手动完成，因此可能引入变异性并对通量产生限制。Agilent AssayMAP Bravo 是一款简单易用的自动化样品前处理系统，能够提高可重现性、通过减少手动操作时间节省人力、具有可扩展性（可同时运行 8 - 96 个样品）、简化人员间和站点间的方法转移，并能最大限度减少人为误差。AssayMAP Bravo 是一款适用于上述反应的强大自动化样品前处理平台。



Agilent Technologies

AssayMAP Bravo 自动化样品前处理平台与安捷伦 LC/MS 和 MassHunter/BioConfirm/DAR 计算器软件相结合, 能够针对 ADC DAR 计算提供可重现的便捷解决方案。本应用简报中采用 Agilent AssayMAP Bravo 平台对经/未经去糖基化的完整和还原态 ADC 进行了平行处理, 并采用安捷伦 LC/MS 对其进行分析, 随后通过安捷伦 DAR 计算器确定 DAR。

实验部分

材料

快速 PNGase F 购自 New England Biolabs (Ipswich, MA)。Eppendorf 96 孔 PCR 板购自 Eppendorf (Hauppauge, NY); Tris-盐酸缓冲液购自 EMD Millipore (Billerica, MA)。其余全部化学品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

使用 Agilent AssayMAP Bravo 进行的溶液内还原和去糖基化

用去离子 (DI) 水将冻干 ADC 复溶至 5 mg/mL 后分装, 使用前置于 -80°C 下储存。所有试剂转移均由 Agilent AssayMAP Bravo 平台 (Santa Clara, CA) 通过蛋白质样品前处理工作台软件完成。将 5 μL ADC 加入 96 孔 Eppendorf PCR 板前 4 列的各孔中 (位置 A1 - H4)。然后向样品中加入 10 μL 10 mM Tris 缓冲液 (pH = 7.5) (位置 A1 - H2) 或含有 35 mM DTT 的 10 mM Tris 缓冲液 (pH = 7.5) (位置 A3 - H4)。最后再向样品中加入 20 μL 10 mM Tris 缓冲液 (pH = 7.5) (位置 A1 - H1 和 A3 - H3) 或含有快速 PNGase F (稀释 40 倍) 的 10 mM Tris 缓冲液 (pH = 7.5) (位置 A2 - H2 和 A4 - H4)。使用 Agilent PlateLoc 热封板膜 (Santa Clara, CA) 密封样品板, 然后在 50°C 下温育 10 分钟。

LC/MS 分析

LC/MS 分析采用配备安捷伦双喷射电喷雾离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Santa Clara, CA) 结合 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统 (Waldbronn, Germany)。表 1 和表 2 为所使用的 LC/MS 参数。每次运行的进样量为 1 μg 。

数据分析

利用 Agilent MassHunter 定量分析软件 (Version B.07.00, Build 7.0.7024.0) 以及采用最大熵解卷积算法的 BioConfirm 对由 LC/MS 获得的原始数据进行解卷积。解卷积参数设置如下:

- 对于完整 ADC, 将质量范围设定为 140000 - 160000 Da, 质谱精度为 1 Da
- 对于还原态 ADC, 将质量范围设定为 20000 - 60000 Da, 质谱精度为 0.1 Da
- 对于完整和还原态 ADC, 采用在 25% 的最大峰高处计算平均质量数

其余参数均采用默认设置。解卷积质谱图将以 .csv 文件格式导出并被导入安捷伦 DAR 计算器。在输入/选择 D0 质量数和药物/连接物质量数后, DAR 计算器将自动选择、标注并整合具有不同载药量的 ADC 质谱峰组, 然后计算平均 DAR 并生成峰列表。

结果与讨论

如需测定示例中赖氨酸偶联 ADC 的 DAR，则需采用 AssayMAP Bravo 平台在完整糖基化、完整去糖基化、还原态糖基化以及还原态去糖基化四种不同条件下对 ADC 进行前处理（每种条件下 $n = 8$ ）。将配备 2.1 mm 内径 1000Å PLRP-S 液相色谱柱的 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与 6550 Q-TOF 联用进行分析，然后使用 Agilent MassHunter/BioConfirm/DAR 计算器软件进行数据分析（图 1）。

表 1. 液相色谱参数

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统		
参数	完整	还原态
色谱柱	Agilent PLRP-S, 1000 Å 2.1 × 150 mm, 8 μm	Agilent PLRP-S, 1000 Å 2.1 × 150 mm, 8 μm
样品恒温箱	5 °C	5 °C
流动相 A	含 0.1% 甲酸的水溶液	含 0.1% 甲酸的水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈溶液	含 0.1% 甲酸的乙腈溶液
梯度	0 - 5 s 时 B 为 20%， 5 - 10 min 内 B 由 20% 升至 90%	0 - 5 min 时 B 为 20% 5 - 6 min 内 B 由 20% 升至 75% 6 - 10 min 内 B 由 75% 升至 90%
后运行时间	无	无
柱温	80 °C	80 °C
流速	0.4 mL/min	0.4 mL/min

表 2. 质谱仪参数

Agilent 6550 Q-TOF LC/MS 系统		
参数	完整	还原态
离子模式	正离子模式	正离子模式
离子源	安捷伦双喷射流	安捷伦双喷射流
干燥气温度	290 °C	290 °C
干燥气流速	14 L/min	14 L/min
鞘气温度	400 °C	400 °C
鞘气流速	12 L/min	12 L/min
雾化器	40 psi	40 psi
毛细管电压	4500 V	4500 V
喷嘴电压	1500 V	1500 V
碎裂电压	250 V	250 V
Oct RF Vpp	750 V	750 V
采集参数	高 (10000 m/z) 质量数范围， 扩展的质量数范围 (2 GHz)， 仅质谱模式， 质量数范围 1800 - 6000 m/z	高 (10000 m/z) 质量数范围， 扩展的质量数范围 (2 GHz)， 仅质谱模式， 质量数范围 800 - 4000 m/z

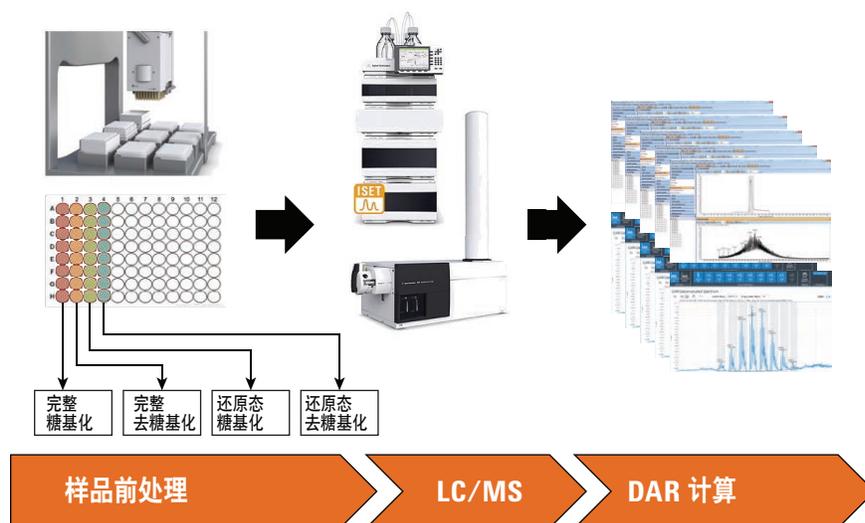


图 1. ADC DAR 的计算工作流程

图 2 所示为完整糖基化 ADC (图 2 A - C) 和完整去糖基化 ADC (图 2 D - F) 总离子流色谱图 (TIC)、提取质谱图和解卷积质谱图的 8 次分析叠加图。完整糖基化和完整去糖基化 ADC 的洗脱时间均小于 1 min, 质

量范围集中在 3000 Da 左右, 电荷态介于 +35 - +66。完整糖基化 ADC 得到 9 个峰组, 质量数匹配 D0 - D8。各峰组中 4 个主峰所对应的糖型为 G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F 或 G0F/G2F, 以及 G1F/G2F。完

整去糖基化 ADC 得到 10 个峰组, 质量数匹配 D0 - D9。糖基化 ADC 样品中的所有糖型均已消除, 质谱峰也相应得到了简化。与完整糖基化 ADC 相比, 峰强度增加了两倍。

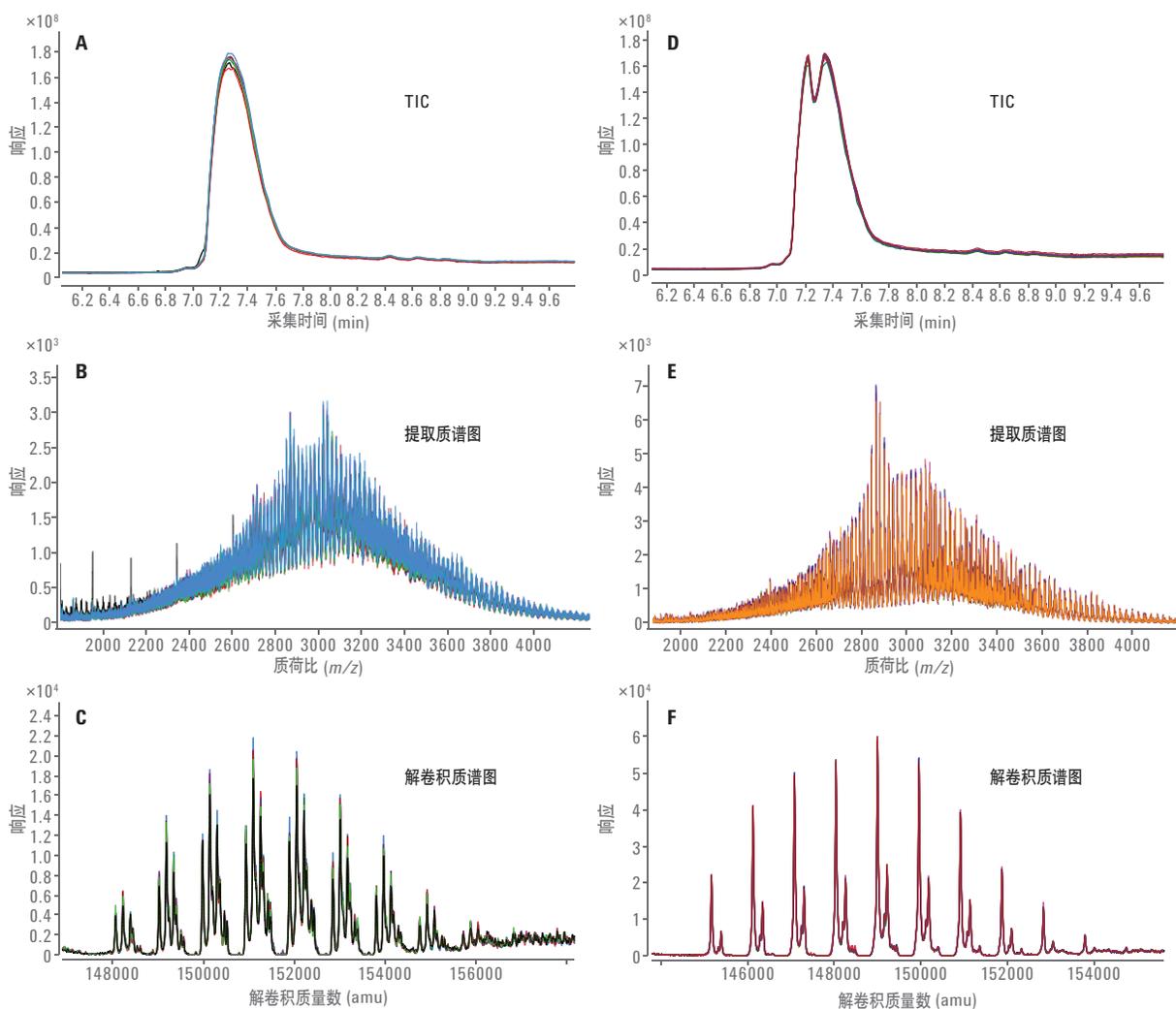


图 2. 完整糖基化 ADC (图 A - C) 和完整去糖基化 ADC (图 D - F) 的总离子流色谱图、提取质谱图与解卷积质谱图

然后通过 Agilent MassHunter DAR 计算器分析解卷积质谱图。图 3 所示为完整糖基化 ADC 的代表性 DAR 计算结果图。根据 8 次重复分析结果计算出的完整糖基化 ADC 与完整去糖基化 ADC 的 DAR 值分别为 3.6 (%CV = 0) 和 3.88 (%CV = 1.1)。

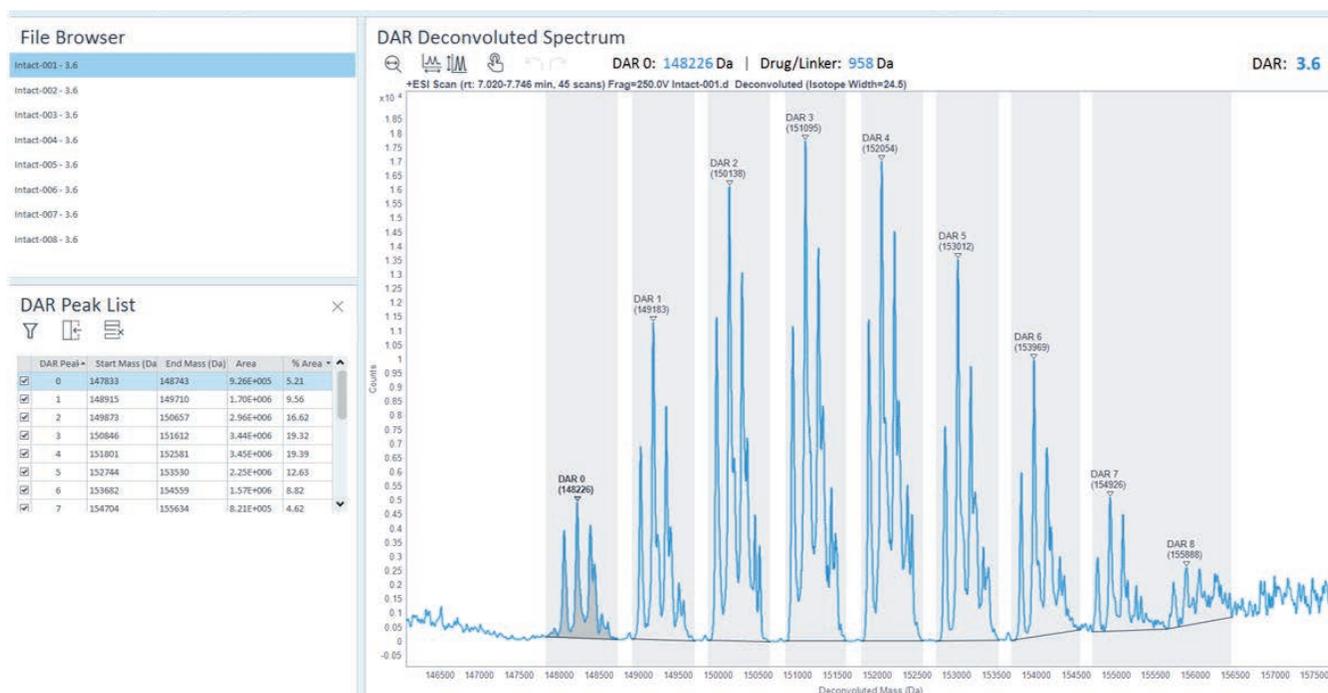


图 3. 完整糖基化 ADC 的代表性 DAR 计算结果

图 4 所示为还原态糖基化 ADC (图 4 A - D) 和还原态去糖基化 ADC (图 4 E - H) 的 TIC、提取质谱图和解卷积质谱图的 8 次分析叠加图。还原态糖基化和还原态去糖基化 ADC 的洗脱时间均小于 1 min, 质谱范围集中在 1400 Da 左右, 轻链电荷态介于 +6 - +27, 重链电荷态介于 +13 - +53。糖基化和去糖基化的轻链 ADC 均得到了 4 个峰组 (D0 - D3)。两种条件下的信号强度相近。

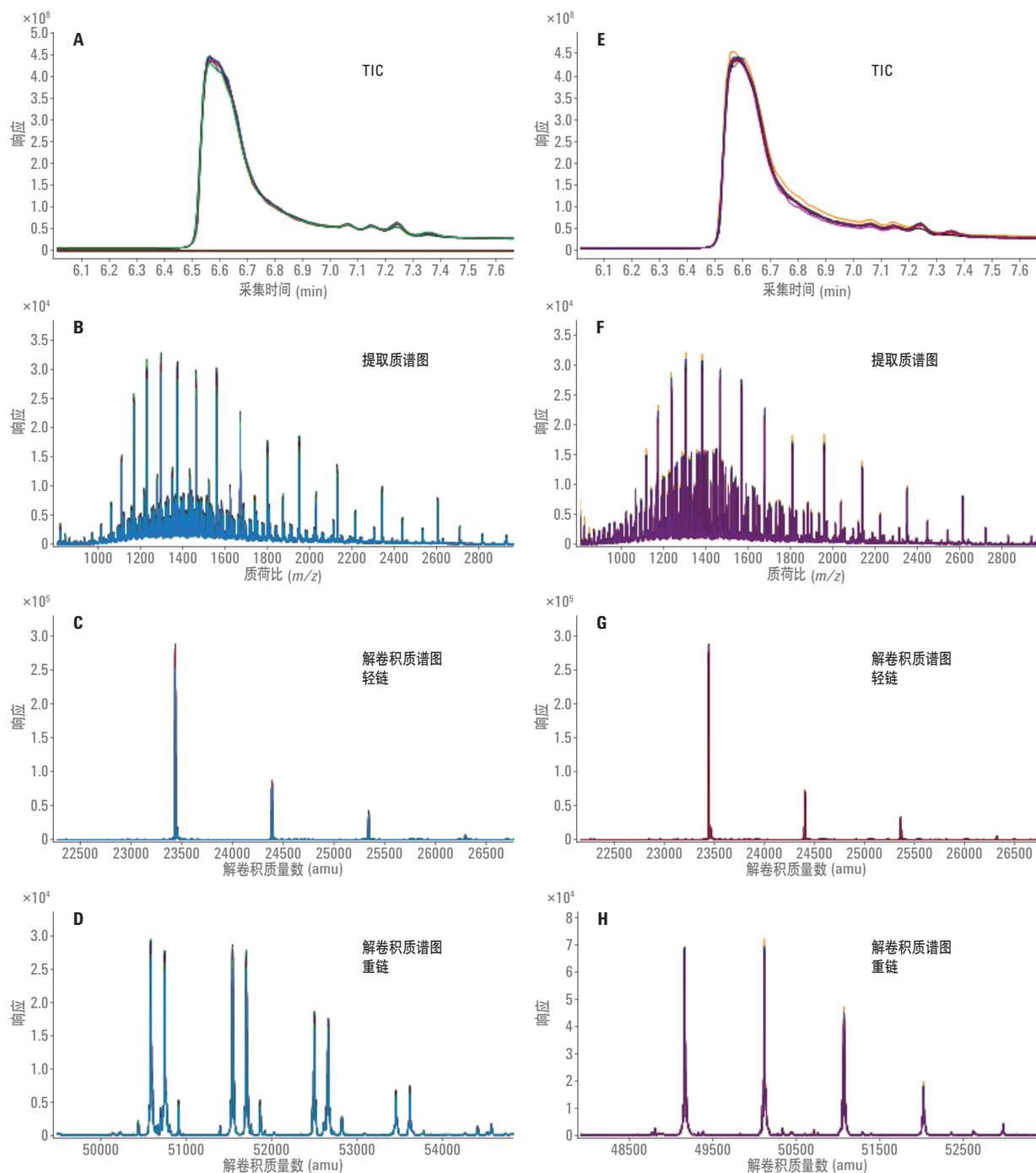


图 4. 还原态糖基化 ADC (图 A - D) 和还原态去糖基化 ADC (图 E - H) 的 TIC、提取质谱图以及轻链和重链的解卷积质谱图

糖基化和去糖基化的重链 ADC 均得到 5 个峰组 (D0 - D4)。各峰组中, 糖基化 ADC 所得的四个主峰对应的糖型分别为 G0、G0F、G1F 和 G2F。去糖基化后, 各峰组中仅显示出一个代表完全去糖基化 ADC 的主峰; 另外, 各峰组中还存在一个代表具有额外连接物的

ADC + 的小峰。与还原态糖基化 ADC 相比, 峰强度同样也增加了两倍。导出的 .csv 文件将通过安捷伦 DAR 计算器进行处理。图 5 所示为 DAR 计算器针对还原态糖基化 ADC 得出的代表性报告。根据 8 次重复分析得出的还原态糖基化 ADC 和还原态去糖基化

ADC 的 DAR 值分别为 3.23 (%CV = 2.2) 和 3.21 (%CV = 2.6)。通过还原态 ADC 计算得出的 DAR 值与通过完整 ADC 得到的结果稍有不同, 这与先前报道一致²。

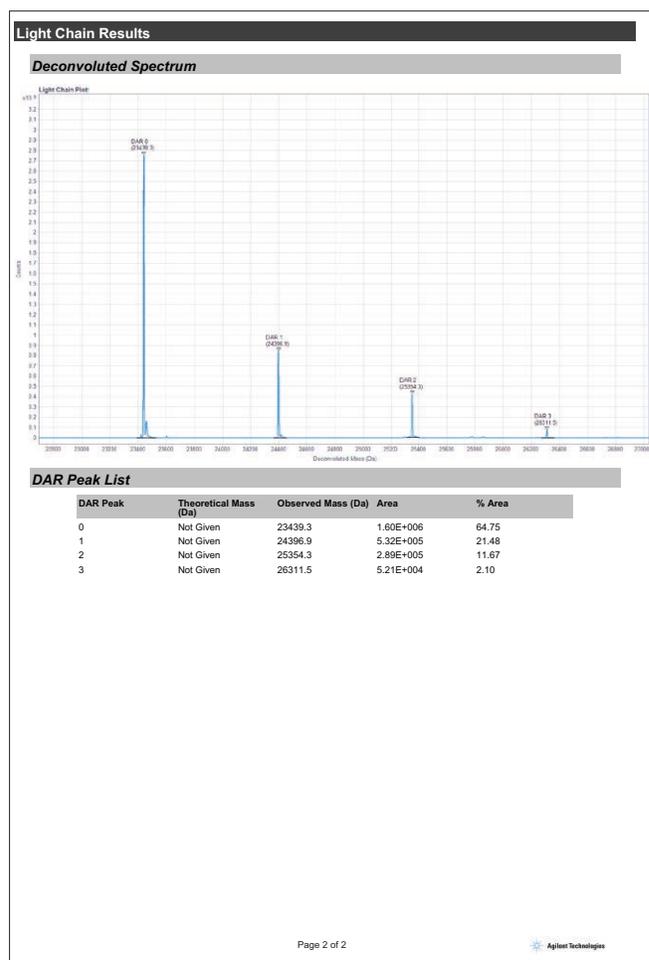
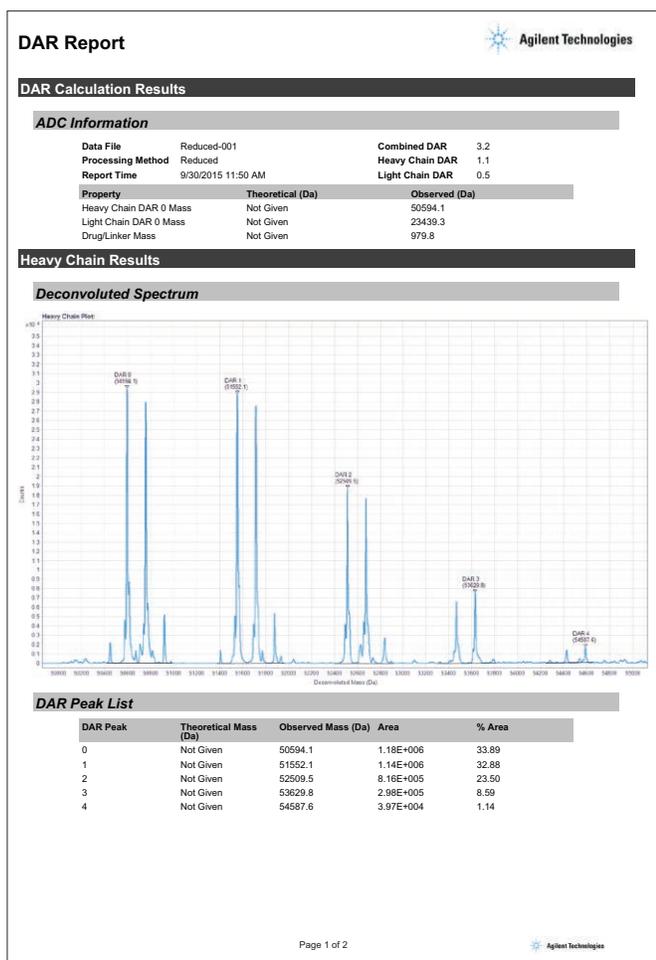


图 5. 安捷伦 DAR 计算器得出的还原态 ADC 代表性报告

结论

将快速 PNGase F 与 AssayMAP Bravo 自动化样品前处理平台相结合, 可实现高通量快速去糖基化 (用时少于 1 小时)。界面友好的蛋白质样品前处理工作台控制软件与 AssayMAP Bravo 平台的精确度使 ADC 样品轻松实现可重现的还原与去糖基化, 便于进行 DAR 计算。Agilent 1290 Infinity UHPLC/6550 Q-TOF 质谱仪能够生成高分辨率精确质量谱图以便通过 MassHunter/BioConfirm/DAR 计算器软件实现直接、准确的 DAR 计算。Agilent PLRP-S 色谱柱以甲酸为流动相可获得优异峰形, 从而进一步提高灵敏度。安捷伦的自动化平台、液质联用系统、软件包与消耗品提供了能够快速、轻松、准确地获得可重现 ADC DAR 计算结果的完整解决方案。

参考文献

1. Perez, H. L; *et al.* Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discovery Today* **2014**, 19(7), p.869-81.
2. Basa, L. Chapter: Drug-to-Antibody Ratio (DAR) and Drug Load Distribution by LC-ESI-MS. Antibody Drug Conjugates. *Methods in Molecular Biology*; L. Dury (Ed.); Humana Press: New York, 2013; 1045, pp 285-293.

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com/chem/bioconfirm

仅限研究使用。不可用作诊断方法。

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2015
2015 年 10 月 5 日, 中国出版
5991-6263CHCN



Agilent Technologies