



测定血清纯化所得的抗体药物偶联物的 药物/抗体比率

应用自动亲和纯化、LC/MS 分析和新型 DAR 计算软件

应用简报

作者

Jing Chen、Michael Bovee 和
Steve Murphy
安捷伦科技公司

前言

抗体药物偶联物 (ADC) 是一类新兴生物治疗药物，旨在通过将药物与单克隆抗体相连实现靶向给药。与小分子药物不同，ADC 不是单分子实体，而是一类异质性的抗体，每种抗体所携带的药物数量以及经历的翻译后修饰都各不相同。药物/抗体比率 (DAR) 是指 ADC 偶联的药物的平均数量。DAR 是 ADC 开发过程中需要优化和密切监测的关键质量属性，因为它将影响疗效和毒性^{1,2}。

由于药物的释放，在血液循环中 ADC 的 DAR 将随时间发生变化^{1,3}。因此，制定一套测定药代动力学 (PK) 研究样品中 ADC DAR 的稳定解决方案非常关键。要确定 ADC DAR，首先必须纯化血清中的 ADC，然后使用 LC/MS 对其进行分析。通常该工作流程中的样品前处理和数据分析环节需耗费大量人力，因此易受变异性和人为误差影响。

本应用简报介绍了一种用于测定血清样品中 ADC DAR 的解决方案，该方案采用 Agilent AssayMAP Bravo 平台对 ADC 进行自动亲和纯化；将 Agilent 1290 Infinity UHPLC 与 Agilent 6550 Q-TOF 质谱仪联用，用于采集准确的完整蛋白分子量数据；并利用 Agilent MassHunter BioConfirm 和 DAR 计算器软件确定 ADC 质量和 DAR。该工作流程可节省人力、降低变异性以及减少产生与 ADC DAR 测定相关的人为误差的可能性，而且仅需很少的工作量即可扩展样品处理量。



Agilent Technologies

实验部分

材料

重组人 HER2 胞外区 (ECD) 购自 ACRO Biosystems (美国特拉华州纽瓦克)。EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin 和 Pierce 生物素定量试剂盒购自赛默飞世尔科技公司 (美国纽约州格兰德岛)。大鼠血清购自 BioreclamationIVT (美国纽约州希克斯维尔)。采用安捷伦科技公司 (加利福尼亚州圣克拉拉市) 的 AssayMAP 链霉亲和素小柱 (SA-W)。其他所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (美国密苏里州圣路易斯)。

ADC 抗原的生物素化和固定化

采用 EZ-Link Sulfo-NHS-LC 生物素试剂盒, 按照制造商提供的操作说明对 HER2 ECD 进行生物素化。然后使用 Pierce 生物素定量试剂盒, 按照制造商提供的操作说明测定生物素与 HER2 ECD 的摩尔比, 所得结果为 9.0。使用由固定化应用控制的 Agilent AssayMAP Bravo 在每个 AssayMAP SA-W 小柱上固定 2 μg 生物素化的 HER2 ECD。简而言之, 先使用 1% 甲酸对 SA-W 小柱 (微量色谱柱, 其中装填有约 5 μL 与链霉亲和素共价结合的填充树脂) 进行灌注和平衡, 然后采用固定化应用中 “Prime, Equilibrate, and Internal Cartridge Wash 1” (灌注、平衡和内部小柱清洗 1) 的默认设置, 使用 HEPES 缓冲液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl, pH 7.4) 进行清洗。取消固定化应用中的

所有其他步骤。使用 1% 甲酸进行灌注和平衡可排出小柱内夹带的空气, 同时还能严格地清洗小柱, 去除其中的链霉亲和素单体, 避免它们在最终洗脱步骤的低 pH 条件下从固相载体上解离。通过清洗步骤, 我们得到了用于结合生物素化抗原的小柱。接下来, 以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速向每个 SA-W 小柱上样 100 μL 含 2 μg 生物素化抗原的 HEPES 缓冲液, 然后使用由固定化应用控制的 AssayMAP Bravo, 采用 HEPES 缓冲液执行一次清洗。本实验采用了 “Sample Load and Internal Cartridge Wash 1” (上样和内部小柱清洗 1) 的默认设置, 取消了固定化应用中的所有其他步骤。接下来, 将 2 μg 生物素化的 ADC 抗原偶联到每个 SA-W 小柱上, 从而得到 ADC 亲和小柱。

ADC 亲和纯化

用去离子 (DI) 水将商购冻干 ADC 复溶至 1 mg/mL 后分装, 使用前置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 下储存。将 ADC 加入大鼠血清后进行连续稀释, 制备浓度分别为 20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ADC 溶液。将未加入 ADC 的大鼠血清作为对照。在将上述样品上样至 ADC 亲和小柱之前, 用 HEPES 缓冲液按 1:1 的比例对其进行稀释。亲和纯化步骤通过由亲和纯化应用控制的 AssayMAP Bravo 执行。简而言之, 该过程是以 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速将 100 μL 含 ADC 的大鼠血清稀释液上样至各 ADC 亲和小柱 (每个 ADC 浓度 $n=4$), 然后用四种清洗液 (各 50 μL , 分别为:

HEPES 缓冲液、含 1 M NaCl 的 HEPES 缓冲液、0.003% 甲酸和水) 以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速进行四次清洗。最后, 用 15 μL 1% 甲酸将各小柱中纯化后的 ADC 洗脱至体积固定为 15 μL 的 0.5% 氢氧化铵溶液中, 以中和经纯化的 ADC。

LC/MS 分析

使用配备安捷伦双喷射流 ESI 离子源的 Agilent iFunnel 精确质量 6550 Q-TOF (加利福尼亚州圣克拉拉市) 与 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统 (加利福尼亚州圣克拉拉市) 联用进行 LC/MS 分析。表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。从所有血清样品纯化所得的 ADC 中取 3 μL (总样品体积的十分之一) 进样, 仅进行质谱分析; 另外, 分别从 ADC 浓度为 2.5、1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品纯化所得的 ADC 中取 10 μL (总样品体积的三分之一) 进样, 仅进行质谱分析。进样 100 ng 商购 ADC ($n=4$) 作为对照。

数据分析

使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件分析原始数据文件。提取 2.2 - 3.2 min 的谱图并计算其平均值, 然后进行解卷积处理。接下来, 采用 Agilent MassHunter DAR 计算器和解卷积质谱图计算各载药量下的 ADC DAR 和 ADC 百分比。表 3 列出了解卷积参数。

表 1. 液相色谱参数

参数	Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统	
色谱柱	Agilent PLRP-S 1000Å 8 µm 150 × 2.1 mm (PL1912-3802)	
样品恒温	5 °C	
流动相 A	0.1% 甲酸的水溶液	
流动相 B	0.1% 甲酸的乙腈溶液	
梯度 (分段)	时间 (min)	%B
	0 – 0.5	25
	0.5 – 1.5	25 – 35.5
	1.5 – 3.5	35.5
	3.5 – 5.0	35.5 – 50
	5.0 – 5.5	50 – 25
	5.5 – 7.5	25
停止时间	7.5 min	
柱温	80 °C	
流速	0.4 mL/min	

表 2. 质谱参数

参数	Agilent 6550 Q-TOF 质谱仪
电离模式	正离子模式
离子源	安捷伦双喷射流离子源
干燥气温度	225 °C
干燥气流速	14 L/min
鞘气温度	325 °C
鞘气流速	12 L/min
雾化器	40 psi
毛细管电压	4500 V
喷嘴	1500 V
碎裂电压	250 V
Oct RF Vpp	750 V
采集参数 MS 模式	高 (10000 m/z) 质量范围, 扩展质量范围 (2 GHz), 仅 MS 模式, 质量范围 1000 – 4500 m/z 。

表 3. MassHunter BioConfirm 参数

参数	Agilent MassHunter BioConfirm 解卷积 (MS): 蛋白质
解卷积算法	最大熵
解卷积设置	质量范围: 140 – 160 KDa 质谱精度: 1.0 Da
使用受限的 m/z 范围	2000 – 4500 m/z
基线	扣除基线 基线因子 3.50
加合物	质子
同位素峰宽	自动

结果与讨论

我们为血清样品中 ADC DAR 的测定成功开发出了一套解决方案。该解决方案包括：在 AssayMAP Bravo 平台上使用 ADC 亲和小柱对血清中的 ADC 进行自动亲和纯化；使用 1290 Infinity UHPLC 和 6550 Q-TOF 质谱仪采集完整 ADC 的质谱数据；使用 Agilent MassHunter BioConfirm 对质谱图进行解卷积处理，以及使用 Agilent MassHunter DAR 计算器计算 DAR (图 1)。

该工作流程的第一个步骤是对血清中的 ADC 进行自动纯化。为执行该步骤，我们将生物素化的 ADC 抗原固定到 AssayMAP SA-W 小柱上，制备了定制 AssayMAP 亲和小柱，该操作采用由固定化应用（专为定制亲和小柱而设计）控制的 AssayMAP Bravo 执行。每个小柱上固定 2 μg 抗原，超过本应用简报中将要纯化的最大抗体摩尔量近四倍。优化研究的结果表明，在本应用简报所采用的流速条件下，过量四倍摩尔量的抗原足以捕获目标 ADC（相关数据未显示）。流速与摩尔量过量水平相关，这两个参数均可根据具体实验设计更改。应注意的是，所用抗原量并非受 SA-W 容量限制（针对本实验中的特定抗原，容量约为 75 μg ），而应该以最大限度减少实验中的抗原消耗量为选择标准。



图 1. ADC DAR 测定工作流程

将商购 ADC 加入大鼠血清，使其浓度达到 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然后使用 ADC 亲和小柱以及由亲和纯化应用控制的 AssayMAP Bravo 进行亲和纯化。假定回收率为 100%，对 100 ng 商购 ADC (图 2A) 和 100 ng 血清样品亲和纯化 ADC (图 2B) 进行 LC/MS 分析，2.2 – 3.2 min 之间的主峰即代表洗脱的 ADC。在亲和纯化 ADC 的分析结果中，1 – 1.5 min 之间出现的其他小峰代表残留的盐类，4.7 – 5.5 min 之间的小峰则代表大鼠血清中共纯化的蛋白，其质量数范围集中在 1500 m/z 左右。通过微调过的液相色谱梯度可将这些残留的共纯化蛋白彻底分离，因此它们不会对 ADC 离子化造成影响。图 2C 和 2D 表

明，两种 ADC 在 ADC 洗脱窗口中得到的提取质谱图几乎完全相同。经解卷积处理后，在商购 ADC (图 2E) 和亲和纯化 ADC (图 2F) 的解卷积质谱图中均可观察到七个峰组，它们所代表的 DAR 值分别为 0 – 7，其中每个峰组中有四个主峰，代表不同糖型的 ADC (即 G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F 或 G0F/G2F，以及 G1F/G2F)。我们使用 MassHunter DAR 计算器，利用七个峰组下的峰面积计算了 DAR。两种 ADC 计算所得的 DAR 值相似 (DAR = 3.5)。上述结果表明 AssayMAP Bravo 平台的自动 ADC 纯化功能可达到高回收率和高纯度。

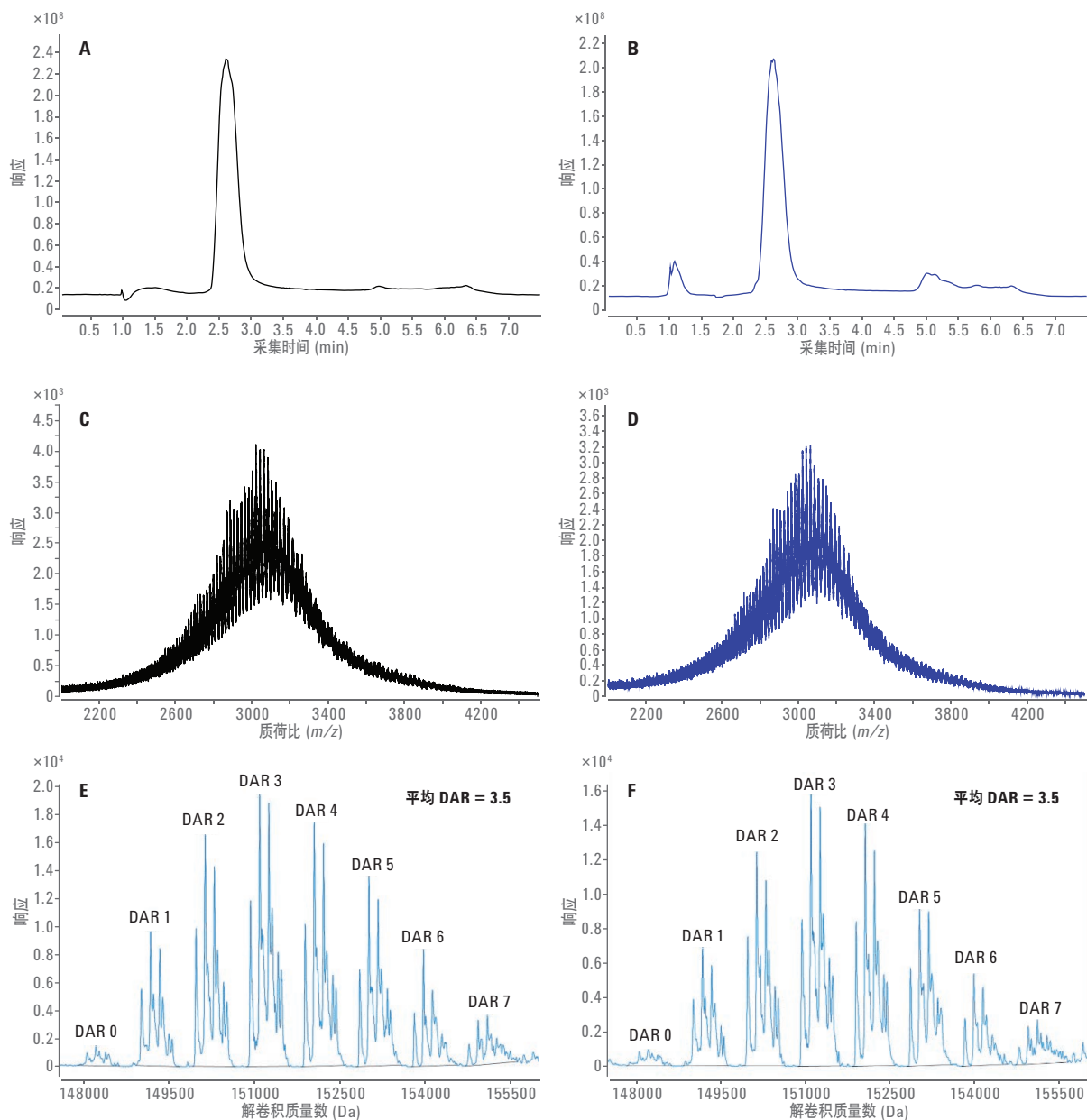


图 2. 商购 ADC 以及亲和纯化获 ADC 的代表性总离子流色谱图 (TIC)、提取质谱图和解卷积质谱图。A) 商购 ADC 的 TIC。B) 亲和纯化 ADC 的 TIC。C) 商购 ADC 的提取质谱图。D) 亲和纯化 ADC 的提取质谱图。E) 商购 ADC 的解卷积质谱图 (示出了 DAR 计算结果)。F) 亲和纯化 ADC 的解卷积质谱图 (示出了 DAR 计算结果)

为评估该工作流程对 PK 研究的适用性，我们将商购 ADC 加入大鼠血清并连续稀释至 20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，然后按上述操作进行纯化。另外，将不含 ADC 的大鼠血清样品作为对照。上样至各小柱的血清样品中所含的 ADC 量分别为 1000、500、250、125、62.5、31.25 和 0 ng。将每个纯化样品洗脱液的十分之一用于质谱分析进样，对应的 ADC 上样量分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.125 和 0 ng（假设回收率为 100%）。图 3 所示为 ADC 质量数范围内 (2000 – 4500 m/z) 的提取离子色谱图 (EIC)。对 2.2 - 3.2 min 之间的峰进行了积分，并计算了各 ADC 浓度的变异系数 (CV)。在 ADC 浓度高于 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品中，纯化 ADC 的重现性非常出色，CV 均低于 10%。请注意，对照组亲和纯化血清样品 (不含 ADC) 的 EIC 基本为直线，这表明 ADC 洗脱窗口中不存在共纯化蛋白。这种纯化特异性得益于 SA-W 小柱极低的非特异性结合性能、ADC 针对抗原的高度特异性以及经过微调的清洗条件。该工作流程无需采用表面活性剂去除共纯化蛋白。

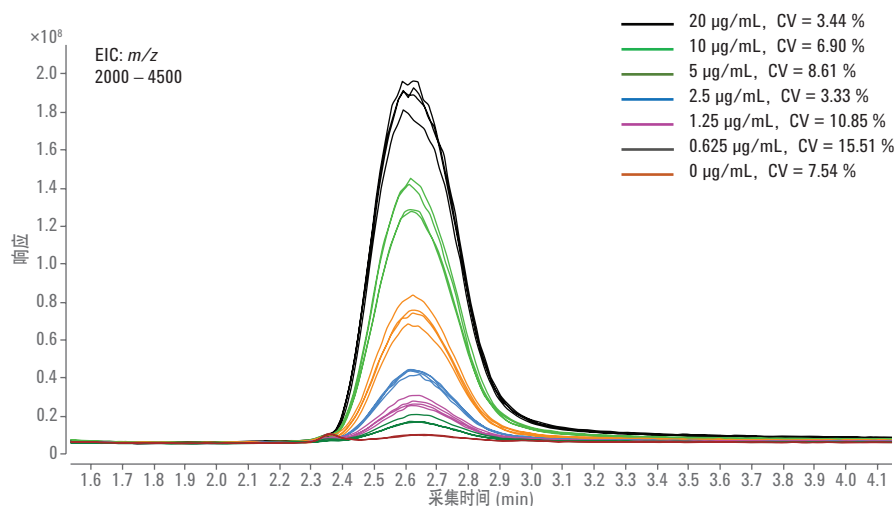


图 3. 不同血清浓度的亲和纯化 ADC 的提取离子色谱图 (EIC)。使用 ADC 亲和小柱和 Agilent AssayMAP Bravo 分别对 50 μL 含 20、10、5、2.5、1.25、0.625 和 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ADC 的大鼠血清 (各浓度下 $n = 4$) 进行亲和纯化。将纯化血清样品所得的 ADC 的十分之一用于各亲和纯化样品的质谱分析进样。提取出 EIC (2000 – 4500 m/z)。对 2.2 - 3.2 min 之间的峰进行积分，并计算各 ADC 浓度样品的变异系数 (CV)

图 4 所示为分析 ADC 浓度为 20、10、5、2.5、1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的大鼠血清亲和纯化 ADC 样品得到的解卷积质谱图及其相应的 DAR。对于纯化 ADC 浓度为 20、10 和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品所得的 ADC，我们采用的是 10% 的上样量，由于信噪比 (S/N) 会随着所分析的 ADC 量下降而降低，因此对于纯化 ADC 浓度为 2.5、1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品所得的 ADC，我们采用了 33% 的上样量。这样可使得低 ADC 浓度的样品也能得到高质量的解卷积质谱图。实验采用的所有 ADC 浓度条件均获得了一致的解卷积质谱图和 DAR (图 4，表 4)。对于纯化自 ADC 浓度为 20、10、5 和 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品的各 ADC 样品而言，不同载药

量 (D0-D7) ADC 的百分比相当，并且该百分比非常接近直接对商购 ADC 进行质谱分析所得结果。但对于纯化自 ADC 浓度为 1.25 和 0.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的血清样品的各 ADC 样品而言，不同载药量 ADC 的百分比与商购 ADC 分析结果的一致性稍差 (表 4，图 5)。因此，为了提高谱图质量以及减少工作流程的检测/定量步骤所受的限制，可适当提高执行 LC/MS 分析时的洗脱液进样百分比。此外，还可以在洗脱 ADC 之前进行去糖基化处理，以简化谱图并改善信号。上述结果表明，本应用简报所展示工作流程能够在血清 ADC 浓度较低的条件可重现地测定不同载药量的 ADC DAR 和 ADC 百分比。

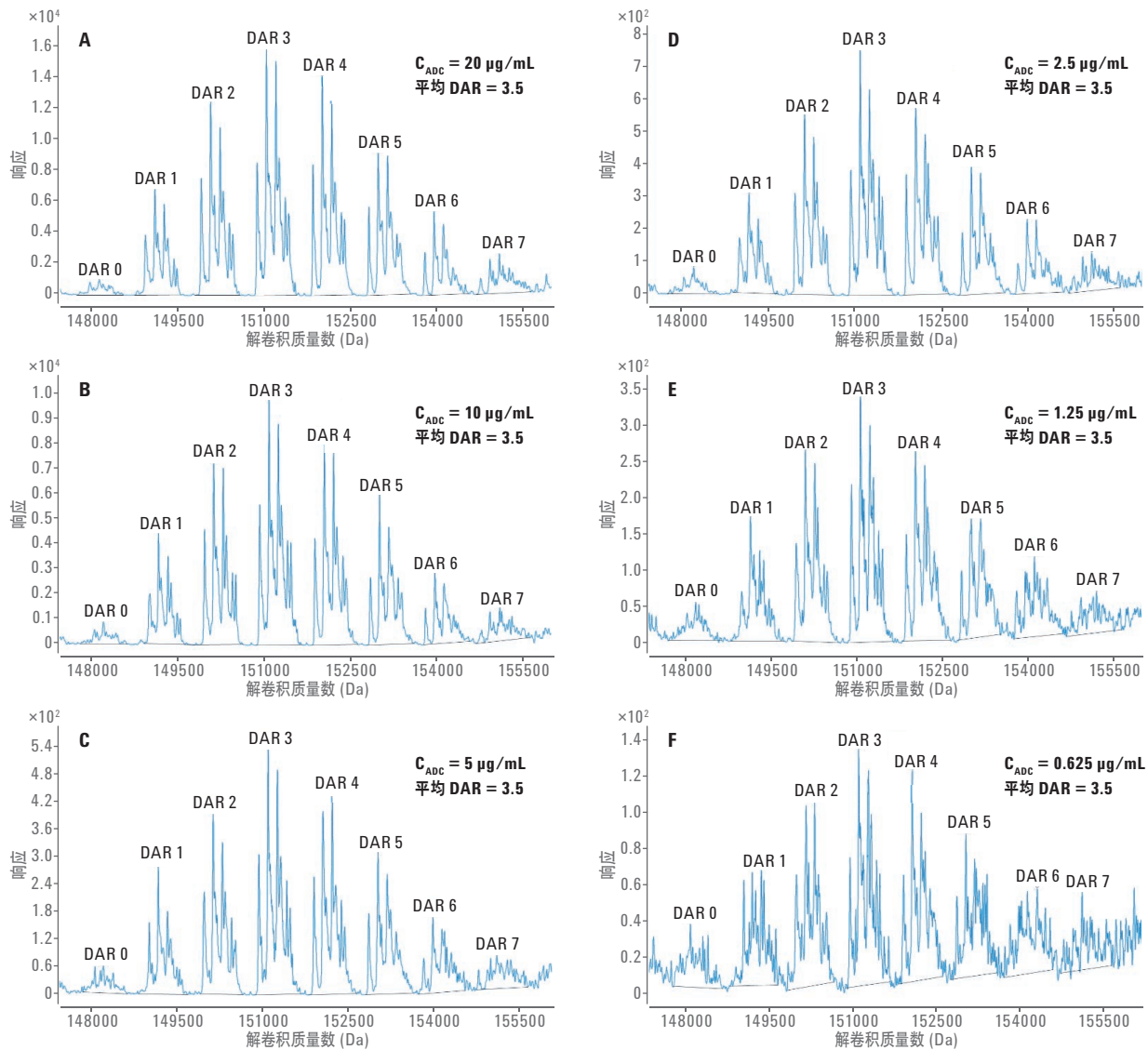


图 4. 大鼠血清亲和纯化 ADC 样品的代表性解卷积质谱图和 DAR。使用 ADC 亲和小柱和 Agilent AssayMAP Bravo 分别对 50 μL 含 20、10、5、2.5、1.25、0.625 和 0 $\mu\text{g/mL}$ ADC 的大鼠血清 (各浓度下 $n = 4$) 进行亲和纯化。对于纯化 ADC 浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ (A)、10 $\mu\text{g/mL}$ (B) 和 5 $\mu\text{g/mL}$ (C) 的血清样品得到的 ADC, 取 10% 用于质谱分析进样; 对于纯化 ADC 浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (D)、1.25 $\mu\text{g/mL}$ (E) 和 0.625 $\mu\text{g/mL}$ (F) 的血清样品得到的 ADC, 取 33% 用于质谱分析进样。 C_{ADC} : 大鼠血清中 ADC 的浓度

表 4. 各载药量条件下的 DAR 和 ADC 百分比

样品	DAR	各载药量下的 ADC 百分比 (%)							
		DAR 0	DAR 1	DAR 2	DAR 3	DAR 4	DAR 5	DAR 6	DAR 7
商购 (n = 4)	3.50±0.02	2.11±0.75	9.9±1.08	17.35±0.33	22.82±1.69	19.88±1.81	15.35±0.47	7.97±0.93	4.65±0.77
亲和纯化自 ADC 浓度为 20 µg/mL 的 血清样品 (n = 4)	3.49±0.02	2.4±0.68	9.45±1.05	17.32±0.25	23.32±1.45	20.17±1.63	14.97±0.59	7.58±0.69	4.8±0.88
亲和纯化自 ADC 浓度为 10 µg/mL 的 血清样品 (n = 4)	3.46±0.02	2.54±0.19	9.72±0.24	17.38±0.18	23.87±0.47	19.73±0.13	14.36±0.13	7.47±0.24	4.95±0.38
亲和纯化自 ADC 浓度为 5 µg/mL 的 血清样品 (n = 4)	3.49±0.03	3.47±0.21	9.67±0.74	16.6±0.16	22.3±0.1	19.83±1.08	14.41±0.21	8.49±0.26	5.24±0.74
亲和纯化自 ADC 浓度为 2.5 µg/mL 的 血清样品 (n = 4)	3.43±0.06	3.08±0.26	9.94±0.22	17.83±0.53	23.21±0.59	19.55±0.18	13.64±0.23	8.01±0.65	4.73±0.54
亲和纯化自 ADC 浓度为 1.25 µg/mL 的 血清样品 (n = 4)	3.4±0.1	4.43±0.22	11.31±1.68	17.96±0.89	20.73±0.65	18.17±0.94	12.55±1.17	9.08±0.5	5.78±0.66
亲和纯化自 ADC 浓度为 0.625 µg/mL 的 血清样品 (n = 4)	3.48±0.08	6.49±0.66	10.95±1.45	16.43±0.8	17.9±0.98	16.61±0.49	12.67±1.29	11.91±0.71	7.05±0.43

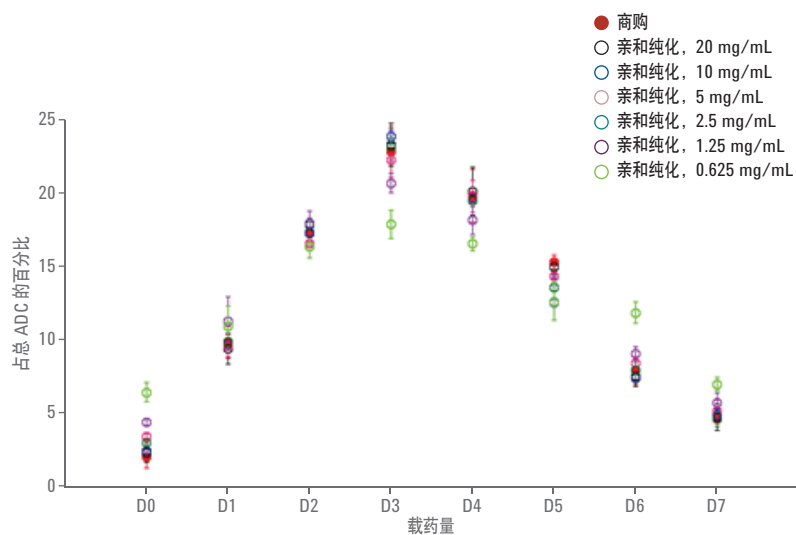


图 5. 各载药量下的 ADC 百分比

结论

安捷伦为您提供了一套全面的 ADC DAR 测定解决方案，包括使用 Agilent AssayMAP Bravo 进行自动亲和纯化；使用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 和 Agilent 6550 Q-TOF 采集 LC/MS 数据；使用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件进行解卷积处理，以及使用 Agilent MassHunter DAR 计算器确定 DAR。该 ADC DAR 测定解决方案的优势在于：

- 节省人力，降低变异性并减少可能引入的人为误差
- 提高血清 ADC 纯化操作的产率和纯度
- 生成高分辨率的谱图
- 轻松完成 DAR 计算

参考文献

1. Perez, H. L.; *et al.* Antibody-drug conjugates: current status and future directions. *Drug Discovery Today* **2014**, *19*(7), 869-881.
2. Beck, A.; *et al.* Cutting-edge mass spectrometry methods for the multi-level structural characterization of antibody-drug conjugates. *Expert Reviews of Proteomics* **2016**, *13*:2, 157-183.
3. Xu, K.; *et al.* Characterization of intact antibody-drug conjugates from plasma/serum in vivo by affinity capture capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **2011**, *412*, 56-66.

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。不可用于诊断目的。

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，2016

2016年3月30日，中国印刷

5991-6621CHCN



Agilent Technologies