



生物制药工作流程解决方案

## 加速 ADC DAR 表征

The Measure of Confidence



**Agilent Technologies**

### 概述

药物开发的目标是找到有效剂量与出现严重副作用的剂量相隔较远的药物。一种寻找安全有效药物的常用方法是尽可能提高药物特异性。尽管有效的小分子药物非常多，研究人员很难找到具有高度特异性的小分子药物。这要部分归咎于可以设计到这些分子上的结合特异性有限。而相反，生物制剂在开发时却可被赋予优异的选择性。

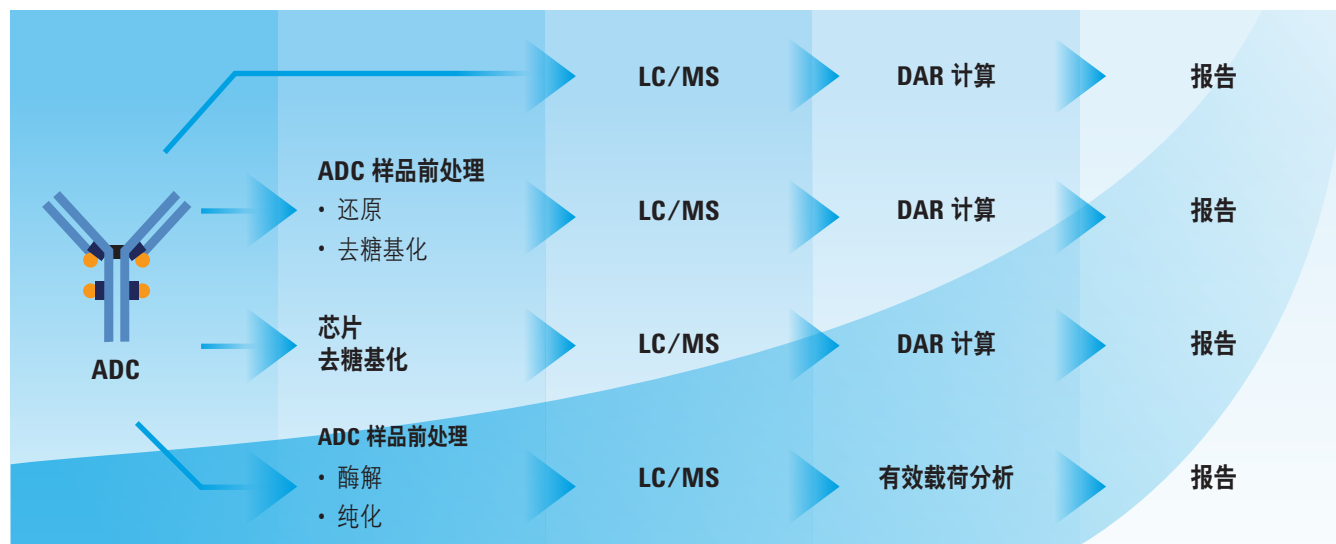
一种生成具有极低副作用的有效生物治疗药物的全新方法是使用抗体药物偶联物 (ADC)，这些偶联物结合了生物制剂的选择性和小分子药物的效价和广泛的目标多样性。这种方法是将小分子药物连接至能够与靶细胞群高度特异性结合的抗体上。从而使 ADC 能够在靶细胞处形成较高的局部药物浓度，同时保证非靶细胞处的药物暴露水平较低。尽管 ADC 药物的概念相对简单，但全面表征 ADC 所需的分析工作却相当复杂。

要开发出一种 ADC，必须构建具有合适亲和力和特异性的抗体，还必须将有效药物/交联物的组合偶联到抗体上。此外，必须优化单个抗体分子所携带的药物分子数量以达到预期效价、大大降低脱靶效应并表现出良好的药代动力学性质。与小分子药物不同，ADC 属于异质性混合物，其中各偶联物分子由于抗体上连接的药物分子数量的不同而有所不同。因此药物/抗体比率 (DAR) 是开发过程中必须密切监测的 ADC 关键质量属性。DAR 值过低会影响药物有效性，而 DAR 值过高会导致出现预期外的毒性并且药代动力学性质差。

本工作流程指南将着重介绍利用多种互补手段表征 ADC。

一个常用并且信息量丰富的 ADC DAR 表征工作流程是使用液质联用系统分析完整 ADC。这种方法能够揭示 ADC 样品中携带不同数量药物偶联物的抗体的分布情况并给出各抗体糖型的质量数。这种工作流程所提供的数据非常有用，但生成的复杂谱图可能难以解析。

## 安捷伦 ADC DAR 表征工作流程



其他 ADC DAR 表征工作流程涉及分析前对纯化的 ADC 样品进行样品前处理。增加去糖基化步骤可从 ADC 去除多聚糖，因此能够大幅简化谱图从而提高 DAR 测定过程中峰识别的可靠性。此外，去糖基化使测定不含多聚糖的抗体的质量数以及检测抗体的糖谱成为可能。在 ADC 分析前的还原步骤可测定轻链和重链的质量数以及药物偶联物在每条链上的相对分布情况。结合抗体还原与去糖基化步骤简化了谱图的解析并允许测定去糖基化轻链和重链的质量数。

另外，数据分析和报告也是 ADC 表征中的重要环节。因此，安捷伦公司开发了 Agilent MassHunter DAR 计算器，该计算器仅需极少的用户输入即可快速计算完整和还原态 ADC 的 DAR 值。该软件给出的报告汇总了理论质量数、测定质量数、药物/接头质量数和 ADC 的总 DAR 值。它还能以表格形式给出所有检测到的 DAR 种类及其各自的理论质量数、测定质量数、峰面积百分比和计算所用谱图。该报告可提供电子版本，方便研究人员查看、存档以及共享不同的分析数据。

# 完整 ADC DAR 测定





整个药物开发过程期间必须始终测定和监测 ADC DAR 值，以指导候选 ADC 的选择，推进药物开发过程。由于完整 ADC DAR 测定所需的样品处理步骤非常少，因此可用于样品量受限和不受限的应用。ADC 分析的第一个步骤是通过液相色谱进行分离。由于 ADC 的化学性质各异，因此可针对具体的目标 ADC 选择不同的安捷伦色谱柱以实现出色分析性能。通常选择高分离度色谱柱，例如 PLRP-S 1000Å 色谱柱、Poroshell 300Å 5 µm 色谱柱或 AdvanceBio RP-mAb (450Å, 3.5 µm) 色谱柱。一般使用 Agilent TOF 和 Q-TOF 仪器分析完整的 ADC。这些仪器能够为 DAR 计算提供所需的高分辨率以及精确质量测定结果。Agilent MassHunter BioConfirm 软件可轻松完成原始质谱图的解卷积处理并得到完整蛋白分子的准确分子量，多次运行仍可给出可重现的结果。最后，通过使用经过解卷积的谱图并在少量的用户输入下，DAR 计算器可自动选取能够代表各不同载药量 ADC 的峰。该计算器还可对这些峰面积进行积分或测定峰高，确定各 ADC 峰所占百分比并计算出 DAR 平均值。DAR 计算中使用的参数可作为方法文件保存以用于高通量样品处理。所得结果可用于生成包含关键信息的 DAR 报告，帮助制定数据导向的决策。

#### 相关应用简报：

- 通过使用 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统与 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 表征药物/抗体比率实现对抗体药物偶联物的分析 (5991-6242CHCN)

## 推荐系统配置

### 硬件 — 液质联用系统

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (部件号 G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (部件号 G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 进样器 (部件号 G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 馏分收集器/自动进样器柱温箱 (部件号 G1330B)

TOF/Q-TOF 选项：

- Agilent 6230 TOF LC/MS (部件号 G6230BA)
- Agilent 6530 Q-TOF LC/MS (部件号 G6530BA)
- Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (部件号 G6550AA)

### 软件

- Agilent MassHunter 定性分析软件 (部件号 G3337AA)
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件 (部件号 G6829A)
- Agilent MassHunter DAR 计算器 (部件号 G6829A-64001)

### 分析柱

- Agilent PLRP-S 1000Å 色谱柱，2.1 mm x 150 mm，8 µm (部件号 PL1912-3802)
- Agilent Poroshell 300SB-C8 色谱柱，2.1 x 75 mm，5 µm (部件号 660750-906)
- Agilent Poroshell 300SB-C3 色谱柱，2.1 x 75 mm，5 µm (部件号 660750-909)
- Agilent AdvanceBio RP-mAb C4 色谱柱，2.1 x 100 mm，3.5 µm (部件号 795775-904)

## 处理后 ADC 的 DAR 表征



作为对完整 ADC DAR 表征工作流程的补充，用户还可通过在 DAR 分析前对 ADC 进行化学处理来获取更多信息。常用的 ADC 处理步骤有去糖基化、还原以及还原与去糖基化相结合。所有这些样品前处理操作均可手动完成，也可以由 Agilent AssayMAP Bravo 自动化样品前处理平台完成。

AssayMAP Bravo 处理具有极好的重现性和可扩展性（可同时运行 8 - 96 个样品），能提供便捷的人员间和站点间方法转换，还能大大节省人力并减少人为误差。此外，AssayMAP Bravo 配备有 Protein Sample Prep Workbench 软件，该软件用户界面简单，非自动化领域专业人员仅需数日而非数月即可掌握该自动化功能。除自动去糖基化以及还原纯化的 ADC 外，AssayMAP Bravo 还可用于纯化复杂基质（例如血清）中的 ADC。

完整 ADC DAR 工作流程的第一种变化类型是 ADC 去糖基化。该分析方法能够消除多聚糖带来的复杂性，提供具有不同载药量的 ADC 的完整质量数。

第二种变化类型是还原 ADC 二硫键，即在质谱分析前分离抗体的轻链和重链，从而为 ADC 表征提供另一层面的详细信息。DAR 计算器设计旨在通过简单的命令分析完整或还原态 ADC。该计算器能够估算轻链和重链的 DAR 值并给出还原态 ADC 样品的总 DAR 值。

第三种变化类型是进行 ADC 还原与去糖基化这两个步骤，以获得无多聚糖的轻链和重链。与完整 ADC 的去糖基化类似，去糖基化能够简化重链的解卷积谱图，因此可展现出原本被多聚糖掩盖的细节信息。

进行全面 ADC 表征时，可能需要执行上述一个或多个样品前处理工作流程。AssayMAP Bravo 的灵活性使得上述工作流程能够平行执行。

#### 相关应用简报：

- 使用自动化样品前处理和新型 DAR 计算器软件计算抗体药物偶联物 (ADC) 的药物/抗体比率 (DAR) (5991-6263CHCN)

## 推荐系统配置

### 硬件 — 液质联用系统

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵 (部件号 G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (部件号 G1316C)
- Agilent 1290 Infinity 进样器 (部件号 G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 馏分收集器/自动进样器柱温箱 (部件号 G1330B)

TOF/Q-TOF 选件：

- Agilent 6230 TOF LC/MS (部件号 G6230BA)
- Agilent 6530 Q-TOF LC/MS (部件号 G6530BA)
- Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS (部件号 G6550AA)

### 软件

- Agilent MassHunter 定性分析软件 (部件号 G3337AA)
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件 (部件号 G6829A)
- Agilent MassHunter DAR 计算器 (部件号 G6829A-64001)

### ASSAYMAP BRAVO 和消耗品

- AssayMAP Bravo (部件号 G5542BA)
- 用于抗体纯化的消耗品
- PA-W 小柱 (部件号 G5496-60000)
- SA-W 小柱 (部件号 G5496-60010)

### 分析柱

- Agilent PLRP-S 1000Å 色谱柱，2.1 mm x 150 mm，8 μm (部件号 PL1912-3802)
- Agilent Poroshell 300SB-C8 色谱柱，2.1 x 75 mm，5 μm (部件号 660750-906)
- Agilent Poroshell 300SB-C3 色谱柱，2.1 x 75 mm，5 μm (部件号 660750-909)
- Agilent Advance RP-mAb 色谱柱，2.1 x 100 mm，3.5 μm (部件号 785775-906)

# 使用 HPLC-CHIP 实现 ADC DAR 测定





该工作流程介绍了安捷伦针对完整和去糖基化 ADC DAR 分析所独有的一站式解决方案。HPLC-Chip Cube 采用微流控技术在一块可重复使用的芯片上进行酶反应和分离。安捷伦提供可同时分析完整 ADC 和去糖基化 ADC 的芯片。如需分析完整 ADC，可使用 ProtID-Chip-150 (II) 对 ADC 进行富集和分析性分离。如需分析去糖基化 ADC，可使用专用的 mAb-ProtID 芯片。该芯片内的酶反应器含有固定化 PNGase F，可促进在线去糖基化。然后在同一芯片上使用反相纳流分析色谱柱分离去糖基化 ADC，再将去糖基化 ADC 直接从芯片上引入质谱仪。芯片内的在线去糖基化极为快速和高效。整个去糖基化和液质联用分析过程可在 12 min 内完成。由于样品的全部处理工作均在芯片中完成，因此样品处理操作非常少且非特异性样品损失极低。下游数据分析过程按先前所述方法完成。HPLC-Chip Cube 是快速、灵敏并且便捷的 ADC 分析选择。

#### 相关应用简报：

- An Integrated Workflow for the Comprehensive 分析 of Antibody-Drug Conjugates Using Microfluidic HPLC-Chip/MS (使用微流控 HPLC-Chip/MS 全面分析抗体药物偶联物的一体化工作流程) (5991-6388EN)

#### 推荐系统配置

##### 硬件 — 液质联用系统

- Agilent 1260 Infinity 纳流液相色谱系统

##### TOF/Q-TOF 选件：

- Agilent 6230 TOF LC/MS (部件号 G6230BA)
- Agilent 6530 Q-TOF LC/MS (部件号 G6530BA)

##### 软件

- Agilent MassHunter 定性分析软件 (部件号 G3337AA)
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件 (部件号 G6829A)
- Agilent MassHunter DAR 计算器 (部件号 G6829A-64001)

##### HPLC-CHIP

- 蛋白质芯片 (II) (部件号 G4240-63001 SPQ105)
- mAb-ProtID 芯片 (部件号 G4240-63001 SPQ-494)

## ADC 有效载荷定位



DAR 测定可为确定 ADC 所偶联药物的平均数量提供有价值的信息。但该方法无法提供药物在 ADC 上结合位点的相关信息。结合位点信息的确定方法是：酶解纯化后的 ADC，然后净化所得肽段混合物，最后使用 LC/MS/MS 法分析肽段。该分析方法可简单定性分析结合位点，或定量评估结合位点的占位百分比，并且该定量信息有助于更好地掌握 ADC 的构效关系 (SAR) 或药代动力学性质。

该工作流程的样品前处理阶段需对纯化后的 ADC 进行变性、还原、烷基化和酶解处理。然后净化得到的肽段混合物。上述步骤可手动完成，也可以使用 AssayMAP Bravo 平台自动进行（请参见相关应用简报）。净化后进行反相液相色谱分离。分离选用 Agilent AdvanceBio C18 肽谱分析色谱柱，因为该色谱柱专为快速、高分离度的肽段分离而设计，非常适用于质谱分析前的肽段处理。然后通过高分辨率和精确质量 Q-TOF 系统对肽段进行分析。最后，使用 MassHunter BioConfirm 软件分析数据并确定与药物偶联的肽段。

#### 相关应用简报：

- Mapping the Drug Conjugation Sites of an Antibody-Drug Conjugate Using Automated Sample Preparation and LC/MS 分析（使用自动化样品前处理和 LC/MS 分析测定抗体药物偶联物的药物结合位点）(5991-6389EN)
- Automation of Sample Preparation for Accurate and Scalable Quantification and Characterization of Biotherapeutic Proteins Using the Agilent AssayMAP Bravo Platform（利用 Agilent AssayMAP Bravo 平台，通过自动化样品前处理实现生物治疗蛋白质的准确和可扩展的定量和表征分析）(5991-4872EN)
- 自动化液质联用样品前处理：通过 Agilent AssayMAP Bravo 平台实现高通量溶液内酶解和多肽纯化 (5991-2957CHCN)

## 推荐系统配置

### 硬件 — 液质联用系统

Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵（部件号 G4220A）
- Agilent 1290 Infinity 柱温箱（部件号 G1316C）
- Agilent 1290 Infinity 进样器（部件号 G4226A）
- Agilent 1290 Infinity 馏分收集器/自动进样器柱温箱（部件号 G1330B）

Q-TOF 选件：

- Agilent 6530 Q-TOF LC/MS（部件号 G6530BA）
- Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS（部件号 G6550AA）

### 软件

- Agilent MassHunter 定性分析软件（部件号 G3337AA）
- Agilent MassHunter BioConfirm 软件（部件号 G6829A）

### ASSAYMAP BRAVO 和消耗品

- AssayMAP Bravo（部件号 G5542BA）
- PA-W 小柱（部件号 G5496-60000）
- SA-W 小柱（部件号 G5496-60010）
- C18 小柱（部件号 5190-6532）

### 分析柱

- AdvancedBio 肽谱分析柱，2.1 x 150 mm，2.7  $\mu$ m（部件号 653750-902）
- RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱，2.1 x 100 mm，1.8  $\mu$ m（部件号 959758-902）
- RRHD Eclipse Plus C18 色谱柱，2.1 x 50 mm，1.8  $\mu$ m（部件号 959757-902）

了解更多信息：

**[www.agilent.com/chem/bioconfirm](http://www.agilent.com/chem/bioconfirm)**

查找当地的安捷伦客户服务中心：

**[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)**

安捷伦客户服务中心：

**800-820-3278,**

**400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

**[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)**

在线询价：

**[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)**

安捷伦培训中心：

**<https://www.agilent.com.cn/zh-cn/training-events/events/agilent-education>**

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

**[www.agilent.com/chem/accessagilent-cn](http://www.agilent.com/chem/accessagilent-cn)**

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，2015

2015 年 11 月 12 日中国出版

5991-6291CHCN



**Agilent Technologies**