

抗体药物偶联物综合分析的 一体化工作流程

采用微流控 HPLC-Chip/MS 技术

应用简报

作者

Chu, Gregory Staples 和 Ning Tang
安捷伦科技公司
Santa Clara, CA
USA

Andy Gieschen
安捷伦科技公司
La Jolla, CA
USA

M. Sundaram Palaniswamy
安捷伦科技公司
Bangalore, India

摘要

本研究使用安捷伦 HPLC-Chip 解决方案和飞行时间 (TOF) 质谱仪开发出一套测定抗体药物偶联物完整质量数、去糖基化完整质量数、药物/抗体比率以及多糖组成的高度自动化的集成分析方法。



Agilent Technologies

前言

抗体药物偶联物 (ADC) 属于新一代靶向生物药物, 合成方法是将细胞毒素剂通过连接物连接至靶向特定细胞的单克隆抗体 (mAb)。偶联化学方法有包括半胱氨酸连接、赖氨酸连接和位点特异性偶联在内的多种类型, 需要根据偶联化学类型选择不同的表征方法。

ADC 具有高效、高选择性和低毒性的特点, 其生产与表征比传统 mAb 更为复杂。需要采用严格质量控制以确保 ADC 具有恒定的多糖组成和药物/抗体比率 (DAR)。取得适合的 DAR 对于 ADC 效率优化和毒性最小化至关重要。DAR 与多糖组成的测定常采用液相色谱/质谱 (LC/MS) 法。去糖基化通常在分析前离线完成, 目的是降低用于 DAR 计算的 ADC LC/MS 分析结果的复杂性。

本应用简报介绍了一种采用安捷伦 HPLC-Chip 解决方案和飞行时间 (TOF) 质谱仪测定赖氨酸连接 ADC 完整质量数、DAR 和多糖组成的新型快速一体化工作流程。分析完整 ADC 时, 采用标准蛋白质鉴定芯片与反向色谱柱对不同种类糖基化和药物偶联物质进行分离。采用 mAb-ProtID 芯片 (配备含固定化 PNGase F 酶的在线反应器) 以及反相富集与分析色谱柱测定去糖基化质量数与 ADC DAR。具有相同去糖基化反应器的另一种芯片以及多孔石墨化富集与分析色谱柱可用于表征所释放的多糖。该系统可分析纳克级的上样量, 且所有分析均可在 15 min 内完成。此外, 在线去糖基化提供的解决方案可适用于所有多用户临床研究实验室。

实验部分

仪器

本工作流程采用配置 HPLC-Chip Cube 的 Agilent 1260 毛细管与纳流液相色谱以及 Agilent 6230 精确质量数 TOF LC/MS 进行开发, 并采用不同微流控芯片进行 ADC 的表征。进行标准完整 ADC 分析时采用的是反相芯片。进行完整去糖基化 ADC 分析与 DAR 计算时, 使用的是 mAb-ProtID 芯片 (配备含固定化 PNGase F 的酶反应器) 以及 PLRP-S 300Å, 5 μm 色谱柱。表征完整 ADC 所释放的 N-糖链时, 使用的是具有固定化 PNGase F 的 mAb-Glyco 芯片以及多孔石墨化碳 (PGC) 固定相。所有分析均重复进样三次。仪器分析条件如表 1 所示。

数据分析

采用带 BioConfirm 功能的 Agilent MassHunter 定性分析软件进行数据分析。采用 BioConfirm 软件的最大熵算法进行解卷积。采用安捷伦 DAR 计算器进行 DAR 计算。

表 1. 液相色谱与飞行时间质谱条件

	完整 ADC 分析	DAR 分析, 去糖基化 ADC	N-糖链分析
液相色谱运行条件			
HPLC-chip	ProtID-Chip-150 (II) 150 mm × 300 Å C18 芯片与 40 nL 捕集柱	mAb-ProtID 芯片、PNGase F 酶反应器、PLRP-S 反相富集与分析色谱柱 (部件号 G4240-63001 SPQ 494)	mAb-Glyco 芯片、PNGase F 酶反应器、石墨化碳富集与分析色谱柱 (部件号 G4240-64021)
进样量	2 µL	2 µL	2 µL
流动相	A) 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液	A) 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液	A) 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液
流速	0.5 µL/min	0.5 µL/min	0.5 µL/min
线性梯度	时间 (Min) %B 0.00 2 1.00 2 3.00 60 8.00 90 12.00 95	时间 (Min) %B 0.00 2 6.00 2 7.50 32 8.00 85 9.00 85 9.01 2	时间 (Min) %B 0.00 2 6.00 2 7.50 32 8.00 85 9.00 85 9.01 2
飞行时间质谱条件			
离子模式	正离子模式 ESI	正离子模式 ESI	正离子模式 ESI
干燥气	N ₂ , 13 L/min, 250 °C	N ₂ , 13 L/min, 250 °C	N ₂ , 13 L/min, 250 °C
碎裂电压	400 V	400 V	125 V
锥孔 1 电压	65 V	65 V	65 V
毛细管电压	1850 V	1850 V	1850 V
八极杆 RF 峰	750 V	750 V	750 V
扫描速率	1 质谱图/秒	1 质谱图/秒	1 质谱图/秒
最小范围	500 m/z	500 m/z	200 m/z
最大范围	7000 m/z	7000 m/z	1700 m/z

结果与讨论

药物/抗体比率测定

使用标准蛋白质鉴定芯片可得到完整 ADC 的糖型。图 1 显示 DAR 1 类型的放大视图。采用 MassHunter 定性分析中的 BioConfirm 软件对多糖异质性 (G0、G1 等) 进行表征与标注。每个峰顶均标明了糖型改变质量数误差 (单位为 ppm)。图 1 中的未标记峰对应 ADC 中存在的额外未偶联连接物 (未连接药物)。完整或去糖基化 ADC 得出的所有 DAR 结果中均存在额外未偶联连接物。

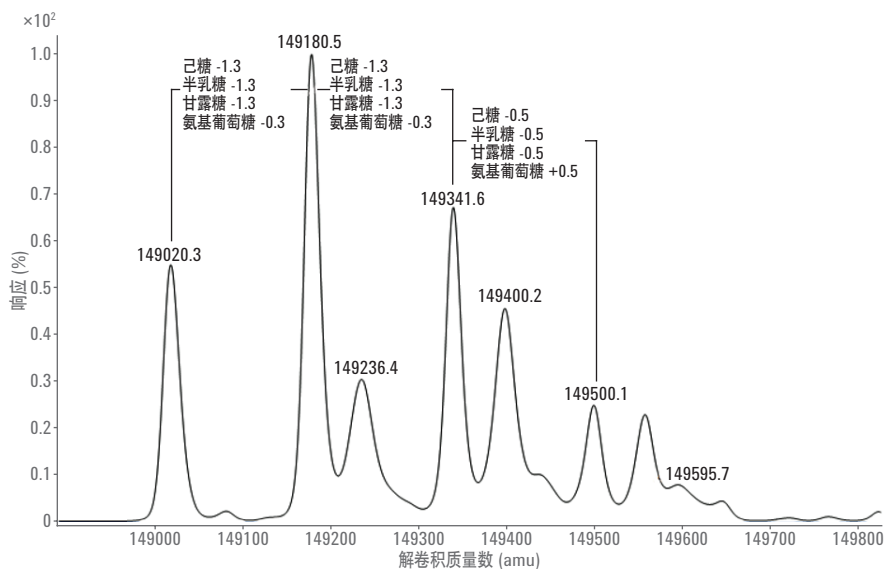


图 1. 糖基化并连有药物连接物的完整 ADC DAR 1 类型的解卷积质谱。多糖异质性产生了多个峰 (G0、G1 等), 因此每个峰顶上显示了可能核心多糖每种组分的质量数误差 (ppm)。仅标有一个质量数值的峰为具有额外未偶联连接物的 ADC 多糖种类

使用 mAb-ProtID 芯片完成在线去糖基化后即可计算得出 DAR。ADC 的测定质量数与预期质量数差值不超过 10 ppm。图 2 所示为 ADC 经芯片在线去糖基化后三次重复分

析得到的叠加解卷积质谱图。图中可观察到 DAR 0 - DAR 7 的分布情况。DAR 比率由安捷伦 DAR 计算器计算得出，结果的可重现性良好，相对标准偏差 (RSD) 低于 5%。

采用安捷伦 DAR 计算器可得出 ADC DAR 的平均值为 3.0 (图 3)。DAR 计算器有助于用户灵活选择 DAR 计算时所积分的峰。如图 3 所示，使用每种 DAR 类型的第一个峰得出的 DAR 值与使用所有峰积分得出的值一致。

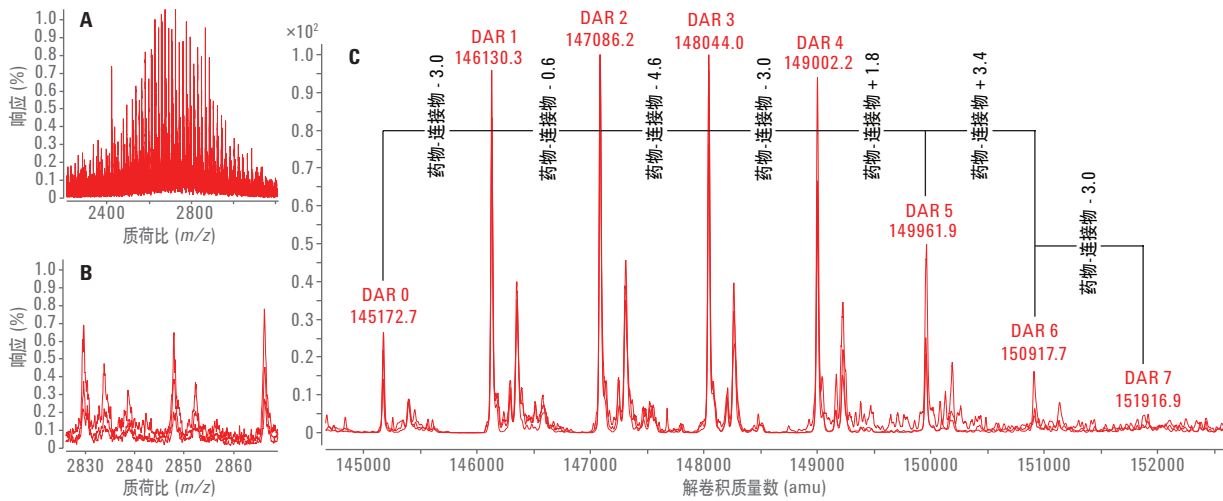


图 2. 使用最大熵算法进行解卷积的 1 µg 在线去糖基化赖氨酸偶联 ADC 在 mAb-ProtID 芯片上的三次重复分析结果。三次重复分析的叠加质谱图如图 A 所示，放大视图如图 B 所示。DAR 1 - 7 的药物-连接物复合物质量数误差 (单位: ppm) 如图 C 所示

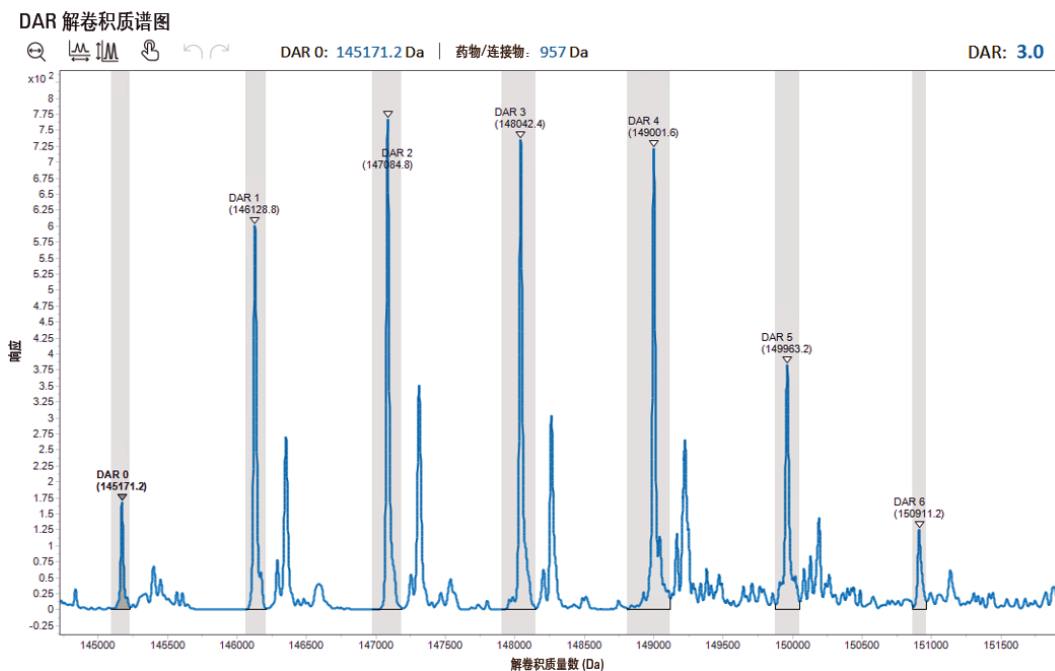


图 3. 安捷伦 DAR 计算器软件界面以及选定用于 DAR 值计算的色谱峰。括号中为各选定峰的准确质量数。计算得出的 DAR 平均值为 3.0。各 DAR 的额外峰分别附有相应的额外未偶联连接物

多糖鉴定

具有在线去糖基化功能的 mAb-Glyco 芯片可用于测定 ADC 的多糖组成 (图 4)。使用 Agilent MassHunter 定性分析软件中的“分子式查找”功能对 N-糖链进行高重现性鉴定,并将该结果与 mAb-Glyco 芯片随附的个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 进行匹配。

结论

本文采用 HPLC-Chip 技术开发出了一套自动化一体式微流控 ADC 表征的工作流程。分析完整 ADC 时,不同药物偶联种类的分离由标准蛋白质鉴定芯片以及反向色谱柱完成。首先在具有固定化 PNGase F 酶的芯片上对 ADC 进行在线去糖基化,随后使用反相富集与分析色谱柱对去糖基化 ADC 种类进行分离。分析多糖时,在完成在线去糖基化后使用多孔石墨化碳富集与分析色谱柱

对 N-糖链进行分离。这一新型微流控纳升 LC/MS 工作流程能够高度重现地测定 ADC (糖基化和去糖基化)的精确质量数,结果与预期质量数差值不超过 10 ppm。采用安捷伦 DAR 计算器可得出 RSD 低于 5% 的高重现性 DAR 比率。每次 ADC 或多糖分析需要 15 min 的分析时间。采用这种一体化微流控纳升 LC/MS 工作流程时仅需纳克级 ADC,在自动化分析过程中使用固定化酶反应器进行 ADC 在线去糖基化可缩短分析时间。

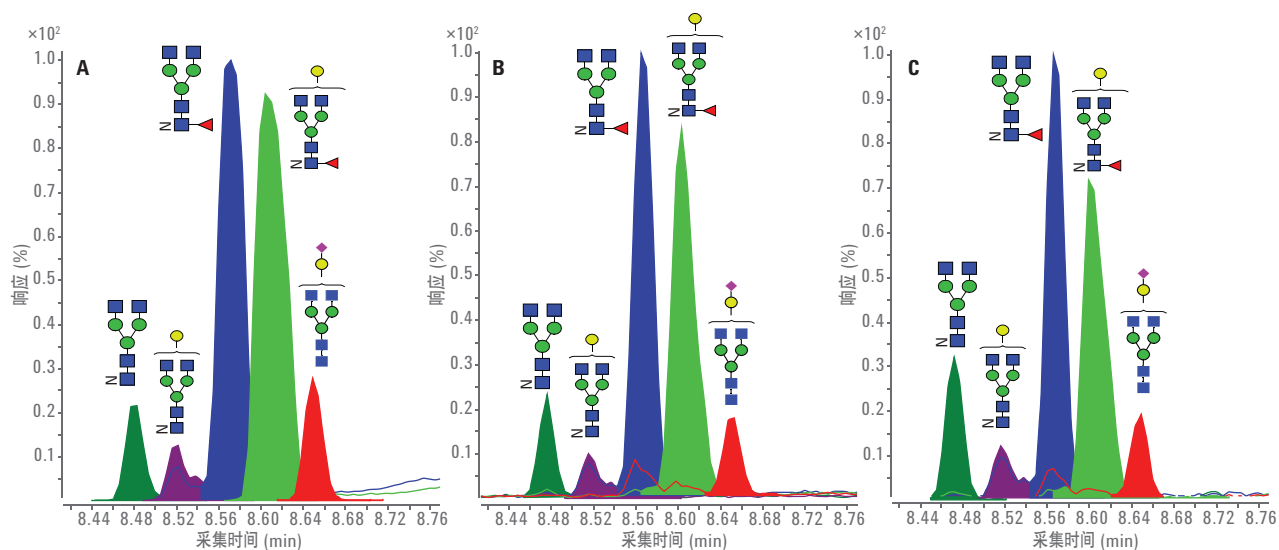


图 4. 使用 mAb-Glyco 芯片 (配备含固定化 PNGase F 酶的在线反应器) 以及多孔石墨化碳固定相的分析色谱柱表征释放的 N-糖链时, 对由 ADC 鉴定出的主要 N-糖链的三次重复分析结果

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11月17日，中国出版
5991-6388CHCN



Agilent Technologies