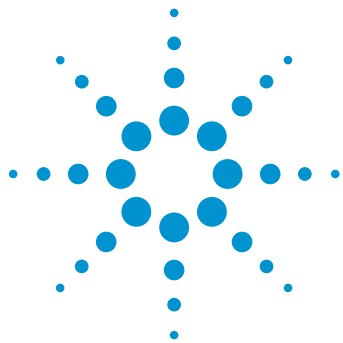




分析抗体-药物偶联物的药物结合位点

利用自动化样品前处理与 LC/MS 分析

应用简报

作者

Jing Chen
安捷伦科技公司
1232 Fourier Drive, Suite 100,
Madison, WI 53717, USA

Alex Zhu
安捷伦科技公司
2850 Centerville Road,
Wilmington, DE 19808, USA

前言

结合了单克隆抗体 (mAb) 特异性与细胞毒性分子效能的抗体药物偶联物 (ADC) 已获得了越来越多的关注，它作为一种极具前景的方法可用于实现选择性更强的癌症治疗。由于潜在药物结合位点众多且在这些位点中的占位形式多样，因此 ADC 与未修饰的生物治疗抗体相比具有更高复杂性与异质性。为获得 ADC 分子的完全表征，本研究进行肽谱分析实验以获得关于 ADC 结合位点的详细位点特异性信息。本应用简报介绍了结合采用 Agilent AssayMAP Bravo 样品前处理平台的自动化蛋白质酶解、采用高分辨率精确质量数 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF 系统的 LC/MS 分析以及 Agilent BioConfirm 软件的 ADC 肽谱分析工作流程。T-DM1 获得的序列覆盖率为 98.7%。采用药物偶联物可鉴定出 29 个以上的赖氨酸位点。



Agilent Technologies

实验部分

试剂与化学品

胰蛋白酶来自安捷伦科技公司 (Santa Clara, CA)。Eppendorf 96 孔 PCR 板购自 Eppendorf (Hauppauge, NY)，其他所有化学品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

自动化胰蛋白酶酶解

采用去离子 (DI) 水将冻干的 T-DM1 和赫赛汀复溶制成 20 mg/mL 的溶液，然后分为若干等份并在使用前始终于 -80 °C 下储存。在 Agilent AssayMAP Bravo 工作台 (Santa Clara, CA) 上采用溶液内酶解方案：单板 1.0 版进行抗体酶解，该方案为控制 AssayMAP Bravo 的蛋白样品前处理工作台软件中的一部分。简而言之，先将 T-DM1 和赫赛汀分别稀释至 1.5 mg/mL，随后将 10 µL T-DM1 分别移取至 96 孔 Eppendorf PCR 板第一列的每个孔中（位置 A1 - H1），并将 10 µL 赫赛汀分别移取至 96 孔板第二列的第一个孔中（位置 A2）。将 10 µL 20 mM 二硫苏糖醇 (DTT) 溶于 50% 2,2,2-三氟乙醇 (TFE) 中；将 100 mM 碳酸氢铵缓冲液加入样品中并使用内置帕尔帖的加热/冷却器于 60 °C 下在台板上温育一小时。随后，向每个孔中加入 10 µL 50 mM 碘乙酰胺并于室温下在台板上避光温育 30 分钟。最后，用 20 µL 50 mM 碳酸氢铵缓冲液稀释样品，向其中加入 30 µL 10 µg/mL 胰蛋白酶并混匀，并于 37 °C 下在台板上温育两小时。

LC/MS 分析

使用配备安捷伦双喷射流 ESI 离子源的 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF (Santa Clara, CA) 与 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统 (Waldbronn, Germany) 联用进行 LC/MS 分析。表 1 和表 2 列出了所采用的 LC/MS 参数。每次运行的总进样量为 1.5 µg。

数据分析

在鉴定 ADC 结合位点时，首先利用分子特征提取 (MFE) 对化合物进行提取，随后利用 Agilent MassHunter BioConfirm 软件 (B.07.00 版) 与具有以下修饰的 ADC 序列进行匹配：

- 烷基化（碘乙酰胺）(C): +57.0215
- 氧化 (M): + 15.9949
- 脱酰氨基化 (N): +0.9840
- 连接药物 (K): +956.3644

所有已鉴定的多肽均经过 MS/MS 谱图的确认。

对于已鉴定的 35 种药物偶联多肽，峰面积由从仅 MS 数据中所提取的母离子 (M、M+H、M+2H) 的 EIC 积分得出。CV 根据峰面积 (n = 8) 计算得出。

表 1. 液相色谱参数

参数	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, RRHD, 2.1 × 100 mm, 1.8 µm
样品恒温箱	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	时间 (min) %B 0 - 16 5 - 50 16 - 18 50 - 90 18 - 19 90
后运行时间	3 min
柱温	55 °C
流速	0.5 mL/min

表 2. 质谱参数

参数	Agilent 6550 Q-TOF LC/MS 系统
离子模式	正离子模式
离子源	安捷伦双喷射流
干燥气温度	150 °C
干燥气流速	13 L/min
鞘气温度	250 °C
鞘气流速	12 L/min
雾化器	35 psi
毛细管电压	3500 V
喷嘴电压	250 V
碎裂电压	250 V
Oct RF Vpp	750 V
MS 采集模式	扩展动态范围, 2 GHz; 用于药物结合位点鉴定的采用自动 MS/MS 模式; 用于重现性评估的采用仅 MS 模式
MS 范围	300 – 2000 m/z
MS/MS 范围	100 – 2000 m/z

结果与讨论

为了鉴定 T-DM1 的药物结合位点, 本文中采用 AssayMAP Bravo 自动化样品前处理技术对 ADC 及其相应 mAb 赫赛汀进行还原、烷基化与酶解。然后通过 Agilent 6550 Q-TOF 与 Agilent 1290 Infinity LC 联用对以上样品进行分析。原始数据经 Agilent BioConfirm 软件进行处理后可用于药物偶联多肽的鉴定(图 1)。



图 1. 使用 Agilent AssayMAP Bravo 和 Agilent 1290 Infinity LC/MS 系统的 ADC 肽谱分析工作流程

T-DM1 和赫赛汀的基峰色谱图 (BPC) 中显示出相似峰形, 而 T-DM1 色谱图的后半部分则显示出额外的峰(图 2A)。由于已知 DM1 会在 547.22 处产生强碎片离子, 因此可从 MS/MS 谱图中提取出该离子的 EIC。

547.22 处的 EIC 显示出在 8 - 15 min 间色谱峰后半部分具有多个峰, 表明药物偶联多肽在这一保留时间段内被洗脱出来(图 2B)。

547.22 的 EIC 中并未出现具有明显信号强度的赫赛汀峰, 这与预期相同。

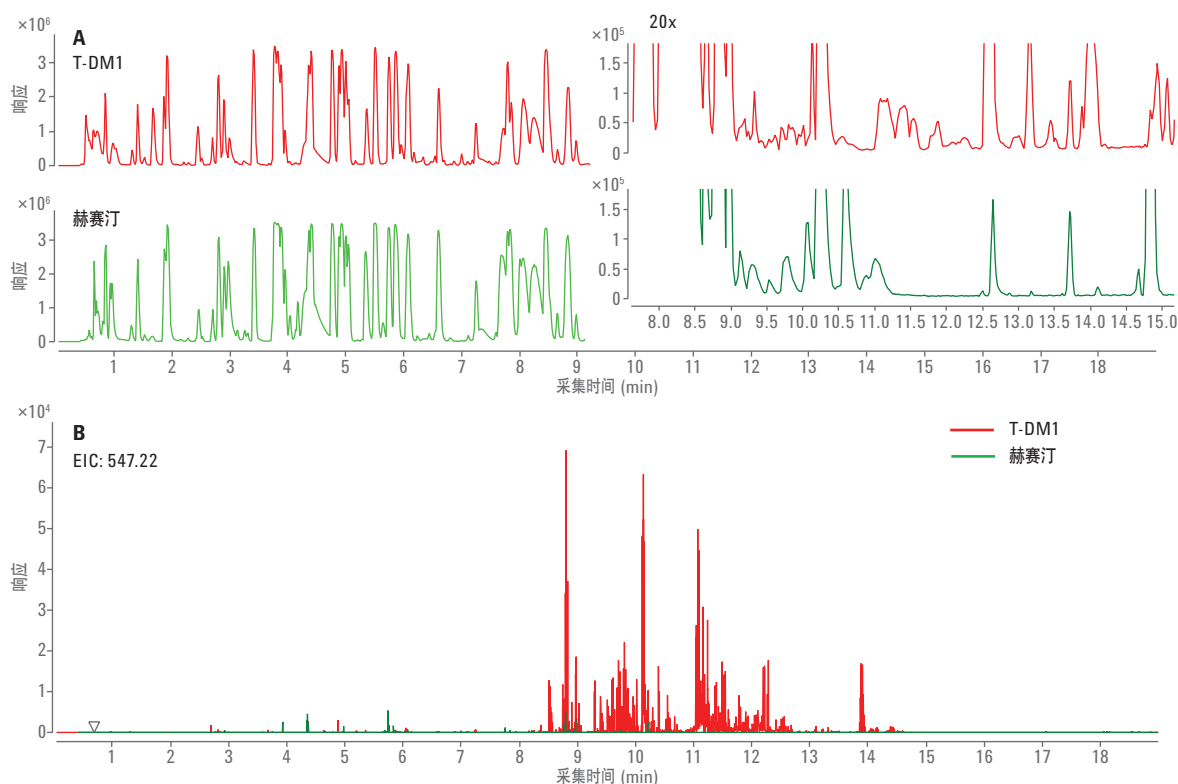


图 2. 酶解 T-DM1 和赫赛汀的基峰色谱图 (A) 以及来自 MS/MS 谱图的 547.22 处的提取离子色谱图 (B)

图 3 为所鉴定的两种代表性药物偶联多肽的母离子 EIC 和 MS/MS 谱图。药物偶联多肽形成非对映异构体并被成对洗脱出来（图 3A 与 3C）。除预期的 y 离子和 b 离子之外，

140.07、453.19、485.22 和 547.22 药物碎片离子也普遍存在于药物偶联多肽 MS/MS 谱图中。此外失去 546.21 质量数（失去 547.22 并增加一个氢原子）的 y 离子或母离

子也较为常见（图 3B 和 3D）。T-DM1 获得的序列覆盖率为 98.7%。所有 44 个赖氨酸位点均被一种以上的独特多肽所覆盖，其中包括 29 个已确定的药物结合位点、5 个

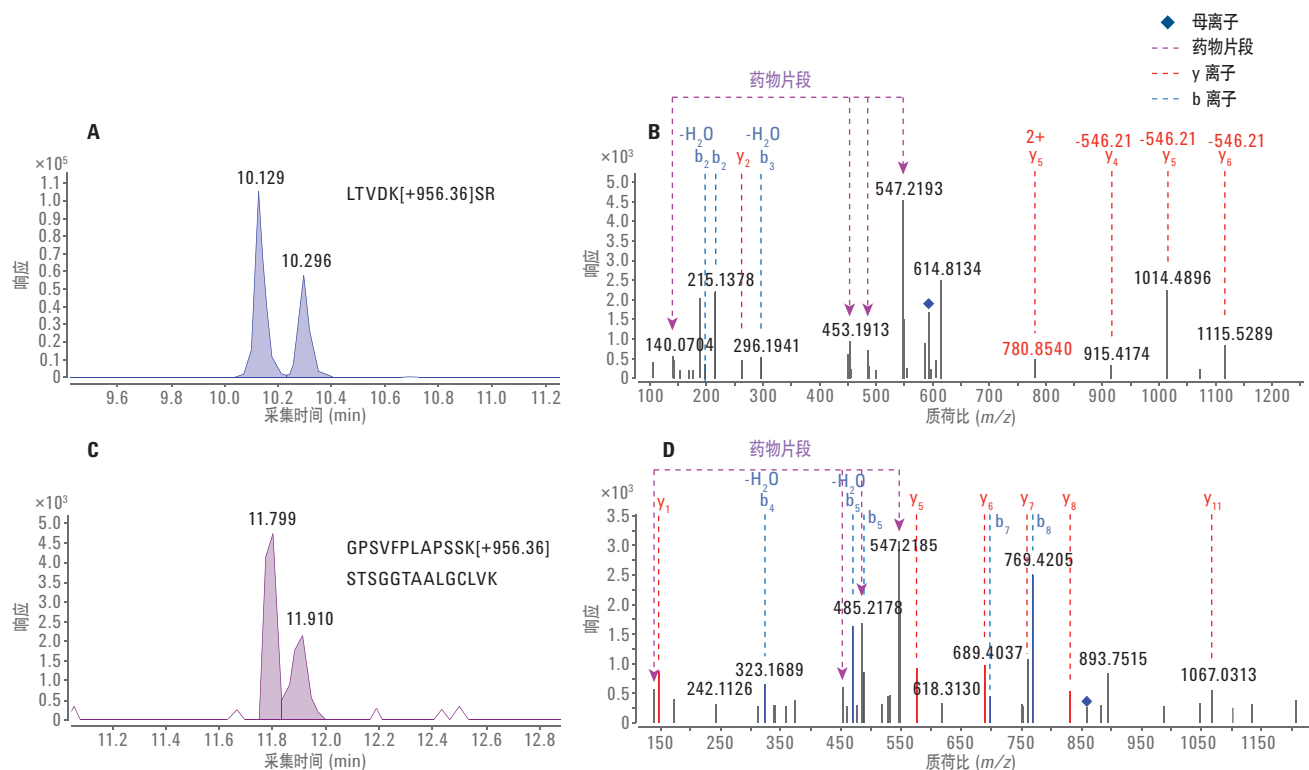


图 3. 药物偶联多肽代表性母离子的 EIC 和 MS/MS 谱图。A) 药物偶联多肽 LTVDKSR 母离子的 EIC；B) 药物偶联多肽 LTVDKSR 的 MS/MS 谱图；C) 药物偶联多肽 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK 母离子的 EIC；D) 药物偶联多肽 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK 的 MS/MS 谱图

轻链

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGS
RSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQHYTTPTFGGGTKEVEIKRTVAAPSVFIFPPSPDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV
THQGLSSPVTKSFNRGEC

重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHVVRQAPGKGLEWVARIIYPTNGYTRYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTLTVSSASTKGPS
VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP
SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

— 已鉴定序列
K 已确定的药物结合位点
K 潜在药物结合位点
K 已鉴定的未结合位点
— 29 (轻 9; 重 20)
— 5 (重 5)
— 10 (轻 4; 重 6)

图 4. 已确定的药物结合位点、潜在药物结合位点和已鉴定的未结合位点

潜在药物结合位点（根据 MS 和 MS/MS 可鉴定出独特的药物偶联多肽，但无法在多肽的多个赖氨酸位点中定位精确结合位点）以及 10 个未结合位点（未发现结合证据）（图 4）。

表 3 列出了具有已确定的药物结合位点、潜在的药物结合位点以及未证实发生结合的位点的 35 种独特的药物偶联多肽，位点分别以绿色、橙色和蓝色标记。

表 3. 已鉴定的独特药物偶联多肽。已确定的药物结合位点标记为绿色。潜在药物结合位点标记为橙色，其具体结合位点无法根据 MS/MS 确定。未结合的赖氨酸残基标记为蓝色

编号	链	测序位置	序列	修饰	质量数	偏差 (Bio. ppm)	MS/MS 响应
1	轻	25-45	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	1*药物 (+956.36444)A41	3242.5245	-4.82	1
2	轻	43-61	APKLLIYSASFYSGVPSR	1*药物 (+956.36444)A44	3024.4894	-3.55	1
3	轻	104-108	VEIKR	1*药物 (+956.36444)A106	1599.7626	-2.24	3
4	轻	109-142	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR	1*药物 (+956.36444); 1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464)A125A133	4680.2396	-4.69	2
5	轻	143-149	EAKVQWK	1*药物 (+956.36444)A144	1843.8448	-3.31	1
6	轻	150-183	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSK	1*药物 (+956.36444)A168	4575.0418	-5.4	1
7	轻	184-190	ADYEKHK	1*药物 (+956.36444)A187	1845.7912	-1.44	2
8	轻	189-207	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)A193A189	3096.4260	-3.87	1
9	轻	191-211	VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)A193A206	3335.5169	-3.51	1
10	重	20-38	LSCAASGFNIKDTYIHWVR	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B22B30	3193.4581	-3.59	1
11	重	39-50	QAPGKGLEWVAR	1*药物 (+956.36444)B43	2267.0663	-3.37	1
12	重	60-67	YADSVKGR	1*药物 (+956.36444)B65	1850.814	-3.43	2
13	重	99-136	WGGDGFYAMDYWGQGLTVSSASTKGPSVFP LAPSSK	1*药物 (+956.36444)B124	4907.1999	-2.29	1
14	重	125-136	GPSVFPLAPSSK	1*药物 (+956.36444)B136	2142.0028	-0.46	3
15	重	125-150	GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B147B136	3444.6523	-3.41	1
16	重	151-213	DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B203B208	7668.634	-4.9	6
17	重	214-217	VDKK	1*药物 (+956.36444)B216	1444.6554	-3.4	1
18	重	214-221	VDKKEPK	1*药物 (+956.36444) (B216 或 B217 或 B221)	1897.9142	-2.56	1
19	重	217-221	KVEPK	1*药物 (+956.36444)B217	1555.7243	-2.83	1
20	重	222-251	SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	3*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444) B232B229B223B225	4289.9795	-4.61	3

编号	链	测序位置	序列	修饰	质量数	偏差 (Bio, ppm)	MS/MS 响应
21	重	226-251	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	2*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B232B229B249	3799.799	-4.19	2
22	重	226-258	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR	2*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B232B229 (B249 或 B251)	4616.2141	-3.68	2
23	重	259-291	TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B264B291	4753.1541	-3.07	3
24	重	278-295	FNWYVDGVEVHNAKTKPR	1*药物 (+956.36444) (B291 或 B293)	3115.441	-4.72	1
25	重	292-295	TKPR	1*药物 (+956.36444)B293	1456.6701	-0.95	1
26	重	305-323	VVSVLTVLHQDWLNGKEYK	1*药物 (+956.36444)B314B320	3183.5605	-1.27	2
27	重	305-325	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B324 (B320 或 B323 或 B325)	3471.6801	-2.89	3
28	重	321-325	EYCK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B324B323	1682.6981	-2.05	1
29	重	324-329	CKVSNK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B324B325	1690.7356	-1.99	1
30	重	326-337	VSNKALPAPIEK	1*药物 (+956.36444)B329	2222.0921	-2.98	1
31	重	330-341	ALPAPIEKTISK	1*药物 (+956.36444)B337	2223.111	-3.67	3
32	重	342-347	AKGQPR	1*药物 (+956.36444)B343	1611.7385	-1.53	1
33	重	348-373	EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK	1*烷基化 (碘乙酰胺) (+57.021464); 1*药物 (+956.36444)B370 (B363 或 B373)	4002.899	0.75	1
34	重	374-412	GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSK	1*药物 (+956.36444)B395	5354.3867	-1.08	1
35	重	413-419	LTVDKSR	1*药物 (+956.36444)B417	1773.8267	-1.98	1

为评估工作流程的重现性，将“仅 MS 模式”下采集的 35 种已鉴定药物偶联多肽的母离子 EIC 进行提取与积分。图 5A 为两种代表性药物偶联多肽 8 次重复运行后的 EIC 叠加图。图 5B 为信号强度不同的四种代表性多肽 8 次重复运行后的峰面积积分图。在全部 35 种独特药物偶联多肽中，22 种的 CV% 介于 5% - 10% 之间（平均 7.79%），9 种的 CV% 介于 10% - 20% 之间（平均 12.29%），而剩余 4 种由于信号强度较低，CV% 高于 20%（图 5C）。

结论

本文开发出一种用于深入表征抗体药物偶联物的集成肽谱分析工作流程。实验结果证明，针对 T-DM1 使用 Agilent AssayMAP Bravo 系统可实现稳定而可重现的自动化胰蛋白酶溶液内酶解。利用 Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS 系统可实现出色的质量精度与灵敏度，从而确保全面的序列覆盖与精确的多肽鉴定。Agilent MassHunter BioConfirm 软件可实现自动化数据提取、序

列匹配与药物结合位点鉴定。T-DM1 获得的序列覆盖率为 98.7%。所鉴定的多肽涵盖了全部 44 个赖氨酸位点。44 个位点中的 29 个被确定为药物结合位点。所鉴定的额外多肽涵盖了 5 个位点，但无法清晰确定多肽修饰的精确位点。其余 10 个赖氨酸位点的药物结合情况无法得到证实。

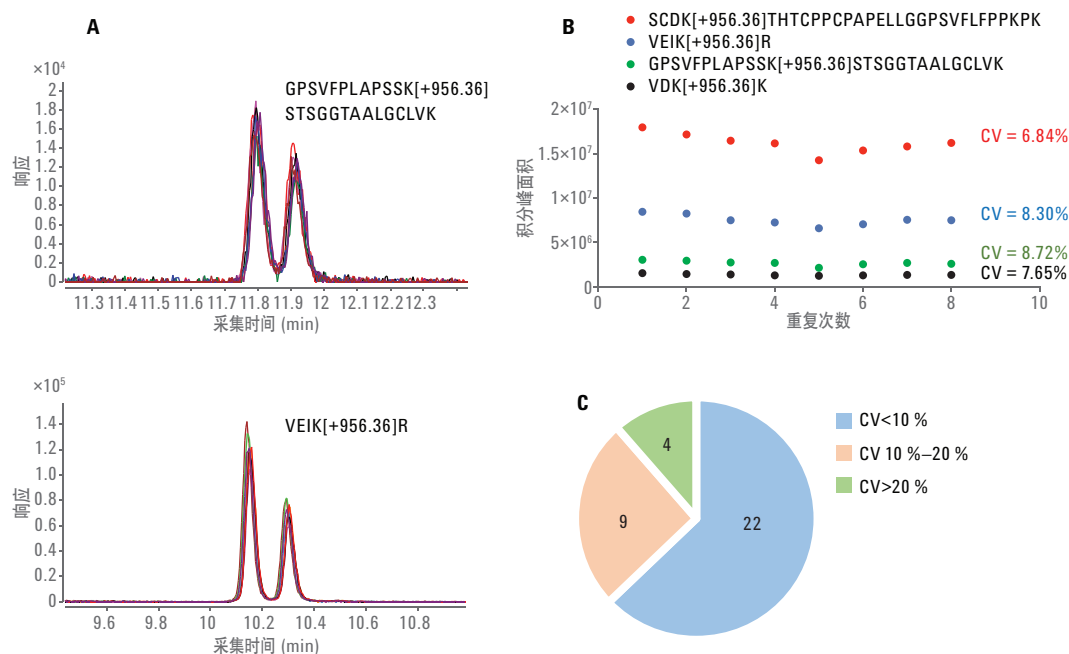


图 5. 肽谱分析工作流程的重现性。A) 两种已鉴定药物偶联多肽的 8 个母离子 EIC 叠加图；B) 4 种代表性药物偶联多肽 EIC 积分峰面积散点图；C) %CV 小于 10%、10% - 20% 以及大于 20% 的多肽数量饼图

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，2015
2015 年 11 月 9 日，中国出版
5991-6389CHCN



Agilent Technologies