应用简报

生物制药/制药

使用二维液相色谱和非变性质谱表征抗体药物偶联物

作者

David L. Wong，
Sarah M. Stow
安捷伦科技有限公司

摘要

抗体药物偶联物 (ADCs) 通过合成连接子将小分子药物与单克隆抗体 (mAb) 偶联起来，是近年来快速增长的一类有效的生物治疗药物。偶联药物与 mAb 的比率（药物/抗体比率，DAR）会影响疗效和安全性，是 ADC 开发的关键质量属性 (CQAs) 之一。二维液相色谱/质谱 (2D-LC/MS) 常用于表征 ADC 分子。此方法使用疏水相互作用色谱 (HIC) 柱和反相 (RP) 色谱柱，并与质谱联用。然而，许多 ADC 产品在有机和酸性溶剂条件下会降解。

本应用简报展示了一种克服该障碍的新型二维液相色谱方法。该方法使用 HIC、多中心切割 (MHC)，随后使用在线体积排阻色谱 (SEC) 进行脱盐和分离，再使用非变性 MS 进行分析。该工作流程使用 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统、Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF、Agilent MassHunter 工作站 11.0 软件和 Agilent MassHunter BioConfirm 11.0 软件。

前言

ADCs 被视为一类新的生物治疗药物，在癌症治疗方面显示出极具前景的结果。与传统人类 mAb 治疗药物不同，ADCs 在抗原特异性选择性和效率方面表现出色，因为这些 ADCs 由单克隆抗体与具有生物活性的细胞毒性小分子药物化学连接而成[1]。最初成功的两种 ADCs 是通过 mAbs 的赖氨酸侧链（Kadcyla，T-DM1）和半胱氨酸残基（brentuximab vedotin 维布妥昔单抗，商品名 Adcetris，来自 Takeda）偶联获得。Adcetris 由部分还原的 mAb 通过半胱氨酸残基的自由硫醇基团与药物小分子（一甲基澳瑞他汀 E，MMAE）偶联得到。通常会观察到每个抗体偶联 0、2、4、6 和 8 个药物分子的混合物（图 1）。与 mAb 偶联的平均药物分子数量 (DARs) 是 ADC 最重要的关键质量属性之一，因为它直接影响 ADC 的安全性和有效性。

尽管 ADCs 的表征和 DAR 值的测定看起来简单而且从分析的角度来看是可行的，但 ADCs 比“未偶联”的 mAb 或药物小分子要复杂得多。这种复杂性是由其结合的化学连接子和偶联位点的异质分布造成的。因此，ADC 表征和稳定性（或 DAR 值）监测可能具有挑战性。

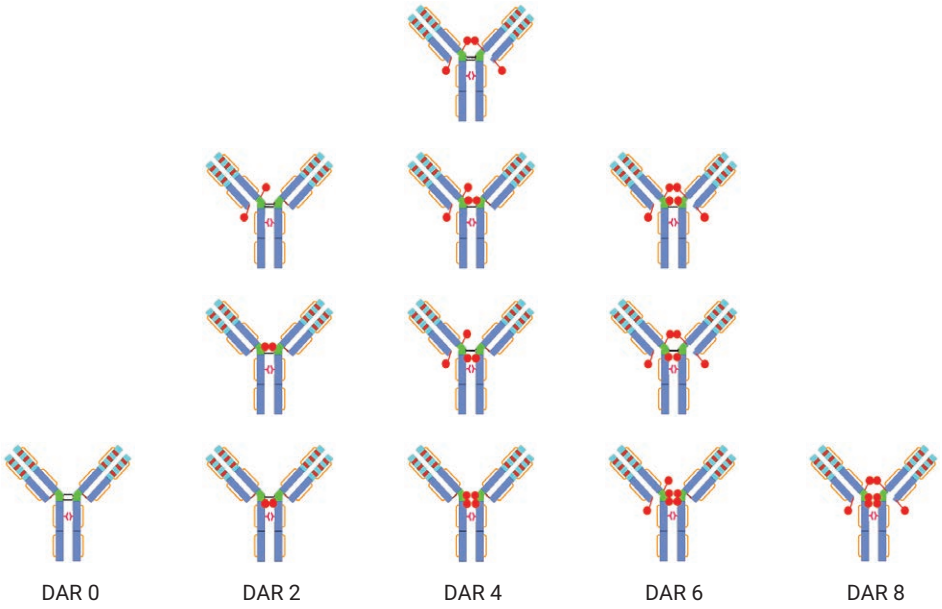


图 1. 半胱氨酸连接的 ADCs（维布妥昔单抗）中的各种药物分布

传统上，分析 ADCs 以表征化学稳定性问题并确定 DAR 值可以通过各种分析技术来完成，例如 UV-Vis、荧光、DSC 和 SEC-MALS 检测。近来，HIC 已成为确认半胱氨酸偶联 ADCs 的 DAR 值的重要技术[2]。与抗体化学连接的药物小分子通常是疏水性的。因此，ADC 的整体疏水性随着其 DAR 值的增大而增加，使 HIC 成为 DAR 监测的理想工具。HIC 的一个缺点是其通过运行高浓度的非挥发性盐缓冲液来分离蛋白质，这与后续的 MS 分析不兼容。为了克服这一分析障碍，本研究开发了一种在第二维中使用反相色谱柱的二维液相色谱解决方案。在该在线 2D-LC/MS 方法中，可以使用 MHC 或高分辨率模式从第一维 HIC 分离中选择目标蛋白质峰（具有各种 DAR 值的 ADCs）。随后由第二维 RP 柱进行脱盐和分离，然后再进行 MS 分析。

新的 MassHunter 工作站 11.0 软件现在可以在同一软件中控制 2D-LC 和 MS。一款综合性软件使多维实验（例如在 MS 检测前进行色谱分离和后续脱盐的 ADCs 分析）更容易执行。Agilent ChemStation

软件中的大部分二维液相色谱采集功能现在都可以在 MassHunter 中实现，包括 MHC 和全二维液相色谱，以及基于时间和峰的二维液相色谱分析。此软件版本还包括一些新功能，例如具有高分辨率采样功能的全新多重进样方法和 MHC 工作流程的采集后文件拆分功能。多重进样方法使用户能够从第一维宽峰上采集多个馏分，并且与高分辨率方法单独进样每个馏分不同，此方法可以将这些馏分全部同时进样以进行单次第二维分析。多重进样方法增加了可以从第一维转移到第二维的样品量，而无需更改硬件，并且由于所需的第二维运行次数减少，因此减少了总运行时间。现在，2D-LC 和 MS 由同一个软件控制，因此只生成一份 Agilent MassHunter .d 数据文件。对于 MHC 实验，此数据文件按采集顺序将所有单独的二维运行串在一起。新的文件拆分实用程序将此数据文件拆分为单独的第二维 LC/MS .d 文件，并根据在 LC 第一维中的切割顺序进行命名。文件在采集完成后立即拆分，从而简化了用户流程。现在，2D-LC 数据文件已拆分为基本的 1D-LC/MS 数据文件，使许多数据分析工作流程成为可能。

虽然 2D-LC (HIC + RP) 实验在各种 ADCs 的分离和随后的脱盐方面取得了成功，但也观察到药物有效载荷 (MMAD) 的明显降解和 mAb 变性。经证实，ADC 的降解主要是由于在二维反相色谱中使用有机和酸性溶剂所致。

本研究开发了一种用于表征天然完整维布妥昔单抗并准确测定 DAR 值的新型非变性 2D-LC/MS 分析方法。该工作流程采用 1290 Infinity II 二维液相色谱系统，通过多种 Agilent AdvanceBio 色谱柱（AdvanceBio HIC 和 AdvanceBio SEC）进行样品分离，并使用具有大分子 SWARM 自动调谐功能和质量数范围扩展至 *m/z* 30000 的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 进行非变性 MS 分析（图 2）。



图 2. 2D-LC 和非变性 MS 蛋白质分析工作流程的分析组件

实验部分

材料与方法

硫酸铵、磷酸二氢钠一水合物、磷酸氢二钠七水合物和醋酸铵均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。

ADC 样品

将冻干的维布妥昔单抗溶解于溶剂 A，浓度为 50 mg/mL。每次 2D-LC/MS 分析进样量大约为 10–20 µL。

注：由于 Adcetris 药物中含有许多佐剂，因此该浓度不是单纯的蛋白质或 ADC 浓度，而是代表了 ADC 药物样品中所有成分的总浓度。

第一维 (HIC) 缓冲液配制

- 缓冲液 A：2 mol/L 硫酸铵溶于 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液，pH 7
- 缓冲液 B：100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7) + 25% 异丙醇

为制备 2 L 100 mmol/L 的 pH 7 磷酸盐缓冲液，使用了 11.68 g 磷酸二氢钠一水合物和 30.94 g 磷酸氢二钠七水合物。加入去离子水至 2 L 总体积，并将溶液的 pH 值调节至 7。为配制缓冲液 A，将 264.28 g 硫酸铵置于 1 L 瓶中，并加入 100 mmol/L 磷酸盐缓冲液，使总体积为 1 L。为制备缓冲液 B，使用 250 mL 异丙醇和 750 mL 磷酸盐缓冲液。

仪器

Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱，包括：

- 两台 Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备 Agilent Infinity II 样品冷却装置（选件编号 100）
- Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117A)
- Agilent 1290 Infinity II DAD (G7117B)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 Agilent InfinityLab 2D-LC ASM 阀，1300 bar（部件号 5067-4266）
- 两个 Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备带 40 µL 定量环的安捷伦多中心切割阀 (G4242-64000)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备分流阀 2 位/6 通超高压阀头，1200 bar（部件号 5067-4241）
- 配备安捷伦双喷射流 ESI 离子源的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/QTOF 系统

色谱柱

- 第一维：Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm, 3.5 µm（部件号 685975-908）
- 第二维（变性条件）：Agilent PLRP-S 1000Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm（部件号 PL1912-1502）
- 第二维（非变性条件）：Agilent AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 µm（部件号 PL1580-5201）

2D-LC/MS 分析

在 1290 Infinity II 2D-LC 系统与配备喷射流 ESI 离子源的 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 的联用系统上进行 2D-LC/MS 分析。将用于 LC/TOF 和 LC/Q-TOF 的 MassHunter 工作站 11.0 版软件与 2D-LC 中的新功能（即多重进样方法和文件拆分实用程序）以及大分子 SWARM 自动调谐功能配合使用。

将从第一维 LC 中收集的 HIC 峰馏分进样至第二维 LC/MS 进行分析。过去，完整 mAb 或完整 ADC 在变性条件下的 LC/MS 分析是通过传统的 RP HPLC 方法进行的。采用 PLRP-S 色谱柱，使用乙腈（作为有机溶剂）以及 0.1% 甲酸。

非变性 LC/MS 条件下的 ADC 样品表征是通过在第二维使用 AdvanceBio SEC 色谱柱以及 14 分钟等度运行（使用 100 mmol/L 醋酸铵溶剂）实现的。

对于第二维 AdvanceBio SEC 色谱柱，其在运行结束时而非开始时洗脱盐分，因此分流阀反向连接。因此，第二维液相色谱运行前 7 分钟的液流进入 MS，后部分的液流（含盐）流入废液。与不使用分流阀相比，此配置下进入 MS 的盐更少。

表 1 和表 2 列出了所采用的详细 LC/MS 参数。

数据处理

使用 MassHunter 定性分析 10.0 和 BioConfirm 11.0 软件处理变性和完整 ADC 的所有 LC/MS 数据文件。

表 1. 液相色谱参数

第一维	
色谱柱	Agilent AdvanceBio HIC, 4.6 × 100 mm, 3.5 µm（部件号 685975-908）
恒温箱	4 °C
溶剂 A	2 mol/L 硫酸铵，溶于 100 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 7.0
溶剂 B	100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0) + 25% IPA
梯度	0–17 min，30%–100% B 17–27 min，100% B
柱温	室温
流速	0.4 mL/min
进样量	20 µL 20–50 mg/mL 维布妥昔单抗
紫外检测	280 nm，10 Hz
采用变性条件的第二维	
色谱柱	Agilent PLRP-S 1000Å, 2.1 × 50 mm, 5 µm（部件号 PL1912-1502）
恒温箱	4 °C
溶剂 A	0.1% 甲酸去离子水溶液
溶剂 B	0.1% 甲酸的 100% 乙腈溶液
梯度	0–1 min，0–20% B 1–3 min，20%–50% B 3–4 min，50%–70% B
柱温	60 °C
流速	0.5 mL/min
采用非变性条件的第二维	
色谱柱	Agilent AdvanceBio SEC 200Å, 4.6 × 300 mm, 1.9 µm（部件号 PL1580-5201）
恒温箱	4 °C
溶剂 A	100 mmol/L 乙酸胺缓冲液，pH 7.0
等度洗脱	0–14 min，100% A
柱温	室温
流速	0.4 mL/min

表 2. 变性和非变性 MS 数据采集参数

Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 系统		
样品类型	ADC（变性）	ADC（非变性 MS）
离子源	安捷伦喷射流 ESI	安捷伦喷射流 ESI
干燥气温度	350 °C	365 °C
干燥气流速	12 L/min	12 L/min
雾化器	60 psig	35 psig
鞘气温度	400 °C	300 °C
鞘气流速	11 L/min	12 L/min
毛细管电压	5500 V	5500 V
喷嘴电压	2000 V	2000 V
碎裂电压	380 V	300 V
锥孔电压	140 V	220 V
四极杆 amu	*m/z* 500	*m/z* 3000
质量数范围	*m/z* 100–10000	*m/z*
采集速率	1.0 幅谱图/秒	1.0 幅谱图/秒
采集模式	正离子，扩展 (*m/z* 10000) 质量数范围	正离子，扩展 (*m/z* 10000) 质量数范围

结果与讨论

ADCs

本研究使用维布妥昔单抗作为目标 ADC 进行理化稳定性研究。该 ADC 是一种基于半胱氨酸的马来酰亚胺硫醇偶联物，广泛用于配体介导的给药系统。我们还对其 DAR 值测定和具体降解情况进行了详细研究。在维布妥昔单抗偶联物中，各种药物小分子（一甲基澳瑞他汀 E，MMAE）通过蛋白酶可裂解连接子与 IgG1 mAb 半胱氨酸残基的自由硫醇基团进行位点特异性偶联。总体药物分布范围为每个 mAb 偶联 0、2、4、6 或 8 个药物分子。

DAR 测定

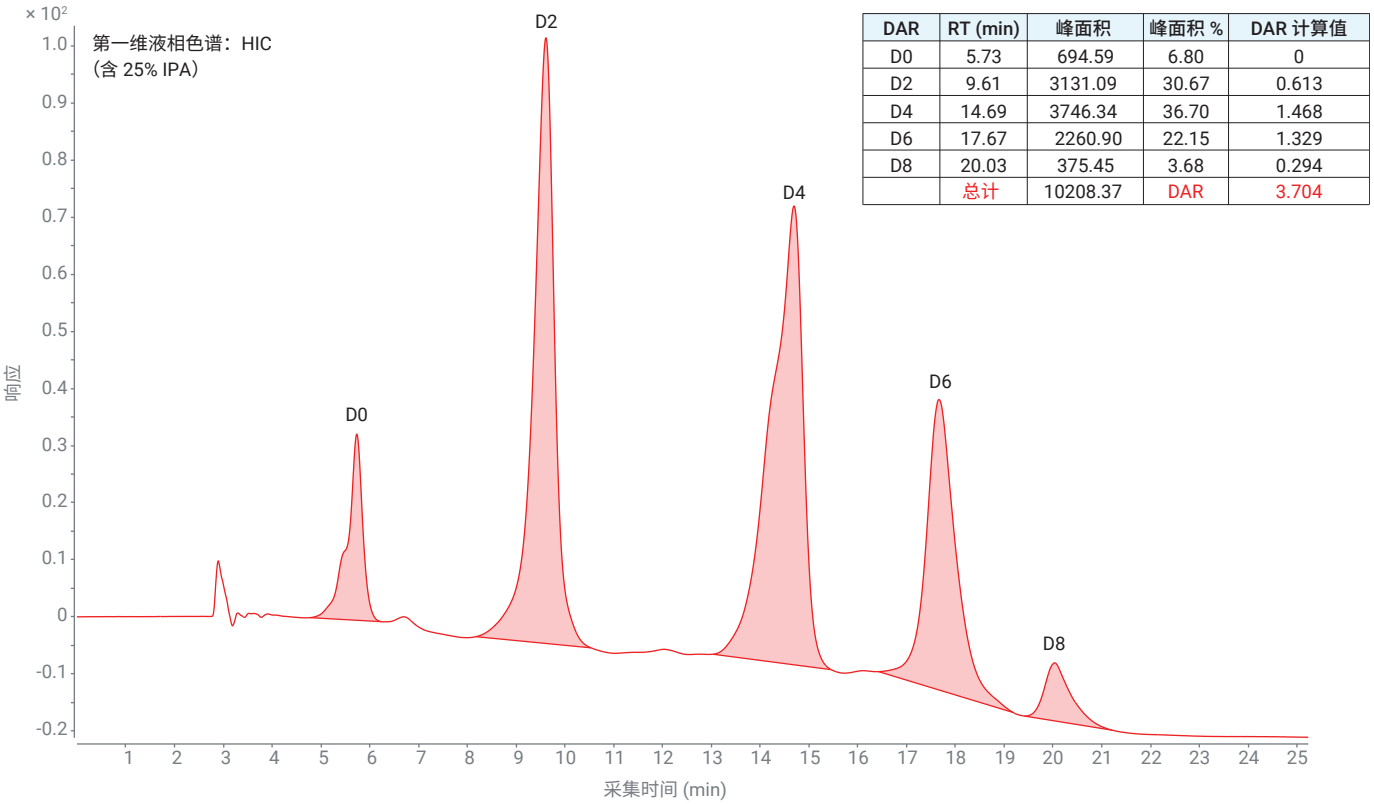
HIC 是一种常用的分析技术，通过从高到低的盐梯度分离蛋白质。由于其运行条件温和（中性 pH），因此可以保留天然的完整 ADC 结构。ADC 分子的相对疏水性随着连接在抗体上的药物分子数量增多而增加。因此，HIC 技术是分离各种 ADCs 和测定 DAR 值的理想工具。

图 3 显示了使用 HIC（第一维），通过 25 分钟 LC 梯度对各种 ADCs（D0 至 D8）实现了出色的色谱分离。将少量有机溶剂（25% 异丙醇）添加到溶剂 B 中以有效洗脱 D8 分子。HIC 结果可用于直接确定 DAR 值。通过对不同 DAR 变体的峰面积进行积分，计算得到整体 DAR 约为 3.7（图 3 中的表格），这与维布妥昔单抗的预期结果一致[3]。

用于 mAb-药物偶联物表征的新型 2D-LC/MS 系统

2D-LC/MS 关键特征：

- MassHunter 工作站 11.0 软件可控制二维液相色谱和质谱系统（图 4）
- 2D-LC 采集程序包括多中心切割和全二维模式
- 多重进样方法使用户能够从第一维宽峰上采集多个馏分，将这些馏分全部同时进样以进行单次第二维分析
- 新的文件拆分实用程序将单个数据文件拆分为单独的第二维 LC/MS .d 文件，并根据在第一维中的切割位置进行命名（图 5）



DAR	RT (min)	峰面积	峰面积 %	DAR 计算值
D0	5.73	694.59	6.80	0
D2	9.61	3131.09	30.67	0.613
D4	14.69	3746.34	36.70	1.468
D6	17.67	2260.90	22.15	1.329
D8	20.03	375.45	3.68	0.294
	总计	10208.37	DAR	3.704

图 3. 在 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱系统上对维布妥昔单抗进行 HIC 分离和 DAR 测定。D0–D8 指与 mAb 结合的药物分子数量

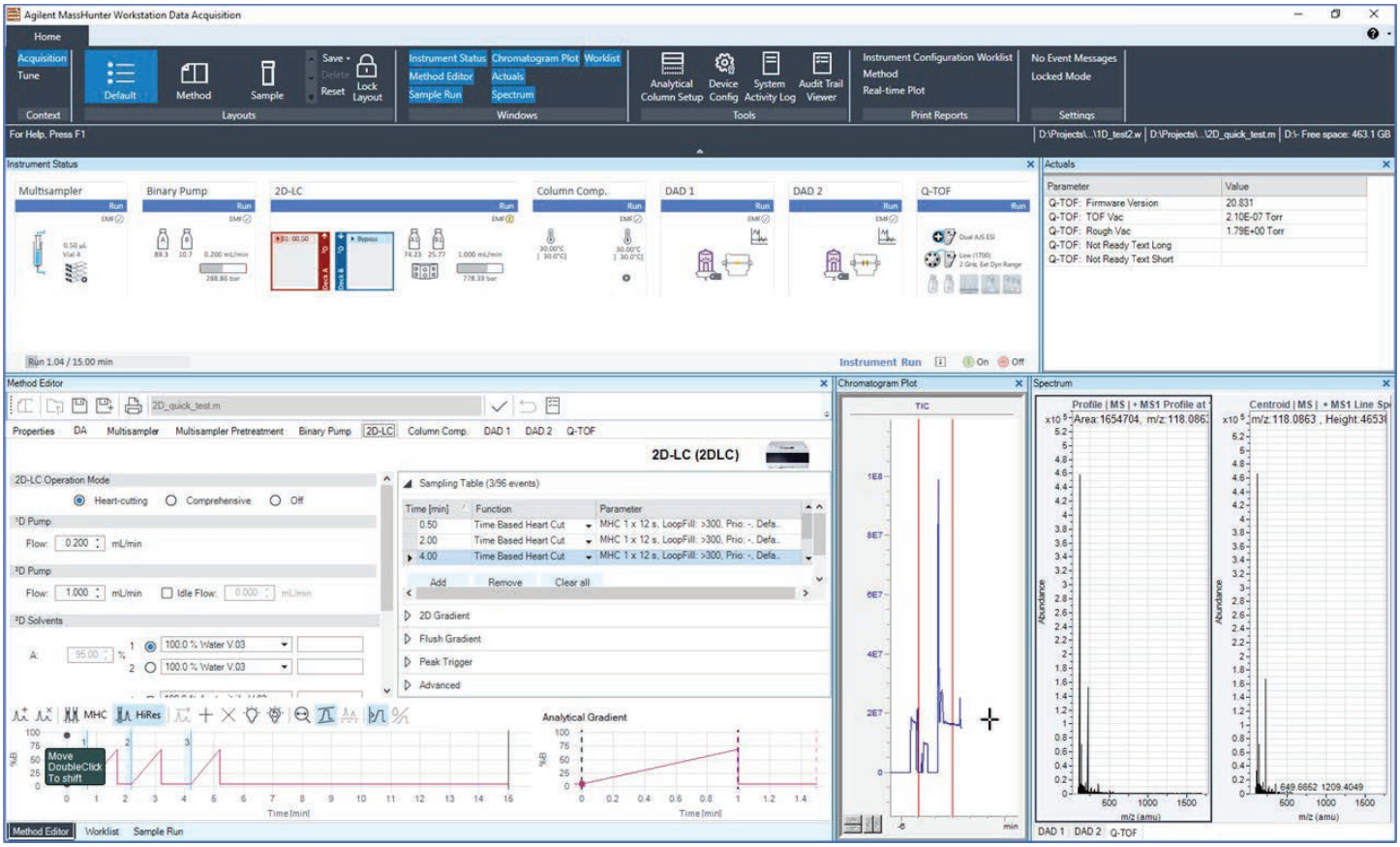


图 4. Agilent MassHunter 工作站 11.0 软件的屏幕截图，展示了在样品分析过程中通过单一软件平台控制二维液相色谱和质谱系统

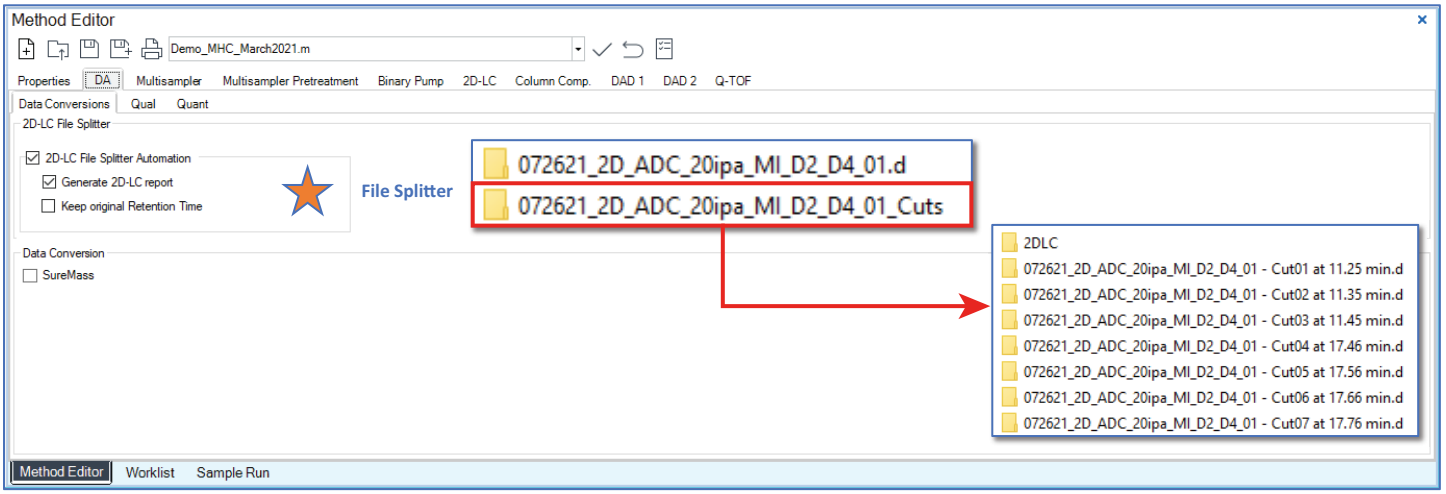


图 5. 文件拆分实用程序将单个完整数据文件拆分成单独的第二维 LC/MS 数据文件，这些文件根据第一维 LC 切割的时间命名。拆分的第一维 LC/MS 数据文件支持多种数据分析工作流程

变性条件下完整 mAb 药物偶联物的 2D-LC/MS 分析

为了进一步研究和表征完整 ADCs，通过 MHC 或高分辨率模式收集来自第一维 HIC 运行的各 DAR 变体峰。随后通过二维 RP LC/MS 分析对这些馏分进行了分析。使用 PLRP-S 色谱柱，梯度为 8 min，流速为 0.5 mL/min。

图 6 显示了 DAR 值为 6 (D6) 的完整 ADC 的 LC/MS 谱图。在 RP 条件下（有机和酸性溶剂），此完整 ADC 发生变性并在 UV 色谱图中显示多个峰（图 6，左）。使用 20–160 kDa 的 MS 解卷积质量范围对峰 1 和峰 2 进行 MS 数据解卷积和与 mAb 加药物小分子的质量数匹配。这一宽质量数范围应能涵盖从 mAb 轻链到 DAR 为 8 的完整 ADC。MS 解卷积结果表明，检测并鉴定得到许多降解/还原的 mAbs 或 ADCs，如图 6（右）所示。这些降解的分子为：mAb 轻链 + 一个药物分子、半 mAb + 两个药物分子、半 mAb + 重链 + 1 个药物分子、mAb 重链 + 三个药物分子，等等。同样，在其他 RP 峰中检测到许多降解的 ADCs。这些结果表明大多数 ADC 在变性 LC/MS 条件下解离。在半胱氨酸偶联的 ADCs 中，药物小分子通过其部分还原的二硫键与 mAb 偶联。因此，之前的强二硫键连接被打断，通过弱静电相互作用结合在一起的新 ADC 结构变为不稳定分子，在有机/酸条件下更易分解。因此，需要非变性 LC/MS 分析来表征这些完整的 ADC 分子。

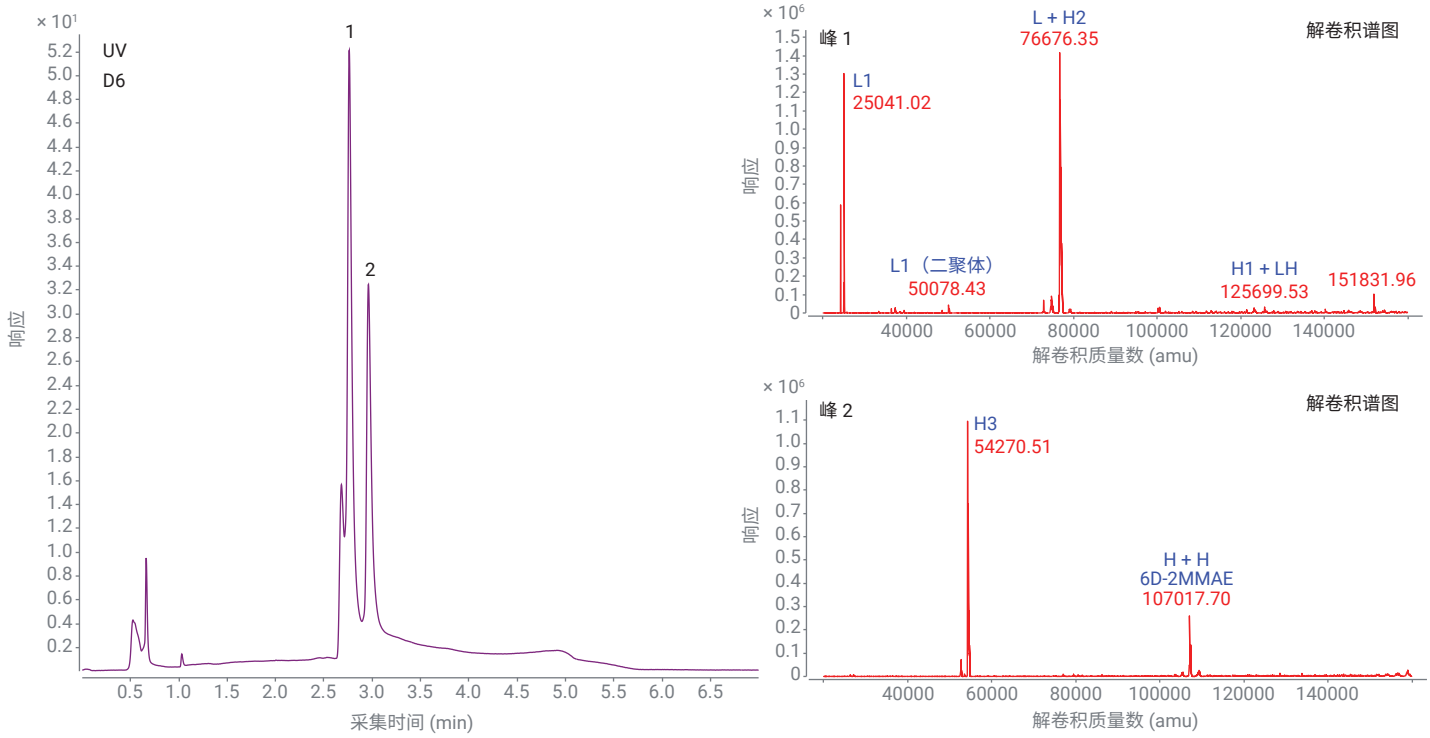


图 6. HIC 分离的 ADC 样品 (D6) 的二维液相色谱（Agilent PLRP-S，UV）和解卷积质谱图。LC/MS 分析在变性 MS 条件下进行。检测到各种已降解的 ADC 分子。L1: mAb 轻链 + 1 个药物分子；L + H2：半 mAb + 2 个药物分子；H1 + LH：半 mAb + 重链 + 1 个药物分子；H3：mAb 重链 + 3 个药物分子；H + H + 6D-2MMAE：2 重链 + 6 个药物分子，但失去 2 个 MMAE 分子

完整 mAb-药物偶联物的非变性 2D-LC/MS 分析

在许多基于蛋白质的应用中，非变性 MS 已成为广泛使用的技术，这些应用包括蛋白质间相互作用、非共价蛋白质复合物结构、蛋白质-配体结合、蛋白质折叠和抗体-药物偶联物。由于在 LC/MS 分析过程中不使用有机溶剂和酸，观察到的蛋白质降解较少，并且可以保留非共价蛋白质-蛋白质复合物的完整性[4,5]。然而，由于在 LC/MS 分析中使用中性 pH 溶剂（100 mmol/L 醋酸铵，pH 7），观察到一些主要的 MS 分析问题，例如较高 *m/z* 范围内的低丰度 MS 信号以及每个分子所带电荷更少。

本研究开发了一种高灵敏度的非变性 MS 方法，用于分析从第一维 HIC 分离中收集的各种 ADC 样品。此工作流程使用 AdvanceBio SEC 色谱柱进行第二维在线样品分离。

图 7 展示了 ADC (DAR 2) 样品非变性 LC/MS 分析的 SEC 色谱柱分离效果。该样品从第一维 HIC 分离。因此，样品在第二维 AdvanceBio SEC 色谱柱上只有一个 LC 峰。图 7A 显示了完整 DAR 2 样品的原始质谱图，质谱电荷分布包迹为 *m/z* 5500–10000（16+ 至 27+）。解卷积质谱（图 7B）表明该样品中只有 ADC DAR 2。

放大的质谱图（图 7B，插图）表明，6545XT 系统具有出色的 MS 分辨率，所有三种主要糖型均得到分离，并且在非变性 LC/MS 条件下实现了出色的 MS 准确度（约 10 ppm，Δm = 1.6 Da）。

同样，所有 DAR 0 至 DAR 6 样品均获得了出色的 MS 谱图质量和检测灵敏度，如图 8 所示。对这些 MS 数据的 MS 解卷积分析证实了其 DAR 数值是正确的，并具备出色的 MS 准确度（图 9）。

由于 DAR 8 样品丰度较低以及较高 IPA 含量下样品降解，无法在非变性 LC/MS 分析下采集其 MS 数据。

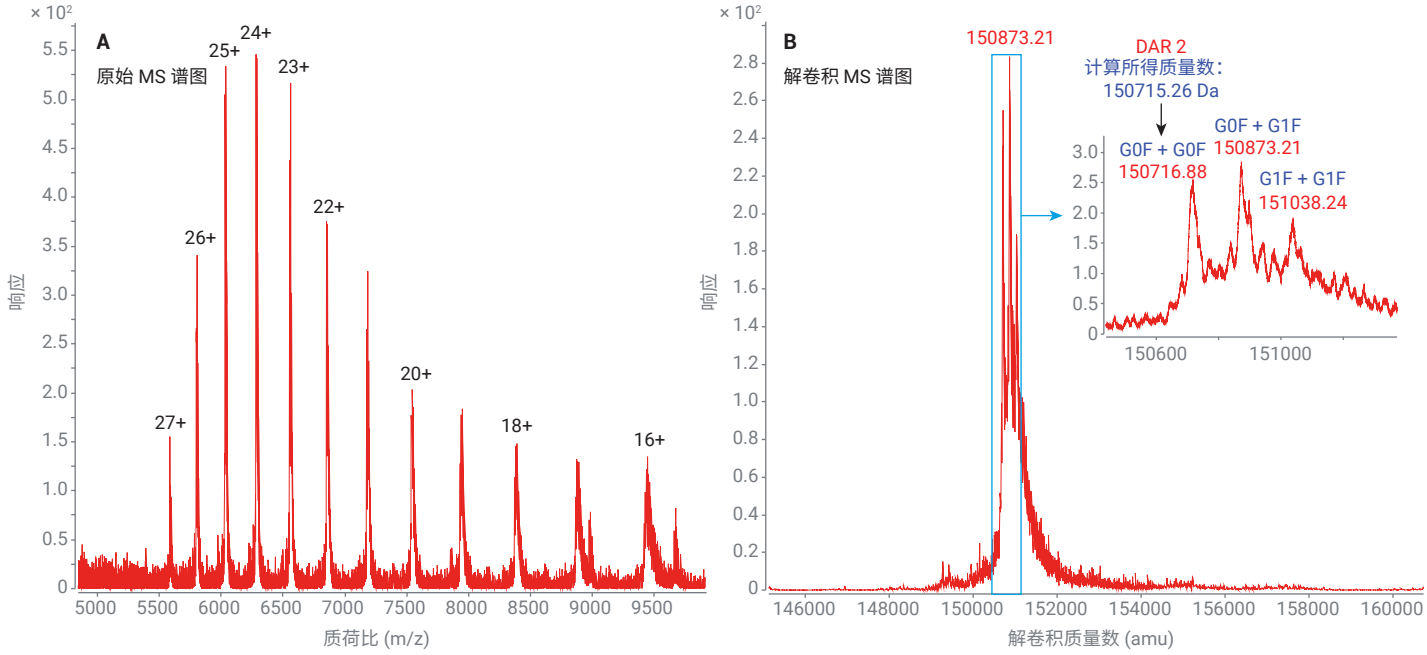


图 7. ADC (DAR 2) 的非变性 LC/MS 分析结果。(A) 非变性 MS 条件下完整 ADC DAR 2 的原始 MS 谱图。(B) 完整 ADC (DAR 2) 的解卷积质谱图

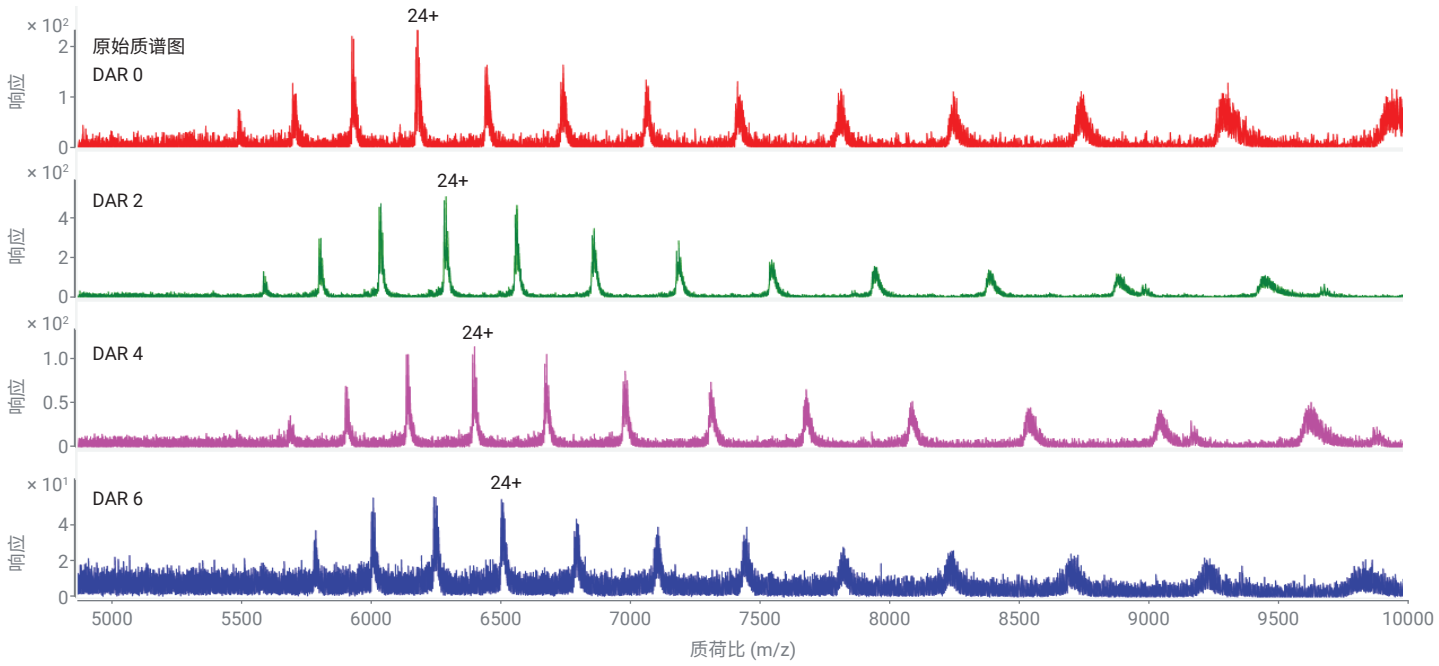


图 8. 各种 ADC DARs（DAR 0 至 DAR 6）的非变性 SEC LC/MS 分析原始质谱图

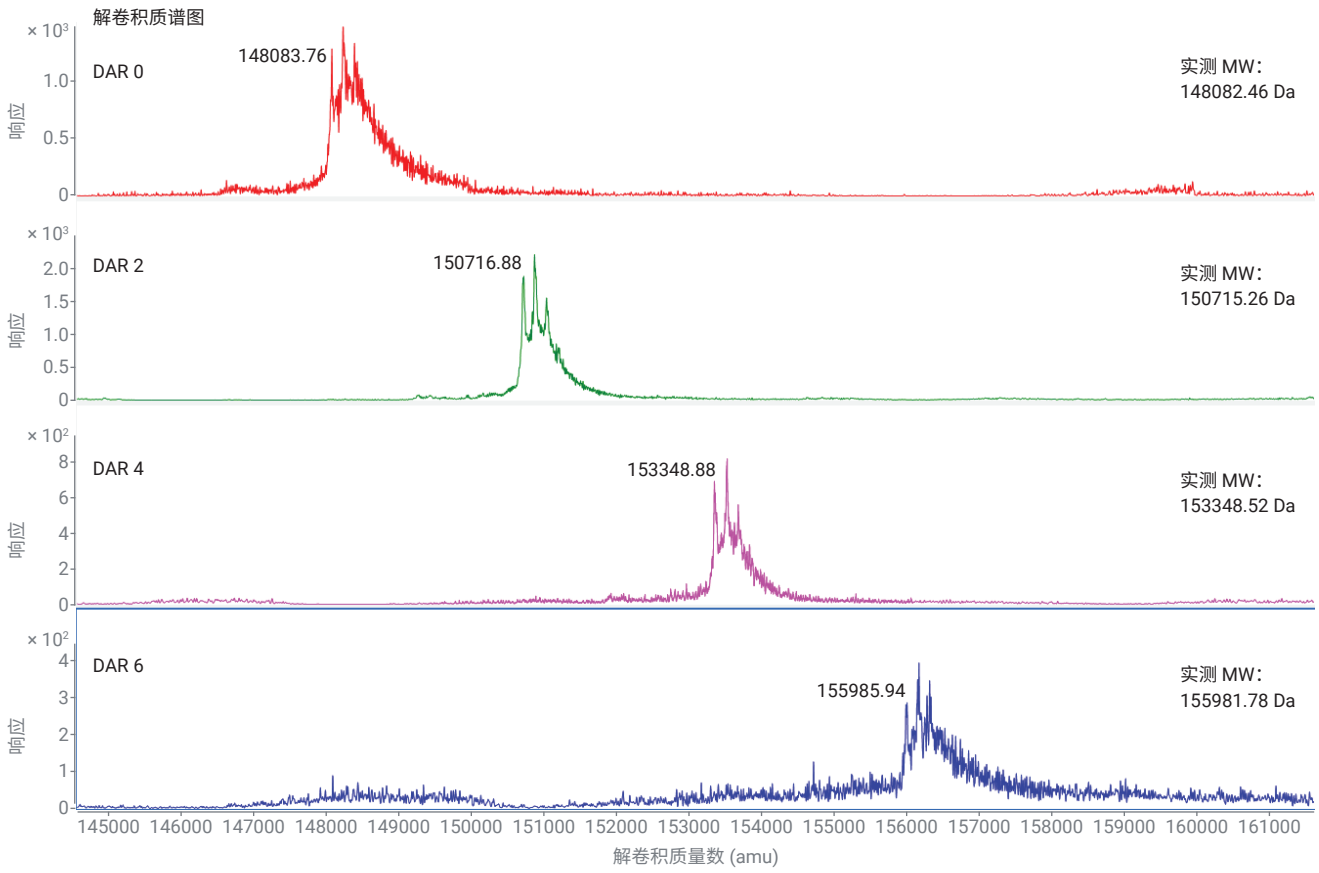


图 9. 各种 ADC DARs（DAR 0 至 DAR 6）的非变性 SEC LC/MS 分析解卷积质谱图

结论

安捷伦开发了一种新型 2D-LC/MS 方法，用于在非变性 LC/MS 条件下表征各种完整 ADCs。这一优化的工作流程使用配备 Agilent AdvanceBio HIC 色谱柱、Agilent AdvanceBio SEC 色谱柱的 Agilent 1290 Infinity II 二维液相色谱和质量数范围扩展至 *m/z* 30000 的 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF。数据采集和分析采用 Agilent MassHunter 工作站 11.0（用于 LC/TOF 和 LC/Q-TOF）和 Agilent MassHunter BioConfirm 11.0 软件。

此非变性 MS 分析方法不仅可以为 ADC 样品提供准确的平均 DAR 值，还可以实现出色的色谱分离，保留完整的天然结构，并对具有各种 DARs 的所有 ADCs 进行准确的完整质量数测定。

参考文献

1. Ross, P. L. *et al.* Physical and Chemical Stability of Antibody Drug Conjugates: Current Status. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2016**, *105*, 391–397
2. Schneider, S. 高盐 — 高重现性：使用 Agilent 1290 Infinity II 生物液相色谱系统通过疏水相互作用色谱分析抗体药物偶联物，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-2691ZHCN，**2020**
3. Van de Donk, N. W. C. J.; Dhimolea, E. Brentuximab Vedotin. *mAbs* **2012**, *4(4)*, 458-465
4. Wong, D. 使用标准流 LC/MS 进行灵敏的大分子非变性质谱分析，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-1739ZHCN，**2020**
5. Wong, D. Mass Spectrometric Characterization of Antibody-siRNA Conjugates using the Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF（使用 Agilent 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 对抗体-siRNA 偶联物进行质谱表征），*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5994-2155EN，**2020**

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

DE44508.299525463

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，2021

2021 年 11 月 30 日，中国出版
5994-4328ZHCN

Agilent
Trusted Answers