

CE-MS 在亚基水平对ADC的表征分析

目的

采用PS1型中性涂层毛细管，通过电渗流泵驱动的同轴鞘流液 EMASS-II 型 CE-MS 联用离子源，实现 CE-MS 在亚基水平对ADC的表征分析。

背景

抗体偶联药物 (Antibody Drug Conjugates, 简称ADCs), 是将抗肿瘤毒性小分子通过化学键与单克隆抗体 (monoclonal antibody, 简称mAb) 结合形成的偶联物。利用抗体可特异性识别肿瘤细胞的特性, 可“精确”地将抗肿瘤毒性小分子运送至肿瘤细胞, 不仅可以提高肿瘤部位药物浓度, 同时也降低了正常组织、器官的药物浓度, 达到了高效低毒的抗肿瘤效果。对于ADC药物的结构表征, 尤其是药物偶联位点和药物抗体偶联比率 (DAR) 的测定对于药物的安全性和有效性都极为重要。CE-MS 通过对 mAb 和 ADC 经 IdeS 酶切还原后的亚基进行快速分离和质谱分析, 可以准确确定药物偶联位点和DAR等重要信息。采用PS1型中性涂层毛细管, 通过电渗流泵驱动的同轴鞘流液EMASS-II型CE-MS联用离子源, 实现CE-MS 在亚基水平对ADC的表征分析。

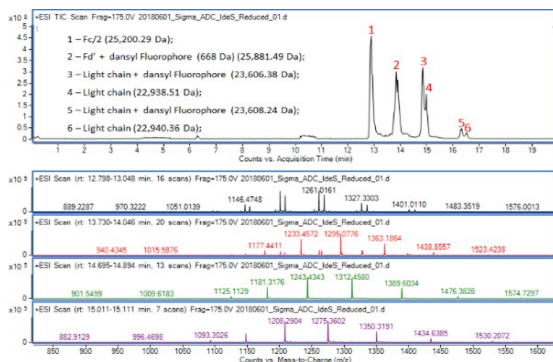


图2. ADC亚基的总离子流电泳图和各亚基对应的质谱图

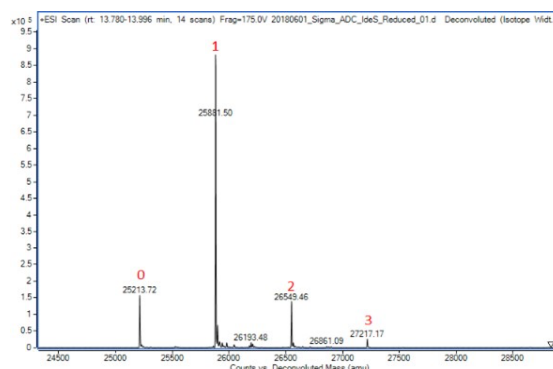


图3. ADC Fd' 亚基的解卷积分谱图, 红色数字表示药物结合的数目

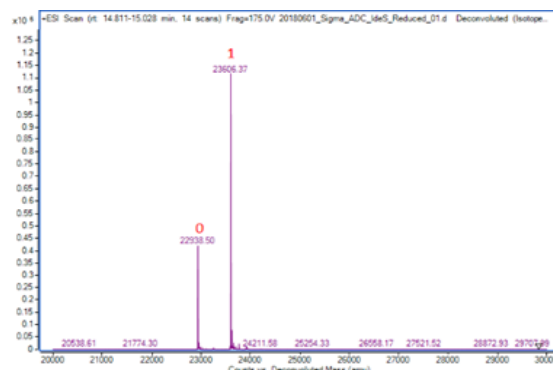


图4. ADC轻链亚基的解卷积分谱图, 红色数字表示药物结合的数目

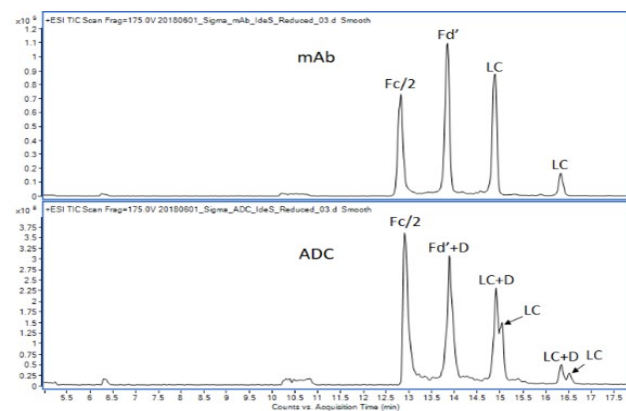


图1. CE-MS对mAb和ADC的亚基进行对比分析, 可以观察到药物偶联位点位于ADC的Fd' 和LC亚基上

解决方案

仪器试剂:

CMP Scientific ECE-001型毛细管电泳仪。CMP EMASS-II型CE-MS联用离子源 (CMP Scientific, P/N: EM3001-A)。60cm PS1 中性涂层毛细管 (PS1, 60 cm (CMP Scientific, E-SC-PS1-360/150-50-60-B1)。BGE: 30% 乙酸。SL: 5% 乙酸和 10% 甲醇。

实验方法:

样品进样 100 mbar, 15 s。分离电压: 30 kV (15 μ A)。喷针至锥孔: 4 mm (不使用锥孔挡板)。喷针从毛细管伸出长度: 0.6mm。

质谱参数:

扫描范围: 700-2,000 m/z。Fragmentor 电压: 175 V。干燥气: 350°C, 2 L/min。Quad AMU: 500。碰撞能量: 0 V。VCap: 0V (毛细管电流 0.36 μ A)。ESI: 1.9 kV。

样本制备:

IdeS 酶切: mAb和ADC样品各20 μ g, 分别加入300 μ L的20 mM Tris, pH 8.0, 采用 10 kDa超滤管超滤, 14000 \times rcf离心10 min; 添加1 μ L (20 units/ μ L)的IdeS酶, 37°C, 30min。

还原: 加入2 μ L 1 M DTT, 37°C, 30min; 然后加入300 μ L 100 mM 乙酸铵、4% 乙酸、14000 \times rcf 离心 10 min; 终浓度为 0.6mg/mL。

结果

对mAb和ADC亚基进行比较分析

mAb 经过IdeS酶切后还原, 可以得到 Fc/2, Fd' 和LC亚基, 经过CE分离后可以得到四个电泳峰, 分别对应 Fc/2、Fd'、LC 亚基和 LC 亚基 (脱酰胺修饰)。相同条件下, ADC可以得到六个电泳峰, 与 mAb 相比可以发现, 药物偶联的位点发生于Fd' 和 LC上 (见图1), 图2为 ADC 亚基的总离子流电泳图和各主峰对应的质谱图。

药物抗体偶联比率分析

对发生药物偶联的Fd' 和LC质谱图进行数据处理, 得到解卷积后的质谱图 (见图3和图4)。通过数据处理软件可以获得准确的药物抗体偶联比率 (DAR)。

总结

采用PS1型阳离子涂层毛细管, 通过采用电渗流驱动鞘流液的EMASS-II离子源, 将毛细管电泳分离的优势和高分辨质谱技术的定性能力相结合, 使CE-MS可以高效地应用于ADC药物的结构表征分析中。本案例采用IdeS对ADC酶切后进行还原, 通过CE-MS对ADC的亚基进行分析, 可以对药物偶联的位点进行确认, 同时获得药物抗体偶联比率 (DAR) 等关键质量属性信息。