

应用电子活化解离（EAD）技术进行抗体-药物偶联物（ADC）表征

采用带有EAD的SCIEX ZenoTOF™ 7600系统和Protein Metrics公司软件

Characterization of an antibody-drug-conjugate (ADC) using electron activated dissociation (EAD)

Zoe Zhang¹, Takashi Baba², Pavel Ryumin², Bill Loyd², Jason Causon², Kerstin Pohl¹

¹ SCIEX, US; ² SCIEX, Canada

本文对ADC样品中赖氨酸连接药物进行了表征，选择了一种自下而上的方法来确定偶联的位置。利用电子活化解离（EAD）^{1,2}技术产生的离子碎片信息，可获取相关药物和连接子的详细结构信息，同时获得多肽骨架信息。

随着蛋白质工程技术的进展，抗体及其相关衍生物成为治疗药物中增长最快的一类³。ADCs是这些新的药物形式之一。ADCs通常由150 kDa单克隆抗体（mAb）与细胞毒性药物（有效载荷）通过特定偶联物（linker）共价偶联而成⁴。与未偶联的蛋白相比，ADC药物的结构复杂度和异质性更高，因为添加了多变的有效载荷和连接子，所以显著增加蛋白形式的数量⁵。为确保药物安全性和有效性，ADC的深度表征在其开发过程中至关重要。这不仅包括对mAb的翻译后修饰（PTMs）的鉴定和定位，还包括药物结合的验证。由于质谱技术的飞速发展，质谱（MS）已经成为ADC表征中最广泛使用的方法。完整质量分析是用于确定药物与抗体比率（DAR）的

常规方法，而对结合位点的深入表征，通常依赖于自下而上的方法。现在最广泛采用的碰撞诱导解离（CID）技术能够提供氨基酸序列确认，但是这种能量比较大的碎裂技术也将有效载荷分解为更小的片段，从这种方法获得的高度复杂的谱图可能很难解析。而能量更柔和的碎裂方法可以促进此类复杂样品的解析，而且CIQ技术可能需要更长的反应时间以及灵敏度低和缺乏可重复性的困扰。

一种基于EAD^{1,2}的创新、高度可重复的碎裂方法用于分析来自商业化ADC药物的偶联肽。使用10 Hz快速非靶向的数据依赖采集（DDA）方法采集数据，并使用Protein Metrics公司软件进行数据解析。通过此工作流程，一次进样就可以应用基于EAD的碎片进行常规和高级表征，从而获得可供每个用户使用的精简的表征方法。

SCIEX ZenoTOF™ 7600系统的主要功能

- **肽图分析的新深度：**具有快速DDA的EAD技术可为下一代蛋白质治疗药物和标准单克隆抗体（mAb）的常规、深度分析提供可选择的创新碎裂方法。
- **更高级别的结构信息：**通过调节电子能量来改变碎裂模式，能会提供更高级别的结构信息。
- **更高的MS / MS灵敏度：**使用Zeno™ trap (Zeno阱) 技术，可产生更多的碎片离子（5到10倍），从而提高了数据结果的置信度。
- **高重现性：**与其它碰撞碎裂技术和低重现性碎裂技术相比，使用EAD进行单电荷、双电荷和多电荷离子碎裂时，具有更高的重现性，可分析更多前体离子。
- **简单易用：**使用带有SCIEX OS软件的EAD技术，以DDA模式进行全自动数据采集，并使用Byos软件（Protein Metrics Inc.）进行自动数据解析，从而简化了分析流程、提升用户体验。

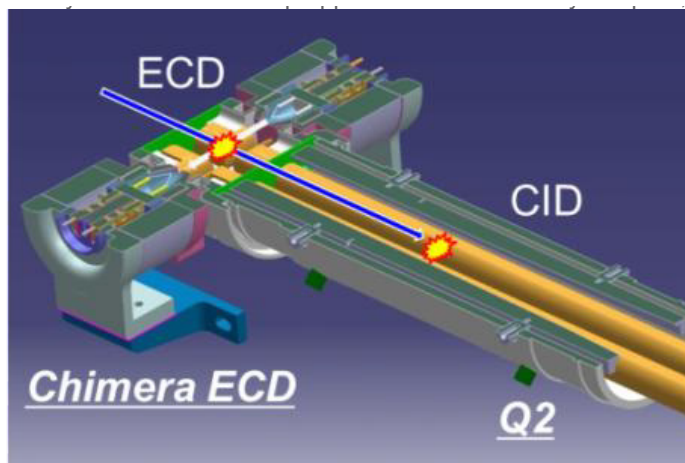


图1. EAD碰撞池的示意图。

方法

样品制备: 赖氨酸连接的ADC药物（曲妥珠单抗美坦新偶联物，T-DM1）用7.2 M盐酸胍和100 mM Tris缓冲液（pH 7.2）变性，然后加10 mM 二硫苏糖醇还原和30 mM碘乙酰胺进行烷基化。在37°C下用胰蛋白酶/ Lys-C酶消化16小时。

色谱条件: 4 μ L（4 μ g）的胰蛋白酶/ Lys-C消化液，采用ExionLC AD液相系统，通过CSH C18色谱柱（2.1 $\times$ 100 mm，1.7 μ m，130 Å，Waters）进行分离。流动相A为含0.1%甲酸的水溶液，流动相B是含0.1%甲酸的乙腈溶液。柱温保持在50 °C，流速为300 μ L/ min，流动相梯度见表1。

表1. 肽图分析的色谱方法。

时间 (min)	流动相A[%]	流动相B[%]
初始	98	2.0
5	98	2.0
6	90	10
40	55	45
44	10	90
46	10	90
47	98	2.0
50	98	2.0
51	10	90
54	10	90
55	98	2.0
60.0	98	2.0

质谱条件: 采用SCIEX ZenoTOF™ 7600系统通过信息依赖采集（IDA）方法采集数据。EAD池的电子能量设置为7 eV。详细的方法参数汇总在表2。

表2. 质谱参数。

参数	MS	MS/MS
扫描模式(Scan mode)	TOF-MS	IDA dependent
极性(Polarity)	正离子模式	
喷雾气(Gas 1)	40 psi	
加热气(Gas 2)	40 psi	
气帘气(Curtain gas)	30 psi	
离子源温度(Source temperature)	350 °C	
离子喷雾电压(Ion spray voltage)	5200 V	
去簇电压(Declustering potential, DP)	20 V	
碰撞能量(Collision energy)	8 V	
碰撞气(CAD gas)	7	
最大候选离子(Maximum candidate ion)	5	
强度阈值(Intensity threshold)	100 cps	
离子电荷(Charge states)	2 to 10	
排除时间(Exclusion time)	6 s after 2 occurrences	
起始质荷比(Start mass)	100 m/z	150 m/z
终止质荷比(Stop mass)	1,800 m/z	2,500 m/z
电子KE(Electron KE)	NA	7 eV
电子束电流(Electron beam current)	NA	4750 nA
(ETC)	NA	100
Zeno 脉冲	NA	ON
累积时间	0.25 s	0.20 s
Time bins to sum	4	4

数据处理: 采用Byos软件（Protein Metrics Inc.）进行数据解析。

是什么，为什么，怎么做

曲妥珠单抗美坦新偶联物（T-DM1）是最早的ADC治疗药物之一，于2013年获得FDA批准用于治疗人表皮生长因子受体2（HER2）阳性转移性乳腺癌。T-DM1是由单克隆抗体曲妥珠单抗和细胞毒药物美坦新（DM1）通过不可裂解连接子共价偶联而成（图2）。将单克隆抗体（mAb）的靶标特异性与细胞毒性药物的高效率相结合，可充分利用两个方面的优势，最大限度地减少副作用³。T-DM1是与氨基连接，如连接在曲妥珠单抗的赖氨酸残基的侧链中。先前的完整质量研究表明，T-DM1的平均DAR约为3.5^{5,6}。但是曲妥珠单抗中有88个赖氨酸残基和4个N端基团，可能会出现450万个以上的不同分子形式⁵。有效载荷的位点和结构将直接影响药物的功效和安全性，因此将其归类为关键质量属性（CQA），并且需要在开发过程中进行全面表征和严格监控。当前，自下而上的方法是表征产品质量属性的选择方法，可同时进行鉴定和修饰位点的定位。LC-MS/MS通常采用CID技术用于验证偶联位点，因为每个DM1都会导致大约957 amu的质量偏移。然而，采用CID碰撞技术除了导致肽段主链解离，还可能产生有效载荷药物产生一系列小片段，例如m/z 547.221、485.224和453.199离子，这增加了谱图的复杂性⁵。虽然电子捕获解离（ECD）之类的碎裂技术有望提供有关药物偶联肽的正交信息，但是其应用尚未得到广泛探索。

SCIEX ZenoTOF™ 7600系统，引入了一种强大的选择碎裂技术，使科学家能够通过将液相分离技术结合DDA快速扫描方法获取的数据，且通过Protein Metrics公司软件数据处理获得样品的深入图谱。这项突破性的技术实现了高重现性常规分析来解决复杂问题的梦想。

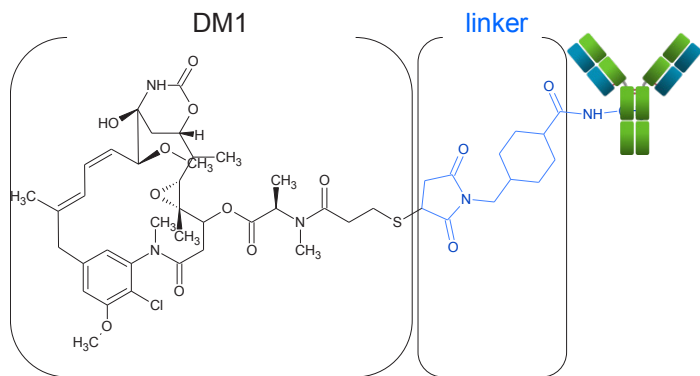


图2. 细胞毒药物有效载荷和连接子与mAb偶联的示意图。T-DM1由DM1（黑色），靶向连接氨基残基的MCC连接子（linker，蓝色）和单克隆抗体组成。

偶联肽的分析

该研究的重点是一个商品化的ADC药物：T-DM1的表征。DM1和曲妥珠单抗之间的偶联反应具有靶向氨基的随机性。在曲妥珠单抗上的88个赖氨酸残基中，有40个是溶剂暴露的⁶，因此很容易结合。多种研究完整和亚基质量的方法已经应用于研究DAR，但是这些方法无法揭示精确的偶联位点。

本研究选择了与Zeno™ EAD相结合的DDA方法。采用这种方法，不仅可以执行常规的肽图分析，而且EAD可以在同一单针分析中进行高级表征。此外，Zeno EAD增强了碎片离子的检测能力，从而正确鉴定了低丰度物质，这种方法允许使用Protein Metrics公司软件直接进行数据解析。这是针对ADC样品的SCIEX EAD技术的首次探索。图3展示了在偶联肽SCDK [DM1] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK上观察到的碎裂模式的例子。在分析中未观察到没有连接子和药物或其部分的肽，表明其完全偶联。获得了此肽段高质量的MS/MS谱图，从而使该特定肽段的MS/MS序列覆盖率达到96.6%。一个更占优势的碎片从m/z大于500的有效载荷产生（请见图3中的标记）。观察到的有效载荷结构的主要裂解位点是DM1的COO-C键，这种碎裂模式与先前利用CID技术产生的一系列小碎片的数据不同⁵。较大分子量的药物碎片可以用作特征碎片，以更具体地确认有效载荷的存在，并可以用来确认有效载荷的结构。此外，通过将Zeno EAD技术用于增强的碎片离子检测，还可以很好地检测到来自肽主链的片段信息，从而提供有关肽段的分子完整性的信息。由于酶的空间位阻，蛋白质上偶联药物的存在会导致样品制备酶解过程中的更多漏切位点。另外，赖氨酸残基和有效载荷之间的结合过程是随机反应。偶联的比率并不总是100%，这导致了多样性和低丰度物质存在。当一个肽段中存在多个潜在连接形式时，鉴定正确的连接位点可能是一个挑战。

肽段ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK是这种具有挑战性的另一个例子（图4）。它包含一个漏切位点和一个脯氨酸相邻的N端赖氨酸，导致偶联位点的多种选择。但是，有了从EAD技术碎裂得到丰富、高质量的MS/MS质谱图，就可以实现药物定位的自动匹配（图4A）。由于有效载荷靠近肽的C端，因此检测到的C离子比Z离子丰富（图4A），而未结合的肽显示出来自C端和N端的丰富片段（图4B）。众所周知因为电子捕获解离技术不会解离脯氨酸的N端，我们还检测到了除了C15以外的从C3到C17的全系列C片段⁷。这提供了确凿的证据表明K15未与细胞毒药物偶联。此外，z4，z5和z7表明K18（而非K21）是药物偶联的正确位点。

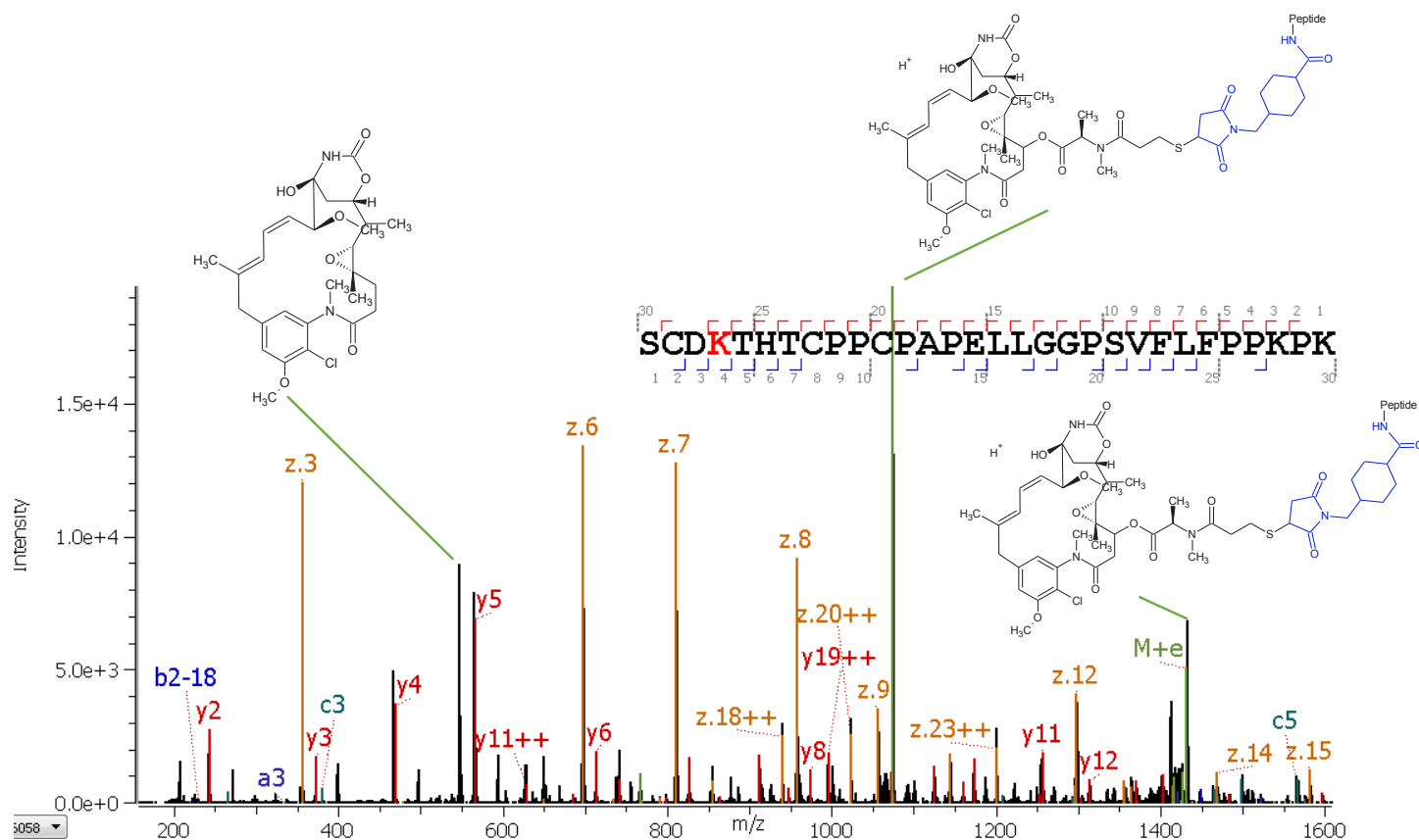


图3. 应用Zeno EAD得到的偶联肽SCDK [DM1] THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKK (z = +4) 的碎片数据。来自肽段主链指定偶联肽段离子的全扫描MS / MS数据，以及有效载荷中的碎离子信息。

这个结果进一步证明了一个事实，即偶联的赖氨酸不能被胰蛋白酶切割⁵，但K21作为连接位点除外。图4A谱图中最主要的离子 (m/z 547.221) 可以与有效载荷的解离联系在一起，这个同位素模式也支持这一发现，因为它适合包含卤素元素 (Cl) 的化合物。同时还观察到与肽连接的相关对应物 (图4A)。使用SCIEX ZenoTOF 7600系统中的Zeno EAD技术可以实现在单次DDA运行中鉴定和定位偶联肽的精确表征。以前曾被认为ADC表征是LC-MS / MS的一个挑战，这是Zeno EAD如何简化ADC分析的示例。

结论

- 通过EAD的新型碎裂技术实现了具有多个潜在位点的多肽中药物偶联的准确定位
- 与传统的MS / MS分析相比，EAD技术获得更丰富的MS/MS信息。应用Zeno EAD技术，即使对于中等强度或极低强度的前体离子 (例如低丰度的偶联肽)，也能获得令人信服的二级碎片和出色的数据质量
- SCIEX ZenoTOF™ 7600系统强大、高重现性且易于使用的多重碎裂技术，使用户能够以简单的方式解决具有挑战性的分析问题
- 使用Protein Metrics 公司的软件进行自动数据处理，可实现复杂生物治疗药物的可重现、常规和高级表征

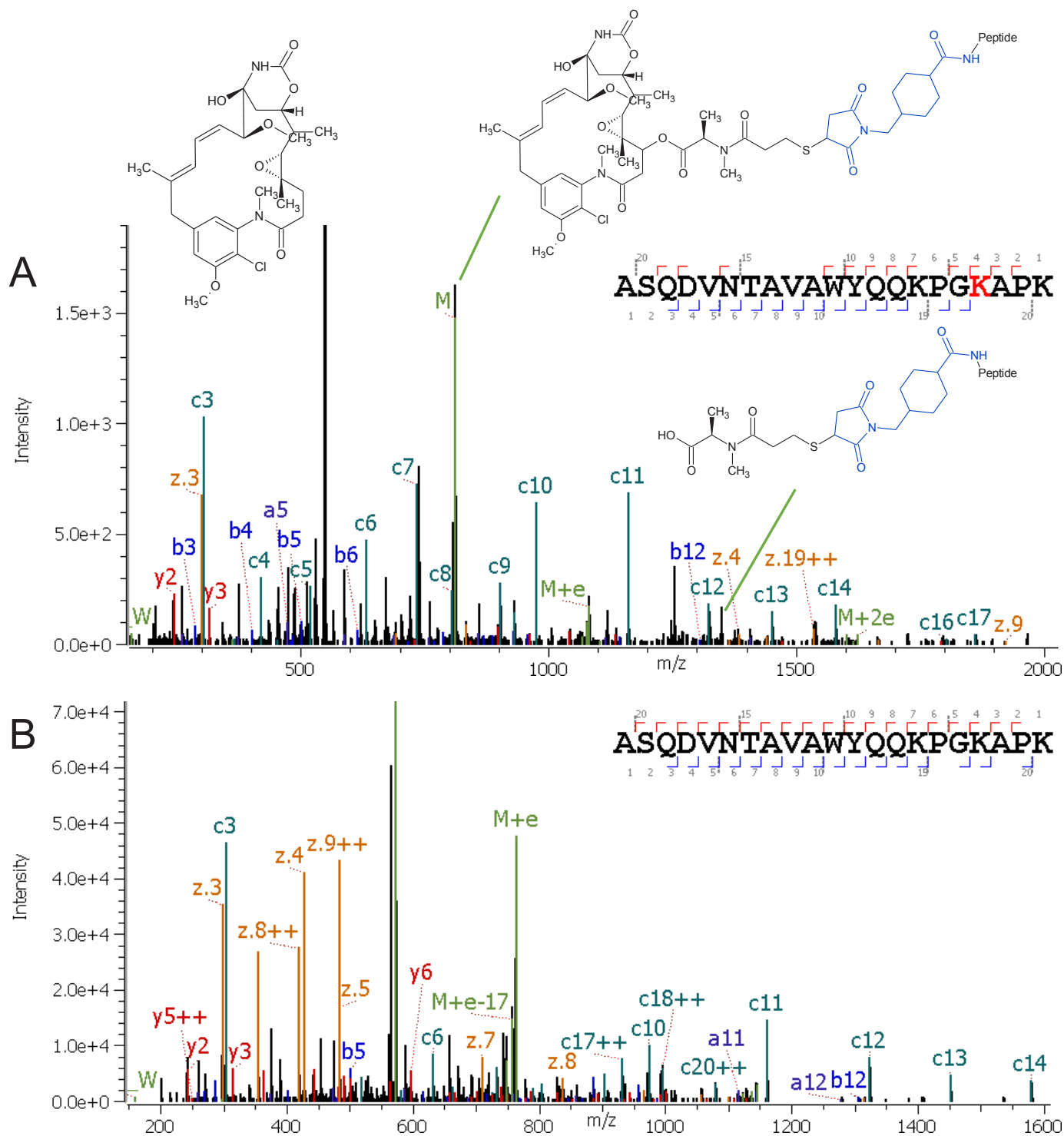


图4. 应用Zeno EAD得到的来自偶联/非偶联肽ASQDVNTAVAWYQQKPGK [DM1] APK ($z = +3$) 的碎片的数据。A: 来自肽段主链指定偶联肽段离子的全扫描MS/MS数据, 以及有效载荷中的碎离子信息。B: 来自肽段主链指定非偶联肽的全扫描MS/MS数据。连接器显示为蓝色, DM1药物显示为黑色

参考文献

1. Baba T et al. (2015) Electron capture dissociation in a branched radio-frequency ion trap, *Anal Chem*, 87, 785-792.
2. Baba T et al. (2020) Dissociation of biomolecules by an intense low-energy electron beam in a high sensitivity time-of-flight mass spectrometer. Submitted to JASMS.
3. Beck, Alain et al. (2010) Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol* 10(5):345-52.
4. Botzanowski, Thomas et al. (2017) Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle- level characterization of site-specific antibody-drug conjugates. *Mabs*, 9(5):801-811.
5. Chen, Liuxi et al. (2016) In-depth structural characterization of Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate. *Mabs*, 8(7): 1210-1223.
6. Harris Reed et al. (2015) Native mass spectrometry and ion mobility characterization of trastuzumab emtansine, a lysine-linked antibody drug conjugate *Protein Sci* 24(8):1210-1223.
7. Fort, Kyle et al (2018) Exploring ECD on a benchtop Q Exactive orbitrap mass spectrometer. *J Proteome Res* 17(2) :926-933.

The SCIEX clinical diagnostic portfolio is For In Vitro Diagnostic Use. Rx Only. Product(s) not available in all countries. For information on availability, please contact your local sales representative or refer to <https://sciex.com/diagnostics>. All other products are For Research Use Only. Not for use in Diagnostic Procedures.

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2021 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-12834-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [SCIEX-China](#)