

使用BioAccord和Nano DSC系统表征和分析抗体偶联药物(ADC)的载荷

Colette Quinn, Henry Shion

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报通过联合生物化学和生物物理实验结果，展示了多学科方法分析抗体偶联药物(ADC)的附加价值。

优势

抗体偶联药物(ADC)理化分析的重点是药物偶联比(DAR)。

简介

抗体偶联药物

抗体偶联药物(ADC)是生物制药的一个亚类，由单克隆抗体(mAb)、连接子和有效载荷（通常为小分子药物或毒素）组成。这三种成分的成功结合产生了一种药物，可以出色的药代动力学方式将细胞毒素的有效载荷释放到特定的靶细胞中¹。生物治疗效果与药物偶联比(DAR)和测定直接相关，监测这两项属性非常重要。

液相色谱(LC)、质谱(MS)和差示扫描量热法分析ADC

生物化学(LC-MS)和生物物理(DSC)工具均可用于ADC表征和DAR监测。

与MS配套的分离技术可以研究大小异构体（聚集体和碎片）、药物分布、DAR以及溶液中游离mAb的数量。生物治疗药的成分和结构决定了哪些分析技术是ADC的理想选择²。

当连接子与药物结合时，mAb的结构扰动可通过DSC扫描的解析功能评估；其中，蛋白质的稳定性由焓(ΔH)和 T_m (ΔG 关系)说明。典型的mAb DSC温度谱图将有2~3个功能区展开事件；CH2或CH3与Fab功能区重叠时为2个，各功能区单独展开时为3个³（图1）。如果观察到3个以上事件，则假定Fab区展开不再重叠，或者存在显著的结构异质性^{3,4}。

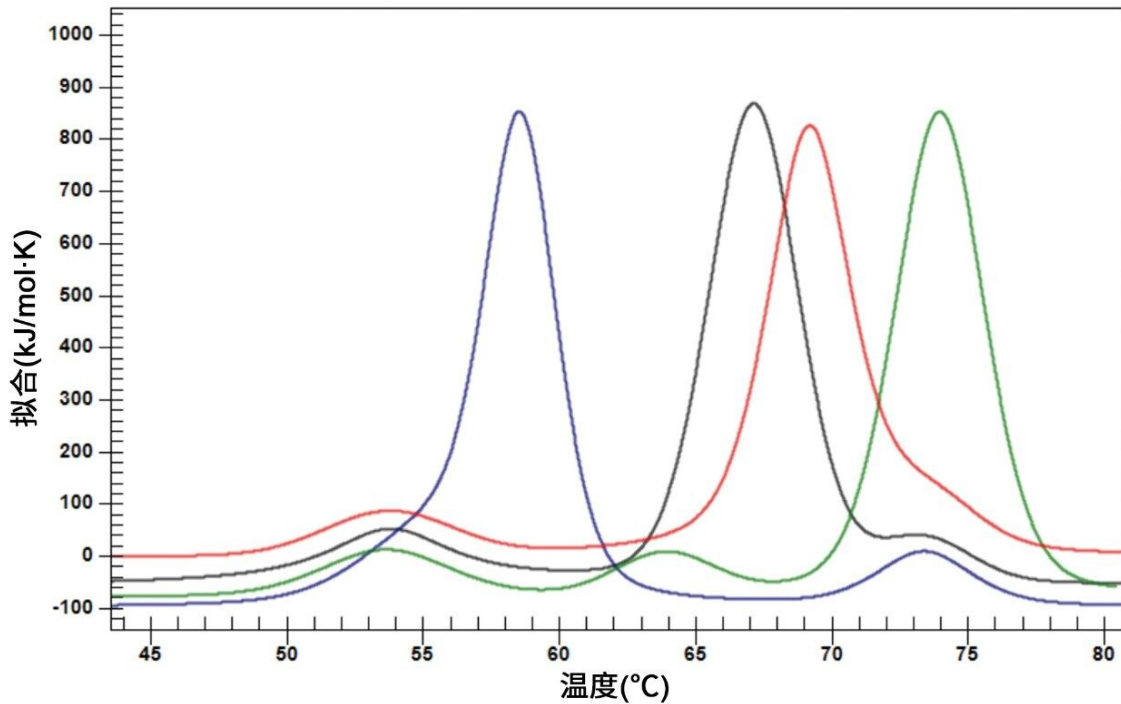


图1.DSC分析的模拟（绿色、蓝色和红色）和真实（黑色）IgG数据。蓝色模拟数据有两个峰，表示CH₂与Fab展开重叠；红色模拟数据表示CH₃与Fab功能区重叠。绿色数据表示CH₃功能区在Fab功能区之前展开。

结果与讨论

在高度疏水性药物与赖氨酸或半胱氨酸的结合位点结合时，非变性分离（如疏水作用色谱(HIC)和体积排阻色谱(SEC)) 非常适合于DAR定量⁵⁻⁸。Waters BioAccord系统搭载了ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统（光学检测器与ACQUITY RDa检测器串联使用），可为赖氨酸和半胱氨酸偶联ADC生成DAR和药物分布数据⁸。在对相同ADC样品的分离研究中，利用TA仪器（沃特世公司）的Nano DSC评估ADC和表征DAR⁹。在确定共同点和协同点的情况下，重新检查了在BioAccord系统和Nano DSC上收集的半胱氨酸偶联数据。

BioAccord系统收集的数据揭示了位置异构体的频率和幅度，其中药物连接子最有可能位于CH2功能区中的半胱氨酸残基上（图2）。这一观察结果与DSC温度谱图中天然CH2功能区下方额外出现的峰一致（图3）。

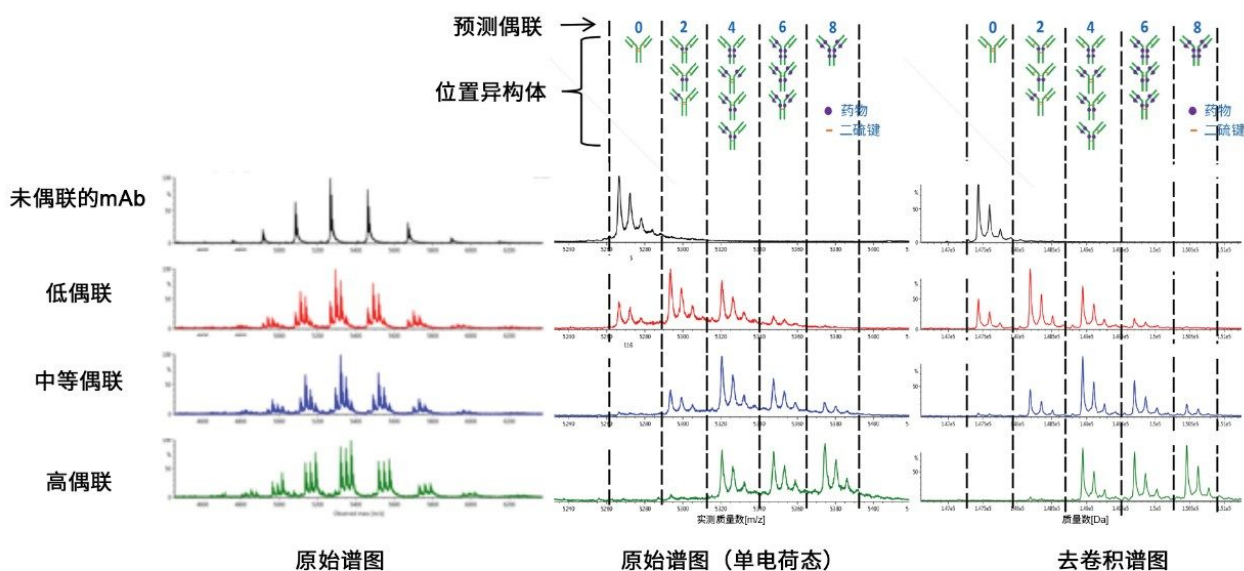


图2.多电荷峰簇的组合原始谱图和具有低、中、高DAR的半胱氨酸偶联ADC的mAb的组合原始谱图⁸

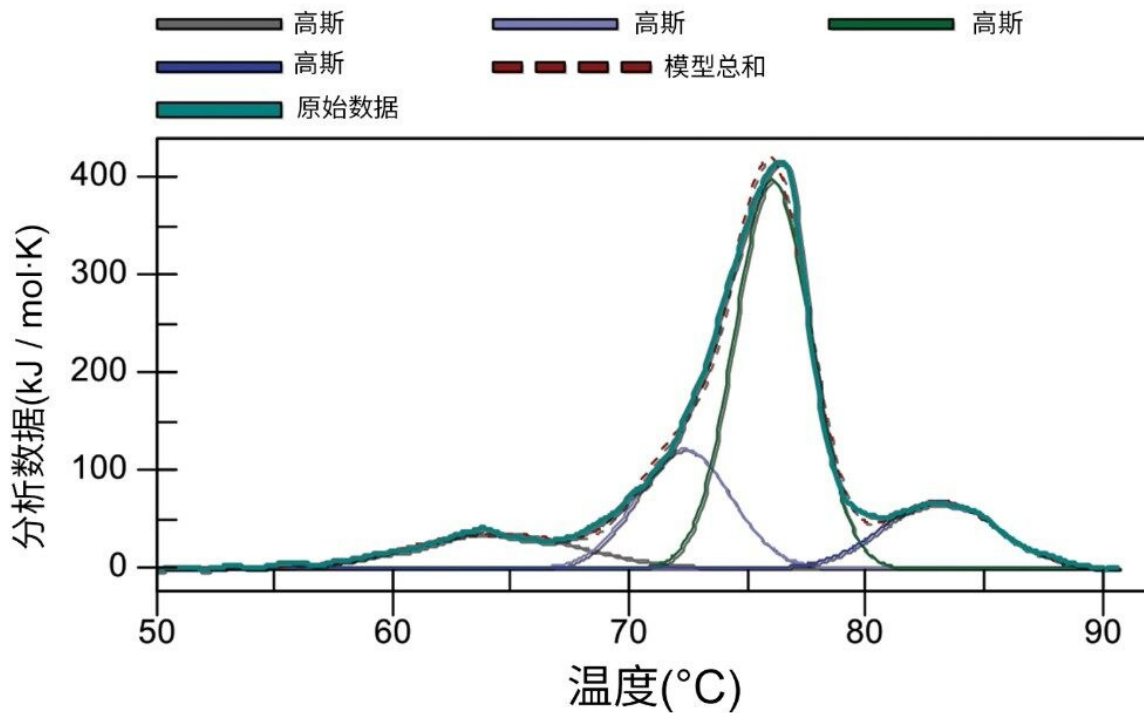
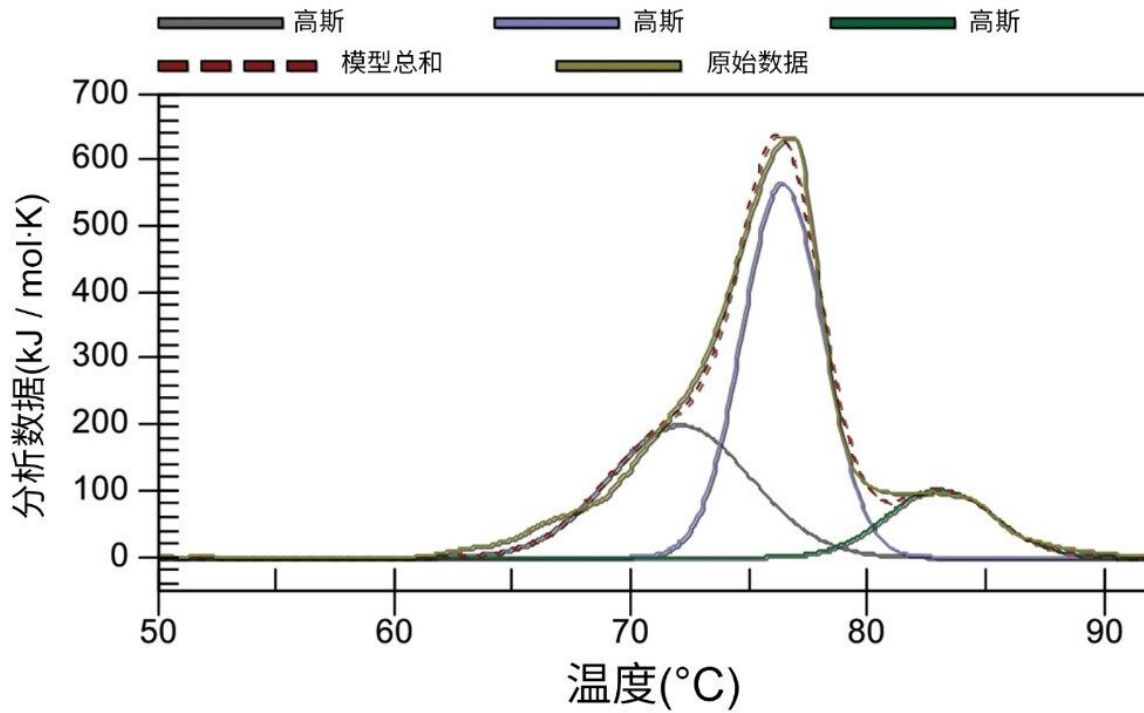


图3.天然（上）和高DAR mAb（下）的高斯拟合DSC ADC结果⁹

根据BioAccord系统数据，该低 T_m DSC峰可分配为连接子药物修饰的CH₂功能区。这种分配与 T_m 的下降相符，因为共轭周围的局部区域疏水性更强，区域稳定性降低。此外，随着DAR从低水平向高水平进展，新峰的焓量级增加，表明不稳定区域不断增加。

总焓降低也反映了类似情况，在低DAR时损失20%，随着平均DAR增加，增量小幅损耗10%。疏水分子的加入仍然会在高DAR时扰乱系统，但由于只是局部添加，扰乱幅度较小。这一论点可以通过BioAccord系统中位置异构体的排布来合理论证。Fab展开峰基于其对称性保留其协同性，与MS数据中位置异构体的占位对称性一致。最后，CH₃功能区的稳定性没有变化，该论点也受到MS数据的支持。

结论

物理化学表征是一种确保加强理解目标生物系统的策略。它需要通过生物化学表征分析来确认分子的关键质量属性，并转化为生物物理表征，其可信度来自于受正交平台支持的发现，这些发现证实了独立做出的结论。从沃特世/TA仪器组合（BioAccord系统和Nano-DSC）的元件中获得的协同作用使得此物理化学策略有助于严格和互补地评估分子的化学和物理性质。

参考资料

1. McCombs, J.R. et al. Antibody drug conjugates: design and selection of linker, payload and conjugation chemistry. *The AAPS Journal*. 2015, 17(2), 339–351.
2. Wakankar, A.A. et al. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *mAbs*. 2011, 3(2), 161-172.
3. Ionescu, R. et al. Heterogeneity of monoclonal antibodies. *Journal of Pharm. Sciences*. 2008, 97, 1414-1426.
4. Temel, D. et al. *Methods in Enzymology*, Crowther, R.A., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, 2016; Chapter 14, 359–389.
5. Shion, H. 等人. 使用LC-UV和LC-UV/MS开发用于自动评估抗体偶联药物(ADC)可比性的集成式信息学工作流程

.沃特世应用纪要.720005366, 2015.

6. Sarrut, M. et al. Analysis of antibody-drug conjugates by comprehensive on-line two-dimensional hydrophobic interaction chromatography x reversed phase liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry. *Journal of Chrom.B.* 2016, 1032, 103-111.
7. Shion, H. et al. *Analytical Scale Native SEC-MS for Antibody-Drug Conjugates (ADCs) Characterization*. Waters -Application Note. 720006368, 2018.
8. Shion, H. 等人. 利用BioAccord系统通过非变性质谱法分析抗体偶联药物(ADC). 沃特世应用纪要. 720006570. 2019.
9. Quinn, C. *Characterization of Biopharmaceutical Stability*. TA Instruments -Application Note. MCAPN-2019-1, 2019.

特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>>

720006810ZH, 2020年3月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号