

使用 Q Exactive 系列高分辨质谱对 ADC 与 mAb 进行变性 & 非变性条件下分子量测定

张晓夕¹, 林军²

¹ 赛默飞世尔科技(中国)有限公司 ² 上海嘉和生物药业有限公司

关键词: Q Exactive Plus Biopharma; ADCs; Native MS; SEC

一、前言

随着生物制药工业的发展, 通过将单克隆抗体本身的二硫键打开, 由此在半胱氨酸的自由巯基上偶联小分子药物的 ADC 越来越多。由于此类 ADC 分子链间的二硫键被打开, 其轻/重链之间仅靠非共价键结合, 在传统的变性质谱条件下会解离成抗体片段, 无法测定完整蛋白的分子量。非变性质谱 (Native MS) 是一种近年来得到不断发展和推广的新兴分析技术, 可以在保持蛋白非共价作用力条件下进行分子量测定, 采用非变性质谱进行 cysteine-linked ADC 分析显示了强大的应用潜力。

Thermo Scientific™ Q Exactive™ Plus Biopharma 平台质谱仪保持了 Orbitrap 超高分辨质谱平台的固有优点, 如高分辨率、高质量精度和高灵敏度兼具, 在此基础上又对其 mass range 做了进一步扩展, 新增的 High Mass Range Mode (HMR Mode) m/z 上限可至 8000 Da, 同时又针对高质量端离子传输进行了优化, 进一步提高了高质量端离子的传输效率, 并改进了 HCD 的压力调节。该平台包括三种不同分析模式 (Standard Mode、Protein Mode 及 HMR mode), 可覆盖生物制药领域的表征全流程。

二、实验条件

2.1 样品条件

本次实验共分析了两个样品, 一个为 Cysteine 偶联小分子药物的 ADC, 另一个为相对应的裸抗, 两个样品均溶于产品特定的缓冲液体系中。上样至变性质谱体系分析的样



品使用 10 k 超滤管将溶液体系置换为 0.1% FA, H₂O 体系, 浓度 1 μg/μL; 上样至非变性质谱体系分析的样品使用双蒸水将样品分别稀释至 1 μg/μL (ADC) 和 4.4 μg/μL (mAb) 后备用。

2.2 变性质谱条件

变性条件下分子量的测定在 Q Exactive HF 平台上进行, 相关实验条件如下:

液相: Thermo Ultimate 3000 RSLC

色谱柱: PLRP-S, 5 μm, 1000Å, 2.1 x 50 mm

流动相: B 相 (0.1% FA, H₂O); C 相 (0.1% FA, ACN)

梯度: 如表 1

流速: 300 μL/min

上样量: 1 μg

表 1. 变性条件下分子量测定 - 反相色谱梯度

Time/min	C%
0	5
1	5
5	90
7	90
9	5
10	5

质谱参数设置如下表:

表 2. 变性条件下分子量测定-质谱参数

	ADC	mAb
Mass Range (m/z)	700-4000	2000-4000
Resolution	30,000	15,000
In-Source CID (eV)	50.0	50.0
Microscans	10	10
AGC target	3e6	3e6
Maximum IT (ms)	200	200

2.3 非变性质谱条件

非变性条件下分子量的测定在 Q Exactive Plus Biopharma 平台上进行, 相关实验条件如下:

液相: Thermo Ultimate 3000 RSLC

色谱柱: Thermo MAbPac™ SEC-1, 5 μm, 300Å, 4 x 300 mm

流动相: 50 mM 醋酸铵溶液

流速: 300 μL/min

上样量: ADC 15 μL, mAb 10 μL

质谱: Q Exactive Plus Biopharma

分析模式: HMR MODE;

Resolution: 依次使用 17500/35000 两档分辨率, 分别对两个样品进行了分析

Scan Range: 2500~8000 (m/z)

表 3. 变性条件下 mAb 样品组成

Average Mass (Da)	Delta Mass (Da)	Matched Delta Mass (ppm)	Matched Sequence	Relative Abundance (%)	Fractional Abundance (%)
147991.31	0.00	7.7	2x A2G0F; 2x Lys loss	100.0000	36.5779
148154.17	162.86	2.8	1x A2G0F; 1x A2G1F; 2x Lys loss	72.5227	26.5273
148315.88	324.56	5.8	1x A2G0F; 1x A2G2F; 2x Lys loss	47.5453	17.3911
148477.34	486.03	10.3	1x A2G1F; 1x A2G2F; 2x Lys loss	17.5277	6.4112
148122.00	130.69	9.3	2x A2G0F; 1x Lys loss	5.0458	1.8456
148768.98	777.67	7.7	1x A2G1F; 1x A2S1G1F; 2x Lys loss	3.1462	1.1508
148643.84	652.53	19.0	2x A2G2F; 2x Lys loss	2.4615	0.9004
147541.25	-450.06	12.1	1x M5; 1x A1G0; 1x Lys loss	1.8083	0.6614
147770.34	-220.97	6.4	1x A2G0F; 1x A1G0; 1x Lys loss	1.7701	0.6475
149056.00	1064.69	16.6	1x M5; 1x A4S1G2	1.5380	0.5626

Micro Scan: 10;

SID: 100 eV;

S-lens: 200

2.4 数据处理

所有原始数据的处理均在 Biopharma Finder 1.0 SP1 软件平台上进行。

三、实验结果

3.1 变性质谱实验结果

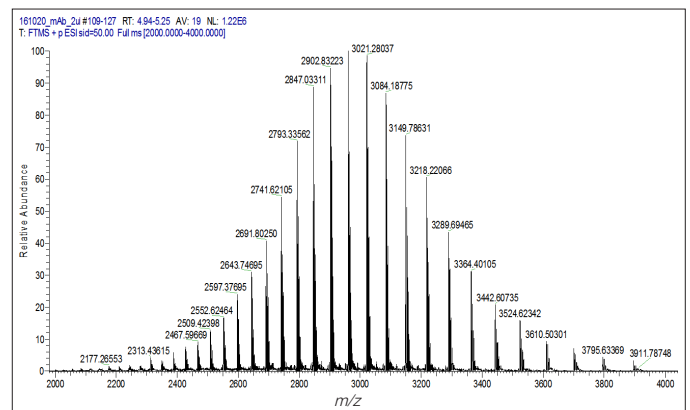


图 1. 变性条件下 mAb 样品原始谱图

上图为变性条件下 mAb 样品分子量测定结果。由图中可以看出, 原始谱图基线干净, 信噪比高, 各个主要糖型之间均实现了基线分离。对该数据进行去卷积处理(图 2), 可见主要糖型均得到精确解析(表 3)。

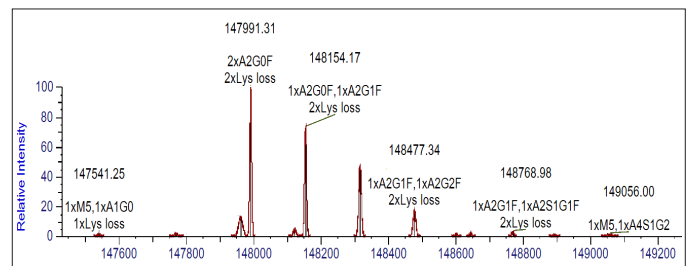


图 2. 变性条件下 mAb 样品去卷积后结果

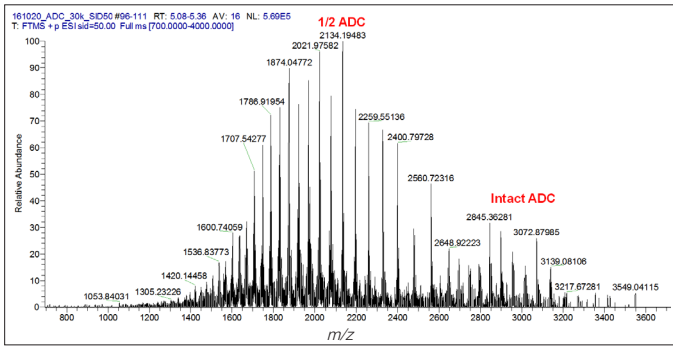


图 3. 变性条件下 Cys 偶联 ADC 分子量测定结果

上图为变性条件下 ADC 样品原始谱图，在此实验条件下 ADC 内部的非共价结合被破坏，主要以 1/2 ADC 的形式存在，其质谱峰主要分布在 $m/z=1000\sim 2600$ 的范围内；另外，在 $m/z=2600\sim 3600$ 范围内还有少量共价结合的 intact ADC 分布。

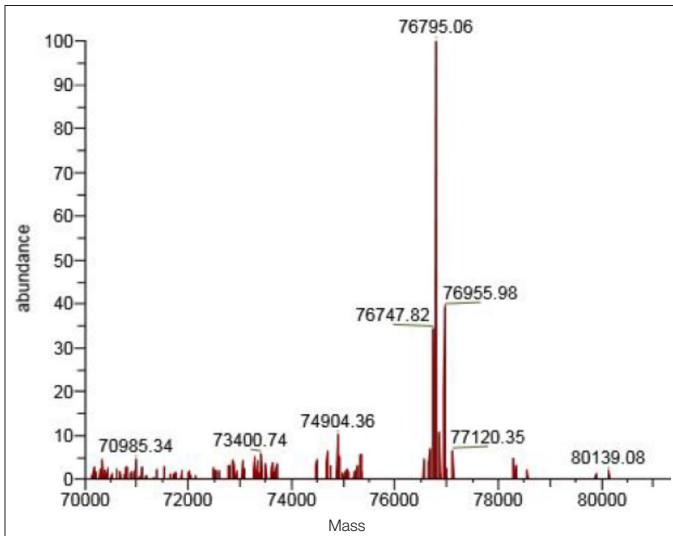


图 4. 变性条件下 Cys 偶联 ADC 去卷积后结果

对图 3 中的原始数据进行去卷积处理，结果如图 4 所示。由于该药物为 Cys 偶联的 ADC，所以在变性条件下可以发现大部分都以 1/2ADC 的形式存在。

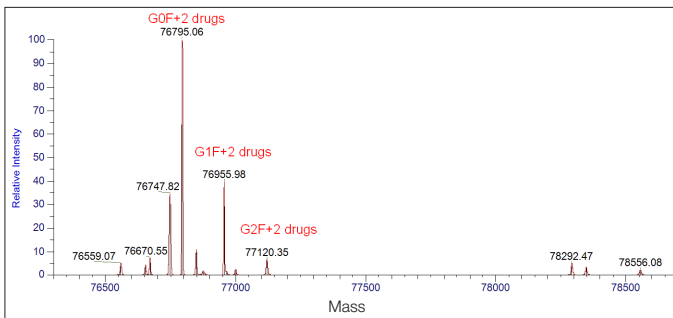


图 5 图 4 中主峰附近局部放大图

观察主峰附近，可发现含量最高的组分 (MW=76795.06) 为 G0F+2 drugs, G1F+2 drugs, G2F+2 drugs 也可以清楚观察到。

下表中列出了在变性条件下对 Cys 偶联的 ADC 进行分子量测定含量排名前十的组分解析结果。

表 4. 变性条件下测定 Cys 偶联 ADC 组分列表 (Top 10)

Average Mass	Intensity	Delta Mass(Da)	Relative Abundance (%)	Fractional Abundance (%)	Remark
76795.06	47953788	0.00	100.0000	24.6075	G0F+2drugs
76955.98	18941658	160.92	39.4998	9.7199	G1F+2drugs
76747.82	16500266	-47.24	34.4087	8.4671	
76848.35	5166368	53.29	10.7736	2.6511	
74904.36	4922857	-1890.70	10.2658	2.5262	
76670.55	3368071	-124.51	7.0236	1.7283	
77120.35	3098310	325.29	6.4610	1.5899	G2F+2drugs
74686.87	3073333	-2108.20	6.4089	1.5771	
73400.74	2802953	-3394.32	5.8451	1.4383	
75344.38	2705693	-1450.69	5.6423	1.3884	

3.2 非变性质谱实验结果

在 Q Exactive Plus Biopharma 平台上对 mAb 和 ADC 样品分别进行非变性质谱条件下的分子量测定，实验结果如下：

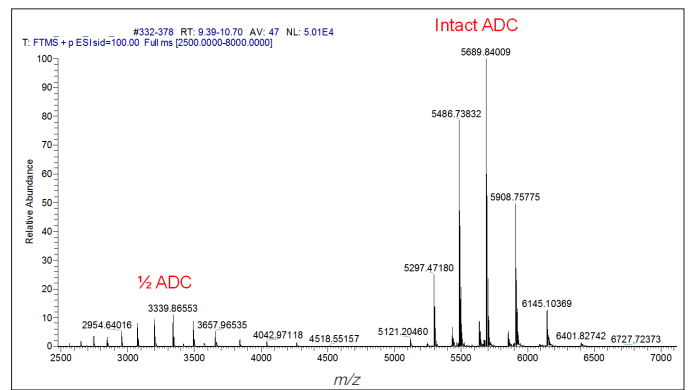


图 6A 非变性质谱条件下测定 ADC 分子量原始谱图 (R=17500)

在 17500 分辨率下测定 ADC 样品分子量 (图 6A)，发现仍有少量 1/2 ADC 形式存在的样品 ($m/z=2500\sim 5000$)，但主要以 intact ADC 的形式存在 ($m/z=5000\sim 7000$)，说明在该离子化条件下，虽然仍存在较小部分的非共价键破坏，但 ADC 大部分还是以非共价键连接的完整形式存在。

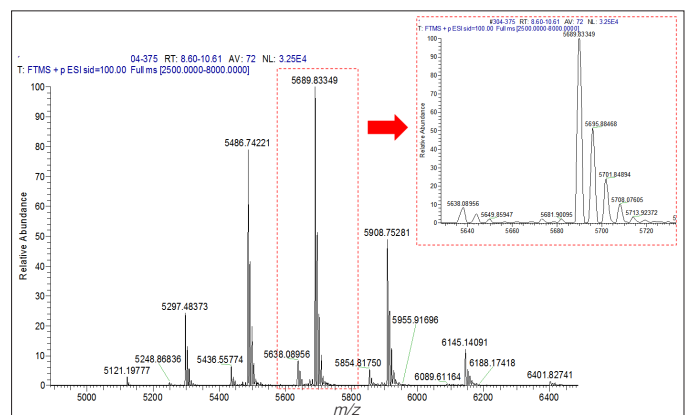


图 6C 图 6A 局部放大 (R=17500, $m/z=2500\sim 5000$)

将 1/2 ADC ($m/z=2500\sim 5000$) 部分放大观察 (图 8C), 同样可见偶联了不同药物与不同糖型的簇峰分布。

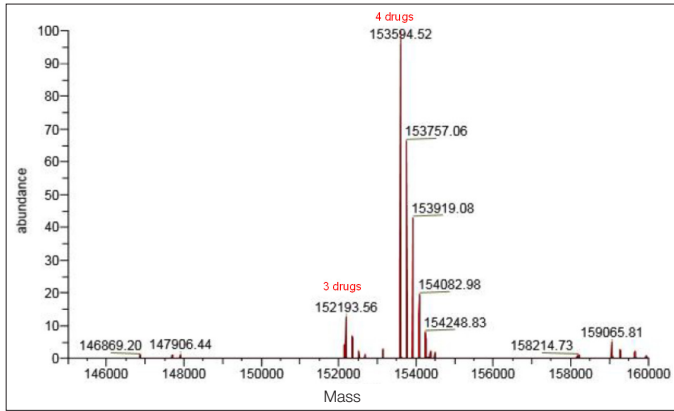


图 9A ADC 样品解卷积结果 ($R=35000$, $m/z=5000\sim 7000$)

观察图 9A 中解卷积结果, 可见与 $R=17500$ 时相比, 使用 35000 分辨率分析样品, 由于分辨率的提高, 可以更好排除干扰, 测得分子量也更精确。样品中主要以结合了 4 个小分子药物的形式存在, 也有部分结合了 3 个小分子药物的峰被观察到。

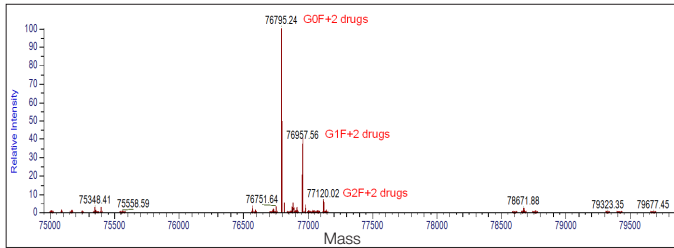


图 9B ADC 样品解卷积结果 ($R=35000$, $m/z=2500\sim 5000$)

对 1/2 ADC 样品进行去卷积处理, 得到结果如下, 主要是偶联了两个药物的 G0F/G1F/G2F 三种不同糖型。

为何在不同分辨率时测定的分子量会有差异? 从图 10 中可以看出, 当使用较低分辨率 ($R=17500$) 时, 无法将样品峰与杂质峰 (如溶剂加合峰等) 分开, 造成测量结果有较大偏差; 随着分辨率的提高, 样品中的各个组分被精确分离, 测得分子量的精确度也随之提高。

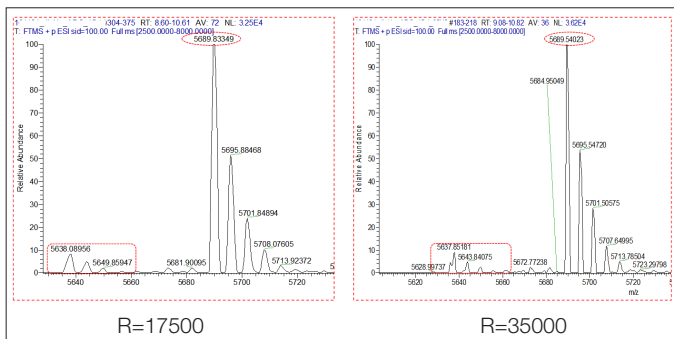


图 10 $R=17500$ 与 $R=35000$ 时原始数据对比

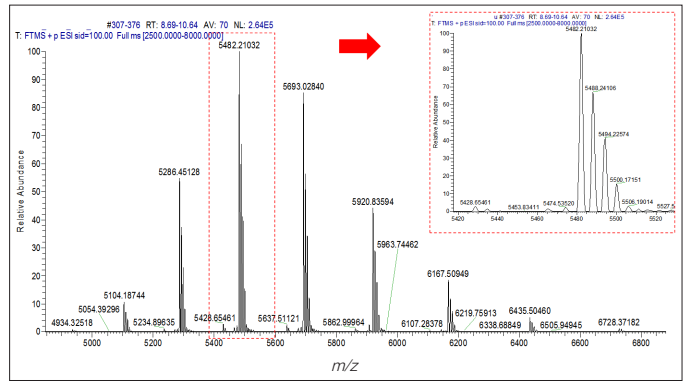


图 11 非变性条件下 mAb 样品原始谱图 ($R=17500$)

使用 17500 分辨率在非变性条件下对 mAb 样品进行分析, 可得到糖型均实现基线分离的高信噪比原始谱图, 主要分布在 $m/z=5000\sim 7000$ 的范围内。

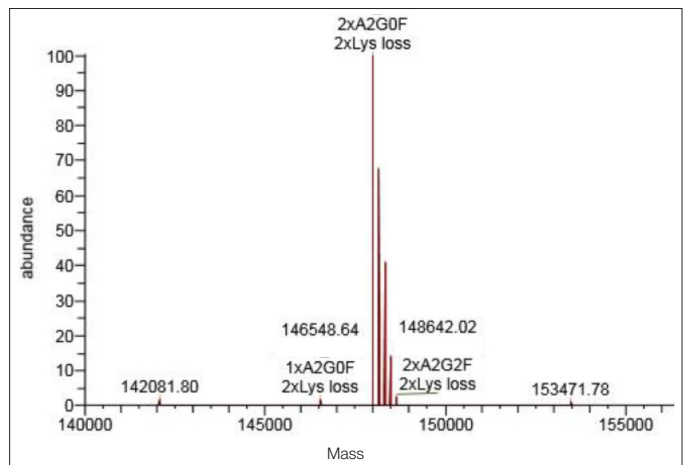


图 12 非变性条件下 mAb 样品去卷积后结果 ($R=17500$)

表 5 非变性条件下 mAb 样品组成 ($R=17500$)

Average Mass	Intensity	Delta Mass	Matched Delta Mass (ppm)	Matched Sequence
147994.55	4042224.25	0.00	14.2	mAb;2xLys loss;2x A2G0F
148157.41	2733454.75	162.86	19.0	mAb;2xLys loss;1x A2G0F,1x A2G1F
148320.00	1653998.00	325.45	22.1	mAb;2xLys loss;2x A2G1F
148483.36	573667.50	488.81	30.2	mAb;2xLys loss;1x A2G1F,1x A2G2F
148642.02	104704.75	647.47	6.8	mAb;2xLys loss;2x A2G2F

使用 17500 分辨率分析 mAb 样品, 发现实测分子量与理论分子量有较大偏差, 推测是由于 native 状态下溶剂聚合效应等较严重, 低分辨率下不足以将样品峰与杂质峰分开。

