

利用BioZen MagBeads

从大鼠血浆中捕获DS-8201的LC-MS/MS定量方法

王姣

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)是由单克隆抗体(mAb)与高活性载荷(payload)通过化学连接子偶联而成。单抗作为载体将小分子药物靶向运输到目标细胞中。由于其明确的靶向性、递送治疗药物的有效性, ADC药物成为当前治疗肿瘤疾病药物的新方向。ADC给药后在生物机体内会以多种形式存在, 包括ADC、ADC生物转化产物、游离载荷、载荷-部分连接子及其相关代谢产物等。全面地了解ADC药物的药代动力学特性, 对于ADC药物的设计和开发至关重要。

DS-8201是一款由抗HER2单克隆抗体通过基于四肽的可切割连接子, 与拓扑异构酶I抑制剂连接的抗体偶联物, 已被批准用于治疗转移性HER2阳性乳腺癌患者。本文以DS-8201为例, 利用链霉亲和素磁珠提取净化方式, 建立一种检测总抗体和结合型载荷的LC-MS/MS定量分析方法。

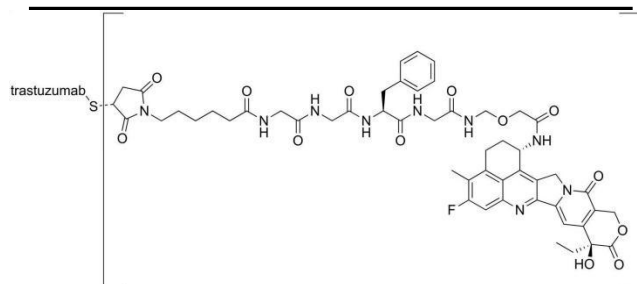
关键词

ADC; bioZen MagBeads; Biozen peptide XB-C18;
LC-MS/MS

化合物信息

表1. 化合物信息

名称	英文名	CAS
DS-8201	Trastuzumab deruxtecan	1826843-81-5
曲妥珠单抗	Trastuzumab	180288-69-1
Dxd	Exatecan derivative	1599440-33-1



实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪(AB SCIEX Triple Quad™6500), 配有电喷雾离子源(ESI);

3.1.2 试剂材料

BioZen MagBeads (20mg/mL), KS0-9531;
Human IgG-BIOT(0.5mg/mL), SouthernBiotech;
Trypsin, 索莱宝;
Papain, SIGMA;
PBS buffer: 10mM磷酸盐缓冲液pH7.4, 包含0.01%Tween-20和BSA;
屈臣氏蒸馏水、甲酸、TFA、乙腈均为色谱级。

3.1.3 样品基质

大鼠血浆

3.2 样品前处理方法

3.2.1 MagBead 活化

每个样本取25 μ L BioZen MagBeads(20mg/mL), 用500 μ LPBS buffer清洗后, 磁力架弃去多余液体, 重复3次;
加入初始比例PBS buffer悬浮磁珠;
加入10 μ L生物素化山羊抗人IgG(0.5mg/mL), 室温下1200rpm振荡孵育1h; 磁力架弃去上清;
用500 μ LPBS buffer清洗三遍, 磁力架弃去上清;
加入PBS buffer恢复磁珠初始浓度;

3.2.2 免疫捕获

加入30 μ L血浆样本, 与经过3.2.1活化后磁珠充分混合, 室温下1200rpm振荡孵育2h;
磁力架弃去上清;

3.2.3 淋洗和洗脱

淋洗一: 加入200 μ L PBS buffer清洗, 磁力架弃去上清保持2min, 重复清洗两遍;
淋洗二: 加入200 μ L 10mM碳酸氢铵清洗一遍, 磁力架弃去上清保持2min;



洗脱：加入100 μL 0.1%TFA，室温下1200rpm振荡洗脱10min；
磁力架静置5min，取上清备用；

3.2.4 酶解

总抗与Payload分别用胰蛋白酶和木瓜蛋白酶分开酶解；
抗体酶解：取3.2.3洗脱液上清50 μL ，用500mM碳酸氢铵调pH约7~8，在95℃振荡变性30min，回到室温，加入Trypsin40℃酶解2h；
Payload酶切：取3.2.3洗脱液上清50 μL ，用500mM碳酸氢铵调pH约5~6，加入Papain40℃酶解3h；
酶解结束后，均加入10 μL 10%FA乙腈终止；
15000rpm离心，取上清待上机测试。

3.3仪器检测条件

3.3.1色谱条件

色谱柱： Biozen peptide XB-C18 (2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 μm) ； P/N: 00D-4774-AN
流动相A相： 0.1%甲酸水溶液；
流动相B相： 0.1%甲酸乙腈溶液；
流速： 0.3 mL/min；
柱温： 40 $^{\circ}\text{C}$ ；
进样量： 20 μL ；
梯度程序见表2：

表2. 梯度条件

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
1.5	90	10
5.5	60	40
7.5	5	95
9.0	5	95
9.1	90	10
11	90	10

3.3.2质谱条件

离子源类型：电喷雾离子源 (ESI+)
扫描方式：多反应监测正负离子模式 (MRM)
喷雾针电压： 5500 V
离子源温度： 500 $^{\circ}\text{C}$
加热器 (GS1)： 50 psi
辅助加热气 (GS2)： 50 psi
气帘气 (CUR)： 35 psi
碰撞气 (CAD)： High
为获得较好的稳定性和灵敏度，优化各化合物

监测离子对、去簇电压 (DP) 和碰撞电压 (CE) 如下表。本案例参数仅供参考不具备法律效力。

表3. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
GPSVFPLAPSSK	594.2	846.47	60	28
	594.2	699.4	60	28
FTISADTSK	485.2	721.4	80	22.8
	485.2	608.3	80	25.8
Dxd	494.1	479.1	200	46
	494.1	450.1	200	43
	494.1	435.1	200	47

*GPSVFPLAPSSK可作为大鼠血浆定量特征肽，无法用于人血浆定量。

3.4 结果

3.4.1 灵敏度和线性

实验过程中通过优化MagBeads免疫捕获方法、酶解方法、液相梯度方法等，得到了可同时检测大鼠血浆中DS-8201总抗体和结合型Payload的LCMS方法（图1为特征肽段与payload色谱图）。如图2/3所示，用DS-8201配制基质曲线，该方法曲线浓度范围为0.6nM~600nM，经过3.2前处理后上机检测，得到总抗体和结合型Payload线性良好， R^2 均大于0.995。进样曲线最高点后进空白溶液，总抗体定量肽段残留在0.09‰，小分子payload残留在0.14‰。两者残留均小于LLOQ，满足分析要求，LLOQ和残留色谱图见图4~7。

3.4.2 方法回收率和基质效应

分别在大鼠血浆中添加低、中、高三个浓度DS-8201标品，外标法考察MagBeads的提取净化回收情况见表4，回收率均在75%~90%间。通过对比空白基质溶液添加酶解标液和空白溶剂添加酶解后标液，评估提取后基质效应得到，基质效应为96.5%，可以得到血浆样本通过MagBeads提取净化后基本上没有明显的基质效应。

表4. 加标回收结果

化合物	加标浓度nM	回收率%
GPSVFPLAPSSK	1.8	80.2%
	180	82.4%
	600	86.8%
dxd	1.8	77.3%
	180	82.6%
	600	87.1%



3.5 讨论

对于测定的总抗体、结合型载荷与ADC的生物转化，一般采用将生物基质中的所有ADC大分子免疫捕获出来，再进行后续酶解处理的方法。本文选择的使用通用型人源二抗对ADC药物进行提取捕获。根据ADC浓度、基质复杂程度以及其他检项的需要，还可以选择抗载荷抗体与链霉亲和素结合对偶联抗体进行捕获，从而更加提高方法的特异性和灵敏度。

3.6 实验谱图

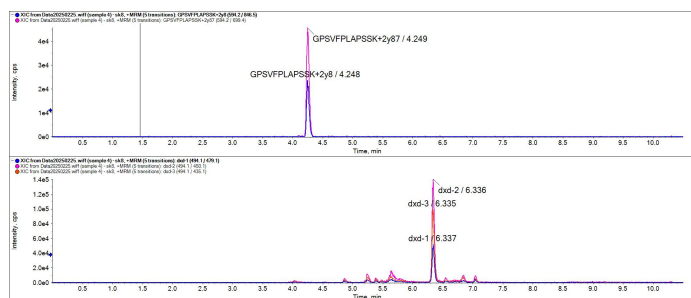


图1. 特征肽与Payload色谱图

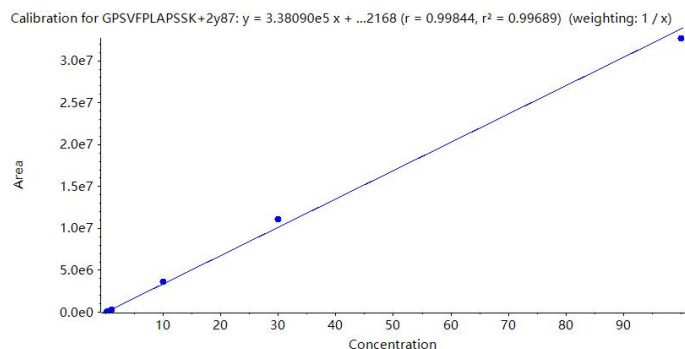


图2. 总抗特征肽标准曲线

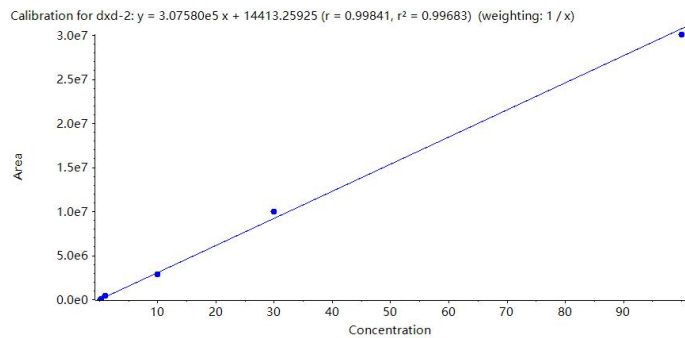


图3. Payload标准曲线

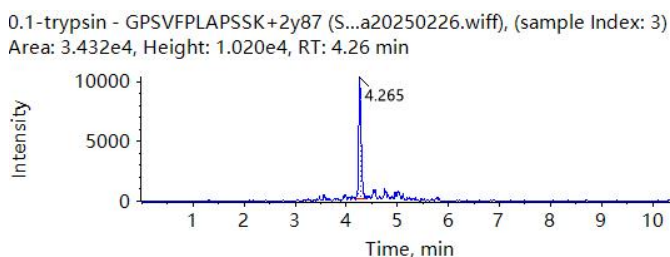


图4. 总抗特征肽LLOQ定量离子色谱图

bk - GPSVFPLAPSSK+2y87 (Unknown) ...0250226.wiff), (sample Index: 10)
Area: 6.236e3, Height: 1.649e3, RT: 4.26 min

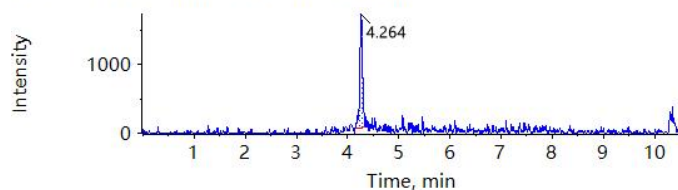


图5. 特征肽残留XIC色谱图

0.1-papain - dxd-2 (Standard) 494.1 ...a20250226.wiff), (sample Index: 18)
Area: 3.441e4, Height: 1.191e4, RT: 6.36 min

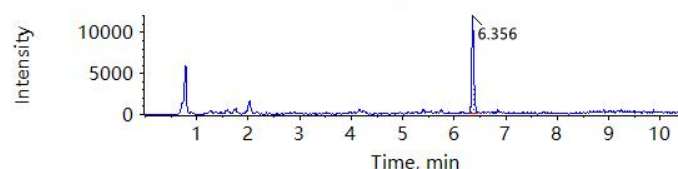


图6. 结合型payloadLLOQ定量离子色谱图

bk - dxd-1 (Unknown) 494.1 / 479.1 ...a20250226.wiff), (sample Index: 25)
Area: 4.608e3, Height: 1.343e3, RT: 6.37 min

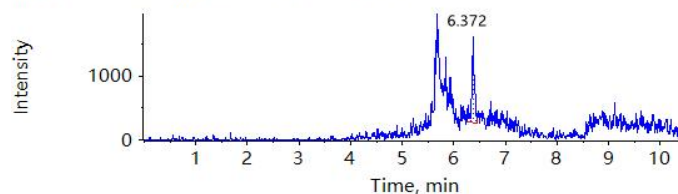


图7. Payload空白残留XIC色谱图

结论

本实验建立了以DS-8201为例的大鼠血浆中ADC药物的总抗体及结合型载荷的LC-MS/MS定量方法。该方法使用bioZen MagBeads链霉亲和素结合人源二抗对ADC进行捕获，Biozen peptide XB-C18色谱柱进行分析，方法线性范围可做到0.6nM~600nM，外标法回收率均在75~90%。该方法具备回收率高、基质干扰小，残留低等优势。

参考文献

- [1] Ling Xu , Laura E. Packer, et al., A generic approach for simultaneous measurements of total antibody and cleavable antibody-conjugated drug by LC/MS/MS, Analytical Biochemistry 537 (2017) 33-36.
- [2] Xiaoyu Zhu, Shihan Huo, et al., Current LC-MS-based strategies for characterization and quantification of antibody-drug conjugates, Journal of Pharmaceutical Analysis 10 (2020) 209-220.
- [3] Preeti Narayan , Christy L Osgood, et al, FDA Approval Summary: Fam-Trastuzumab Deruxtecan-Nxki for the Treatment of Unresectable or Metastatic HER2-Positive Breast Cancer; Clin Cancer Res. 2021 Aug 15; 27(16): 4478-4485.





Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。



如果您对于本方法的执行有任何问题, 或想要了解更多信息,
请拨打400-606-8099 联系我们的技术专家, 我们很乐意为您提供帮助!

