

利用waters_connect™平台中的INTACT Mass应用程序简化ADC DAR和药物分布分析

Samantha Ippoliti, Ying Qing Yu, Scott Berger

Waters Corporation, United States

Published on May 30, 2025

应用简报

本文为应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

waters_connect平台中的INTACT Mass应用程序集数据采集、处理、审查和报告功能于一体，可自动完成生物治疗药物LC-MS数据的质量数去卷积。在本应用简报中，我们使用INTACT Mass应用程序1.9版分析了抗体偶联药物(ADC)的药物/抗体比率(DAR)。本应用简报使用经FDA批准的赖氨酸偶联和半胱氨酸偶联ADC样品演示这些DAR分析工具。

优势

- 沃特世改进了INTACT Mass应用程序1.9版，新增DAR和药物分布自动计算功能，有助于简化单克隆抗体(mAb)偶联物的分析
- 得益于符合法规要求的waters_connect信息学平台，此ADC分析工作流程可应用于产品表征到产品放行检测的各个环节

简介

waters_connect平台是一款基于应用程序的合规软件，提供多种基于应用程序的生物制药分析工作流程。而INTACT Mass应用程序是其中一款可以快速自动完成质量数去卷积、质量数确认及相关纯度评估的工具。它已经在多个领域展示出应用潜力，包括但不限于完整蛋白质¹、寡核苷酸²⁻³、和合成肽⁴。自推出该应用程序以来，沃特世在这数年间不断增加新功能，包括自定义去卷积设置和峰积分事件等。INTACT Mass应用程序最新增加的功能是ADC分析，随着这类药物作为癌症和血液疾病的治疗药物重新引起关注，业内对该功能的需求也不断增长。过去，用户只能使用UNIFI™应用程序工作流程计算DAR和药物分布，而且必须使用一组自定义计算才能得出DAR值。INTACT Mass应用程序在处理功能方面的改进显著简化了这些计算，使得计算出错的可能性更低，同时确保这些分析仍然可以在合规平台上执行。

结果与讨论

评估成功偶联到蛋白质上的药物载荷分子的变异性，是ADC和其他蛋白质偶联物的关键质量属性之一。这种变异性具体反映在药物分布（每种偶联物的相对百分比）和DAR值（根据每种偶联物的加权平均值得出的单个值）上。新发布的INTACT Mass应用程序1.9版可以代替用户自动执行这些计算。创建处理方法时，软件会用名为“Drug”（药物）的特殊标签来标示药物/载荷修饰。在处理质谱数据的过程中，软件会根据用户为非偶联蛋白质和药物修饰设定的预期质量数，自动匹配观测质量数与偶联物质的理论质量数。然后，使用带“Drug”（药物）标签的匹配组分（结合任何非偶联蛋白质）的相对MS响应，计算出DAR和药物分布。

分析ENHERTU™ (fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki)（一种半胱氨酸偶联ADC）

ENHERTU (fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki)是一种半胱氨酸偶联ADC，DAR为7-8，用于治疗多种乳腺癌、胃癌和胃食管癌⁵。由于半胱氨酸偶联ADC可能缺少连接重链和轻链的链间二硫键，使用LC-MS分析半胱氨酸偶联ADC时，为了保留ADC的完整结构，必须采用非变性分离条件和较为温和的离子源条件。因此，我们在BioAccord™系统上采用非变性体积排阻色谱-质谱法(SEC-MS)（详细信息参见之前发布的应用纪要⁶）分析ENHERTU (fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki)。

非变性SEC-MS分析得到的去卷积质谱图（图1A）表明，大部分物质都可以匹配到偶联八个Deruxtecan药物载荷分子（标记为“D8”）的曲妥珠单抗N-糖型。所有物质中，只有一小部分被归属为偶联六个药物载荷分子的曲妥珠单抗（“D6”），如INTACT Mass应用程序的Results（结果）选项卡所示（图1B）。这张结果表列出了检测到的所有物质，以及它们各自的预期质量数和实测质量数、质量误差(ppm)，还有根据MS响应计算出的相对百分

比。新的INTACT Mass应用程序1.9版Calculation Results（计算结果）选项卡（图1C）显示了软件计算出的DAR值和总体药物分布。与预期一致，ENHERTU (fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki)的DAR值为7.97，与UNIFI应用程序分析出的结果和过往文献报告的值相当^{5,7}。根据相对MS响应可知，样品中98.7%都是偶联八个药物载荷分子的抗体。

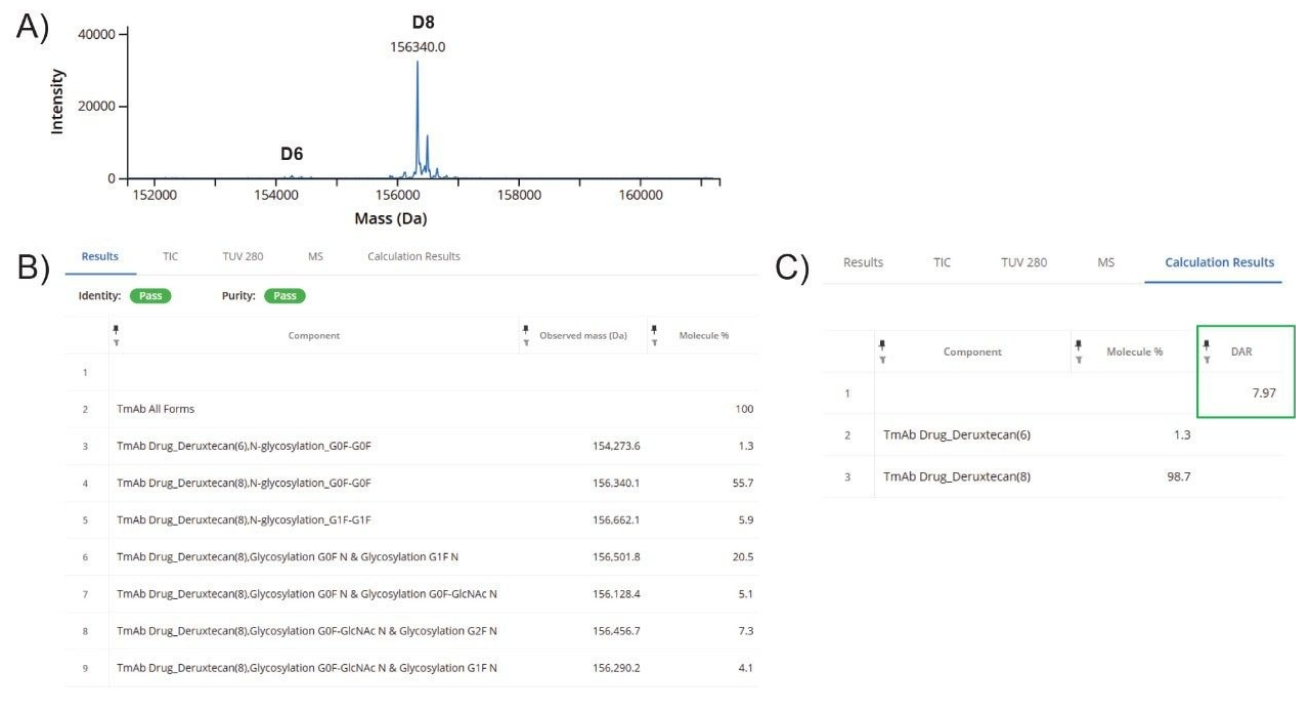


图1. INTACT Mass应用程序对ENHERTU (fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki) ADC的LC-MS分析结果，图中：(A) 去卷积质谱图；(B)列出了全部检出物质的Results（结果）选项卡；(C)列出了药物分布和DAR计算值的Calculation Results（计算结果）选项卡。

分析KADCYLA™ (ado-trastuzumab-emtansine)（一种赖氨酸偶联ADC）

KADCYLA (ado-trastuzumab-emtansine)是一种经过充分研究的赖氨酸偶联ADC，预期DAR约为3.5，主要用于治疗乳腺癌⁵⁻⁸。赖氨酸偶联ADC在偶联时利用的是溶剂暴露的赖氨酸残基，因此产生的偶联物混合物呈现出相当大的异质性。过往的KADCYLA (ado-trastuzumab-emtansine)研究曾检测到偶联0到8个药物载荷分子的偶联物，其中大部分偶联3或4个药物载荷分子。由于赖氨酸偶联过程不会破坏mAb的链间二硫键，因此分析KADCYLA (ado-trastuzumab-emtansine)时采用变性或非变性LC-MS条件均可。在变性反相液相色谱-质谱(RPLC-MS)条件下进行分析时，由于样品电荷态更高、间隔更近，谨慎的做法是使用PNGase F酶对KADCYLA (ado-

trastuzumab-emtansine)进行去糖基化处理，降低MS谱图的整体复杂程度⁸。

在BioAccord系统上采用RPLC-MS法分析去糖基化ADC样品，然后在INTACT Mass应用程序中处理数据后得到的去卷积质谱图如图2A所示，图中的表格列出了偶联0到8个药物载荷分子的每种偶联物（D0-D8）的相对百分比。INTACT Mass应用程序计算出的总体DAR值为3.56，与之前使用UNIFI应用程序执行分析时报告的DAR值3.5一致⁵⁻⁸。

本研究还采用非变性SEC-MS条件成功分析了KADCYLA (ado-trastuzumab-emtansine)，无需进行糖基释放。为便于比较，我们还在BioAccord系统上采用非变性SEC-MS条件（详细信息参见之前发布的应用纪要⁶）分析了相同的样品，然后使用INTACT Mass应用程序处理数据。非变性分析得到的去卷积质谱图（图2B）更加复杂，包含所有N-糖型。INTACT Mass应用程序对原始谱图数据进行去卷积处理、匹配糖基化物质和偶联物，并整理各DAR值下不同的偶联物形式，从而计算出平均DAR值和药物分布。图2B中的表格列出了D0到D8每种物质的相对丰度百分比计算值，以及平均DAR计算值(3.50)，这与公开文献⁵⁻⁸报告的值以及过往研究中UNIFI软件计算出的值一致。因此，在ADC分析中，用户可以灵活选用符合实验目标的分离方法，并有望获得与其他方法相当的DAR和药物分布结果。

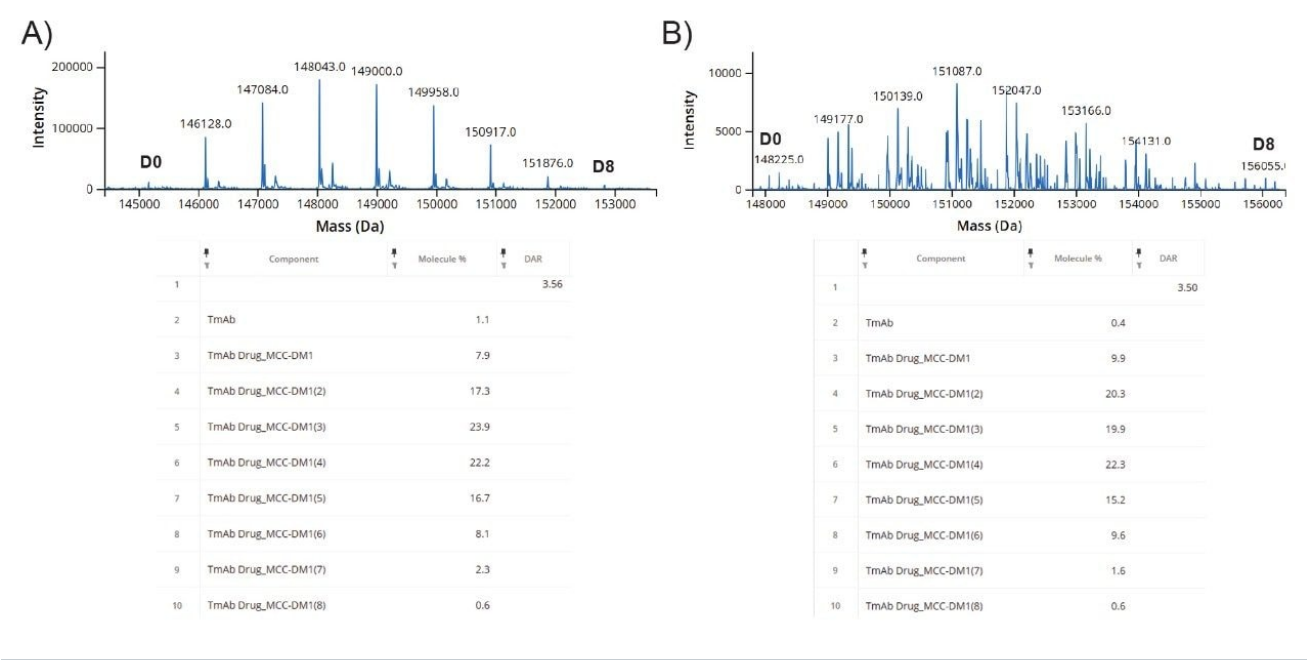


图2.比较两种条件下KADCYLA (ado-trastuzumab-emtansine) DAR的分析结果：(A)去糖基化变性RPLC-MS ADC分析；(B)不处理样品的非变性SEC-MS ADC分析。由图可见，两种分析条件下的药物分布和DAR计算值相当。

结论

waters_connect平台中的INTACT Mass应用程序1.9版新增若干功能，提高了该工具自动分析偶联分子LC-MS数据的能力，从早期表征研究到产品放行检测中的验证分析，多场景适用。该软件集成的DAR和药物分布自动计算功能简化了ADC分析，为用户提供高效、自动化的工作流程，无论分析人员LC-MS经验深浅，皆可轻松上手。

参考资料

1. Shion H, Boyce P, Berger SJ, Yu YQ. INTACT Mass- a Versatile waters_connect Application for Rapid Mass Confirmation and Purity Assessment of Biotherapeutics. Waters Application Note [720007547](https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2022/intact-mass-a-versatile-waters-connect-application-for-rapid-mass-confirmation-and-purity-assessment-of-biotherapeutics.html) <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2022/intact-mass-a-versatile-waters-connect-application-for-rapid-mass-confirmation-and-purity-assessment-of-biotherapeutics.html>> . February 2022.
 2. Doneanu CE, Boyce P, Shion H, Fredette J, Berger SJ, Gastall H, Yu YQ. LC-MS Analysis of siRNA, Single Guide RNA and Impurities Using the BioAccord System with ACQUITY Premier and New Automated INTACT Mass Application. Waters Application Note [720007546](https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2022/lc-ms-analysis-of-sirna-single-guide-rna-and-impurities-using-the-bioaccord-system-with-acquity-premier-and-new-automated-intact-mass-application.html) <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2022/lc-ms-analysis-of-sirna-single-guide-rna-and-impurities-using-the-bioaccord-system-with-acquity-premier-and-new-automated-intact-mass-application.html>> . April 2022.
 3. D' Esposito RJ, Doneanu CE, Gastall H, Berger SJ, Yu YQ. RNA CQA Analysis using the BioAccord LC-MS System and INTACT Mass waters_connect Application. Waters Application Note [720008130](https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2023/rna-cqa-analysis-using-the-bioaccord-lc-ms-system-and-intact-mass-waters-connect-application.html) <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2023/rna-cqa-analysis-using-the-bioaccord-lc-ms-system-and-intact-mass-waters-connect-application.html>> . November 2023.
 4. Ranbaduge N, Shion H, Yu YQ. Streamlined LC-MS Analysis of Stress Induced Impurities of a Synthetic Peptide using the BioAccord System and the waters_connect INTACT Mass Application. Waters Application Note [720007752](https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2022/streamlined-lc-ms-analysis-of-stress-induced-impurities-of-a-synthetic-peptide-using-the-bioaccord-system-and-the-waters-connect-intact-mass-application.html) <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2022/streamlined-lc-ms-analysis-of-stress-induced-impurities-of-a-synthetic-peptide-using-the-bioaccord-system-and-the-waters-connect-intact-mass-application.html>> . October 2022.
-

5. Riccardi F, Bo MD, Macor P, Toffoli G. A comprehensive overview on antibody-drug conjugates: from the conceptualization to cancer therapy. *Front. Pharmacol.* 14. 2023.
6. Shion H, Yu YQ, Chen W. Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) by Native Mass Spectrometry on the BioAccord System. Waters Application Note 720006570 <<https://www.waters.com/nextgen/global/library/application-notes/2019/analysis-of-antibody-drug-conjugates-adcs-by-native-mass-spectrometry-on-the-bioaccord-system.html>> . May 2019.
7. Martín M, Pandiaella A, Vargas-Castrillón E, Díaz-Rodríguez E, Iglesias-Hernangómez T, Cano CM, Fernández-Cuesta I, Winkow E, Perelló MF. Trastuzumab deruxtecan in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2024; 198: 104355. (<http://doi.org/10.1015/j.critrevonc.2025.104355> <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1040842824000982?via%3Dihub>>)
8. Chen L, Wang L, Shion H, Yu C, Yu YQ, Zhu L, Li M, Chen W, Gao K. In-depth structural characterization of Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate. *MAbs*. 2016; 8(7): 1210–1223.

UNIFI、BioAccord和waters_connect是沃特世科技公司的商标。ENHERTU (fam-trastuzumab-deruxtecan-nxki)是Daiichi-Sankyo Company, Limited的商标。KADCYLA (ado-trastuzumab-emtansine)是Genentech, Inc.的商标。

特色产品

BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/bioaccord-lc-ms-system.html>>

waters_connect信息学平台 <https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters_connect/waters-connect-informatics-platform.html>

720008818ZH, 2025年5月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私声明](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)