

多种碎裂方式联合解析T-DM1小分子 药物偶联位点

张晓夕 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

一、前言

抗体药物偶联物 (Antibody Drug Conjugates, ADC) 是一类新颖的治疗药物, 正日益受到全球制药公司的关注。ADC药物由单克隆抗体和强效毒性药物 (toxic drug) 通过生物活性连接器 (linker) 偶联而成, 是一种定点靶向癌细胞的强效抗癌药物。由于其对靶点的准确识别性及非癌细胞不受影响性, 极大地提高了药效并减少了毒副作用。

因为控制分布和输送, 抗体和小分子之间的连接体成为ADC研发中一个微妙而关键的部分。不稳定的连接体会使癌细胞暴露在细胞毒素之下, 诱导产生抗药性而不能有效杀灭它们。

Kadcyla (ado-trastuzumab emtansine; T-DM1) 由罗氏旗下的基因泰克公司与ImmunoGen Inc合作开发, 2013年被FDA批准用于先前接受过曲妥珠和紫杉烷治疗的HER2+转移性乳腺癌患者, 是全球第三个上市的ADC。它包含高效毒素美登素类(Maytansinoid)中的DM1, 通过硫醚连接体与抗体表面的赖氨酸残基相连接。下图为T-DM1结构示意图。

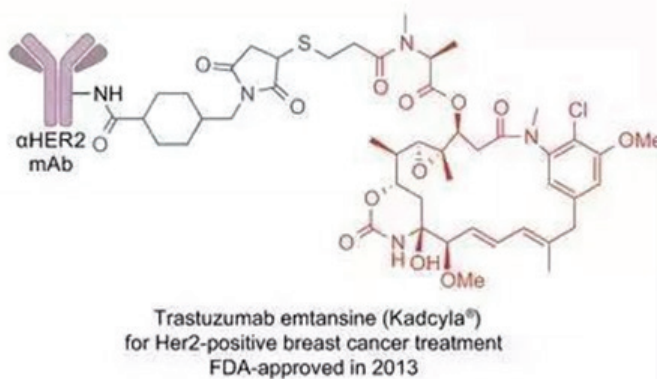


图1 T-DM1结构示意图 (黑: linker, 红: drug)

在T-DM1中, 小分子药物可能与赫赛汀单抗表面的赖氨酸残基及轻/重链N端通过linker相连接, 考虑到抗体的对称性, 总共有46个可能发生修饰的位点; 但T-DM1的payload通常分布在0~8之间 (平均3~4), 故对每个赖氨酸偶联可能性的研究就显得尤为必要。由于linker及小分子药物在常规的高能碰撞解离 (Higher Energy Collision Dissociation, HCD) 模式下会发生碎裂, 产生特征性的碎片离子, 但linker及小分子药物的碎裂会对修饰位点解析带来困难, 故我们在赛默飞特有的Orbitrap Fusion Lumos平台上首先利用HCD碎裂偶联肽段产生特征碎片离子, 通过特征性碎片离子的存在确认该肽段发生了药物的修饰, 进而针对该母离子进行ETcD碎裂, 使linker+drug的修饰能够完整保留在肽段侧链上, 从而实现偶联位点的精确解析。

二、仪器、试剂、实验条件及数据处理

2.1 仪器

液相: EASY nLC 1200

质谱: Orbitrap Fusion Lumos

2.2 试剂

样品为罗氏生产的T-DM1, 使用双蒸水溶解后, SMART Digest 70°C 酶解1h, 随后使用DTT+IAA进行还原烷基化处理; 酶解后肽段终浓度为0.1μg/μl。

2.3 实验条件

液相:

流动相: H₂O,0.1%FA (A相), 80%ACN,0.1%FA (B相), 流速300nl/min;

上样量: 1μl (100ng on column);

梯度如下表所示:

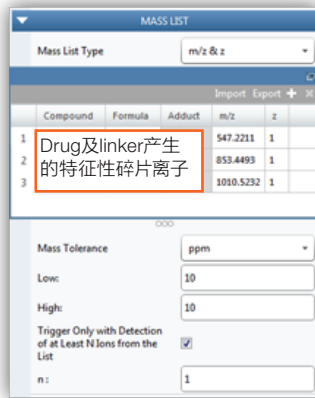
表1 液相色谱梯度

Time [mm:ss]	Duration [mm:ss]	Flow [nl/min]	Mixture [%B]
00:00	00:00	300	3
03:00	03:00	300	8
45:00	42:00	300	45
54:00	09:00	300	60
56:00	02:00	300	100
60:00	04:00	300	100

质谱:

Full MS-ddHCD-Targeted Mass Trigger EThcD, 通过监控HCD碎裂后drug及linker产生的特征碎片离子以触发同一个母离子的EThcD二级碎裂, target list如下所示:

表2 drug及linker产生的特征碎片离子列表



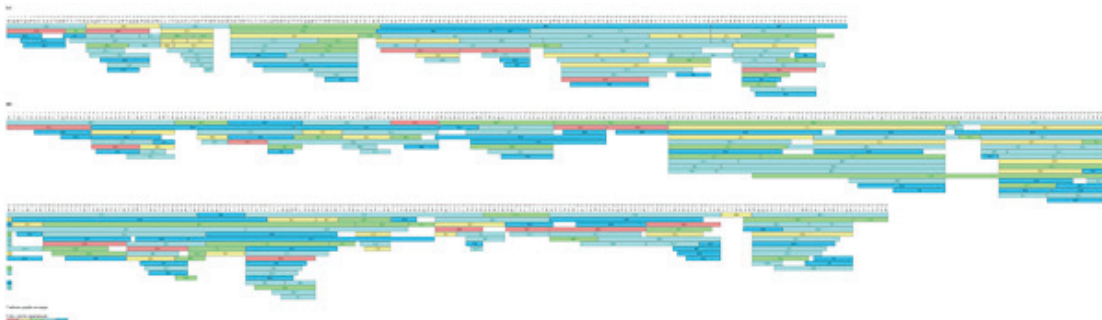
2.4 数据处理

数据分析使用Thermo BioPharma Finder 3.0软件平台。

三、结果与讨论

下图为T-DM1仅经过胰酶酶切后上机进行肽图分析的序列覆盖度结果。由图中可以看出, ADC的序列实现了100%全覆盖; 对于所有46个可能发生修饰的位点, 总共鉴定到33个位点发生了MCC+DM1 (即linker+drug) 修饰, 3个位点仅被linker修饰, 10个位点没有发生修饰。

图2 T-DM1序列覆盖图



下图为肽段HKVYACEVTHQGLSSPVTK的HCD二级碎裂谱图。由HCD MS2谱图中能够发现547.2216等小分子药物碎裂产生的特征性碎片离子, 证明该肽段存在MCC-DM1修饰; 然而HCD会使小分子药物与氨基酸断开并发生自身碎裂, 且赖氨酸上的药物修饰通常会导致胰酶的漏切, 产生包含多个K的肽段, 故HCD碎裂无法确认修饰位点。

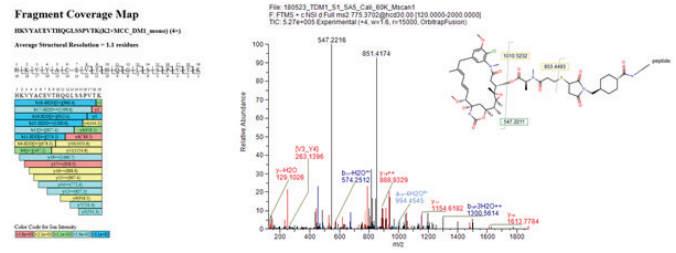


图3A 肽段HKVYACEVTHQGLSSPVTK HCD MS2 谱图

对同一条肽段EThcD二级碎裂的谱图进行分析, 由于EThcD可以完整将linker+drug的修饰保留在侧链上, 仅对肽段进行碎裂, 故可以找到足够多的c/z离子对修饰位点进行精确表征; 下图展示了使用EThcD碎裂, 可以确认修饰是发生在肽段的K2 (即轻链K190) 上。

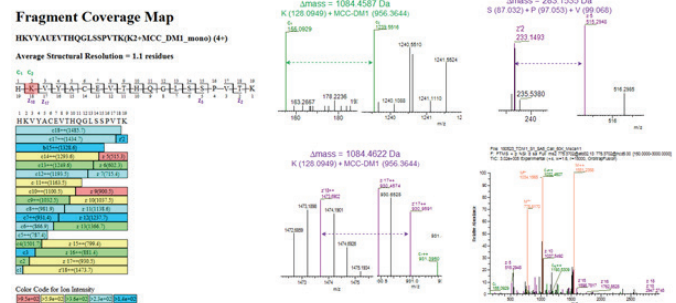


图3B肽段HKVYACEVTHQGLSSPVTK EThcD MS2 谱图

对于一些较短的肽段, HCD无法得到足够多的碎片对肽段序列进行表征, 而EThcD碎裂可以得到一系列包含drug+linker修饰的碎片离子, 从而表征修饰位点信息 (图4)。

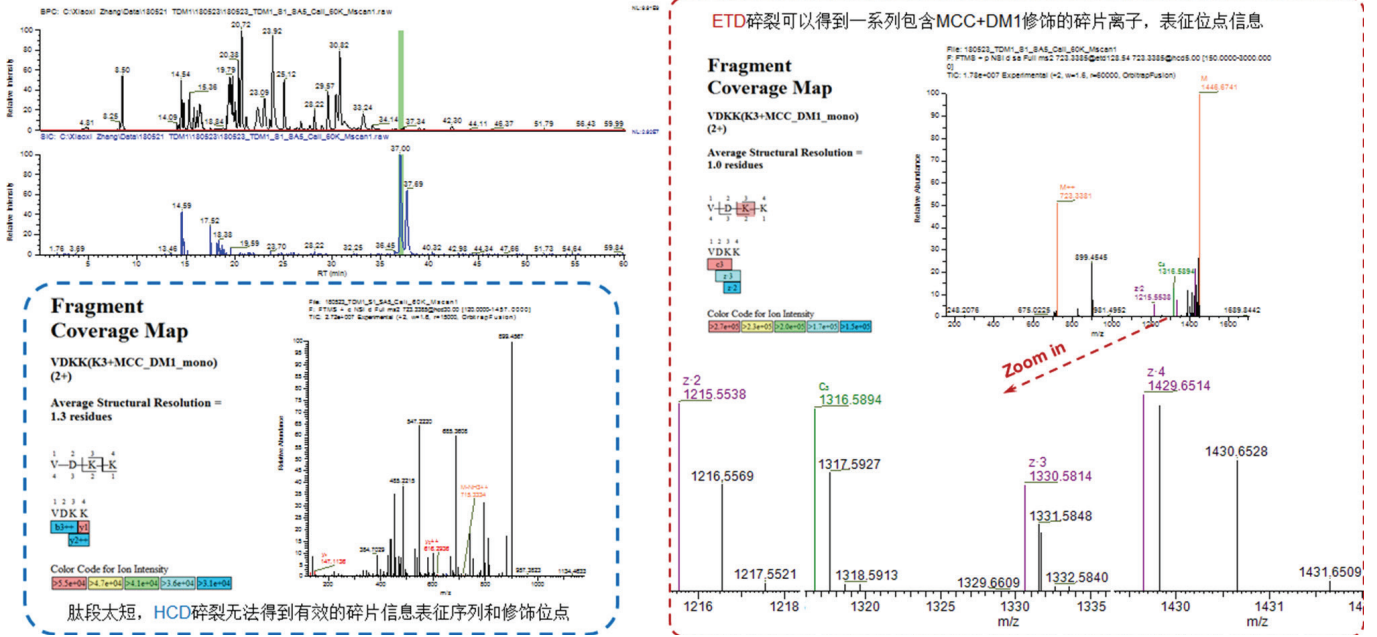


图4 肽段VDKK HCD及EThcD MS2 谱图对比

使用BioPharma Finder处理所得修饰位点及其修饰比例见下表, 可见有几个位点修饰比例极高, 接近或达到100%; 也有部分位点的修饰比例在1%以下, 进一步揭示了小分子药物偶联的复杂性和多样性; 另有三个Linker Only的位点; LC149/HC76/HC442。

表3 修饰位点及其修饰比例

Protein	Residue #	Modification	Category	Sequence	Confidence	% Abundance 180523_TDM1_S1_SAS_Cali_60K_Miscan1
LC	1	D1+MCC_DM1	Modification	DIQMTQSPSSLSASVGDGR	> 85	0.0733%
LC	39	K39+MCC_DM1_mono	Modification	ASQDVNTAVAWYQQKPGK	> 85	0.1143%
LC	42	-K42+MCC_DM1_mono	Modification	ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK; QKQKPGKAPK; PGKAPK	> 85	2.3446%
LC	107	K107+MCC_DM1_mono	Modification	VEIKR	> 85	100.0000%
LC	126	K126+MCC_DM1_mono	Modification	IFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR	> 85	0.1945%
LC	145	K145+MCC_DM1_mono	Modification	EAKVQWK	> 85	100.0000%
LC	169	K169+MCC_DM1_mono	Modification	VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY	> 85	0.2750%
LC	183	K183+MCC_DM1_mono	Modification	TLSKADYEK	> 85	100.0000%
LC	188	K188+MCC_DM1_mono	Modification	ADYEKHK; ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK	> 85	20.1773%
LC	190	K190+MCC_DM1_mono	Modification	HKVACEVTH; HKVACEVTHQGLSSPVTK	> 85	0.5311%
LC	207	K207+MCC_DM1_mono	Modification	VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR; VYACEVTHQGLSSPVTKSF	> 85	1.1438%
HC	1	E1-MCC_DM1	Modification	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	> 85	0.5749%
HC	30	K30+MCC_DM1_mono	Modification	LSCAASGFNIKDTYIHWVR; LSCAASGFNIKDTY	> 85	1.0302%
HC	43	K43+MCC_DM1_mono	Modification	QAPGKLEWVAR	> 85	5.2115%
HC	65	K65+MCC_DM1_mono	Modification	YADSVKGR	> 85	99.7128%
HC	124	K124+MCC_DM1_mono	Modification	AMDYWGQGLVLTVSSASTKGPSVFLAPSSK	> 85	0.7507%
HC	136	-K136+MCC_DM1_mono	Modification	GPSVFLAPSSKSTSGTAALGCLVK	> 85	1.4244%
HC	216	K216+MCC_DM1_mono	Modification	VDKK	> 85	100.0000%
HC	217	K217+MCC_DM1	Modification	KVEPK	> 85	55.0908%
HC	217	K217+MCC_DM1_mono	Modification	KVEPK	> 85	44.9091%
HC	225	K225+MCC_DM1_mono	Modification	SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV; SCDKHTHTCPPCPAPELL; SCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	> 85	1.8783%
HC	249	K249+MCC_DM1_mono	Modification	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK; THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDLMISR	> 85	4.4880%
HC	251	K251+MCC_DM1_mono	Modification	PKDTLMISR	> 85	0.1310%
HC	291	-K291+MCC_DM1_mono	Modification	NAKTK; FNWYVDGVEVHNAKTKPR	> 85	0.5488%
HC	293	K293+MCC_DM1_mono	Modification	TKPR	> 85	100.0000%
HC	323	K323+MCC_DM1_mono	Modification	EYCKK	> 85	99.9597%
HC	325	K325+MCC_DM1_mono	Modification	CKVSNK	> 85	100.0000%
HC	329	K329+MCC_DM1_mono	Modification	VSNKALPAIEK	> 85	4.4390%
HC	337	K337+MCC_DM1_mono	Modification	ALPAIEKTSK	> 85	5.0002%
HC	341	K341+MCC_DM1_mono	Modification	TISKAK	> 85	100.0000%
HC	343	K343+MCC_DM1_mono	Modification	AKGQPR	> 85	100.0000%
HC	363	K363+MCC_DM1_mono	Modification	EEMTKNQVSLTCLVK	> 85	0.4685%
HC	395	K395+MCC_DM1_mono	Modification	ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK; GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK;...	> 85	0.0786%
HC	417	K417+MCC_DM1_mono	Modification	LTVDKSR	> 85	100.0000%

四、小结

在本实验中，我们基于Orbitrap Fusion Lumos平台，使用特有的HCD trigger EThcD碎裂模式，对T-DM1的小分子药物偶联位点进行了深入解析。

通过HCD碎裂得到小分子药物及linker的特征性碎片离子后，用其触发同一母离子的EThcD二级碎裂，可在完整保留侧链药物修饰的情况下，对肽键进行碎裂，从而实现小分子药物偶联位点的精确解析。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C