

# Application News

## No. B86

### MALDI-TOF 质量分析法

## 化学修饰抗体的简易质谱测定

—使用台式 MALDI-TOF MS 进行修饰有无、修饰数量的确认—

抗体药物偶联物 (Antibody drug conjugate: ADC) 是一种在 21 世纪出现的抗体与药物相结合的药剂。通过抗体的高选择性和小分子药物本身的药效, 与传统小分子药物相比, ADC 有望可以实现更加高效的抗癌作用。目前 ADC 已经有几种产品上市, 但是在将其他化合物与蛋白质进行人工偶联时, 该化合物偶联到了什么程度, 是在哪个位点偶联的, 都是药剂重要的质量特性之一。

在本文中, 我们将为您介绍一种使用 MALDI-TOF MS 分析在研究用标准抗体中人为偶联了低分子量化合物的仿制 ADC 的实例。

S. Nakaya

### ■ 非还原状态下低分子化合物修饰抗体的质谱分析

使用 Seki 等人的方法<sup>1)</sup>, 将在色氨酸残基上修饰有 Me-fluorescein-ABNO 基团的标准抗体 (图 1, NISTmab, Humanized IgG κ monoclonal antibody, RM8671) 及未处理的标准抗体 (各 0.5 μL) 分别与基质溶液 (10 mg/mL 芥子酸、50%乙腈、0.1% 三氟乙酸) 等体积混合后, 滴加到 MALDI 靶板上进行质谱分析。质谱分析使用的是台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” (图 2)。

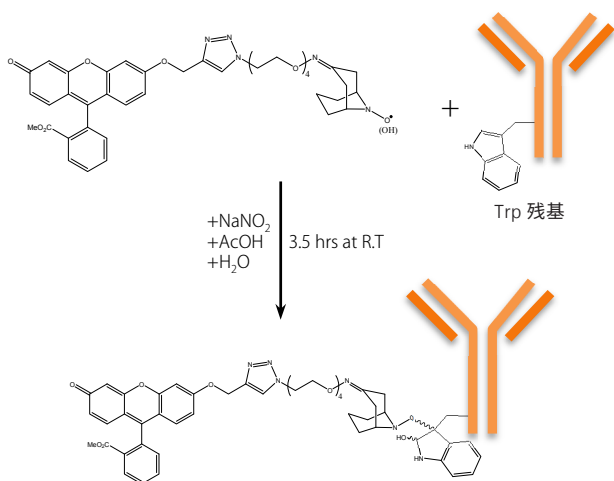


图 2 台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 外观

通过将非还原状态的修饰处理抗体与未处理抗体的 MS 质谱进行比较, 如图 3 所示, 相对于未处理抗体, 在修饰处理抗体中检测到了相当于三个修饰基团的质量差信号。

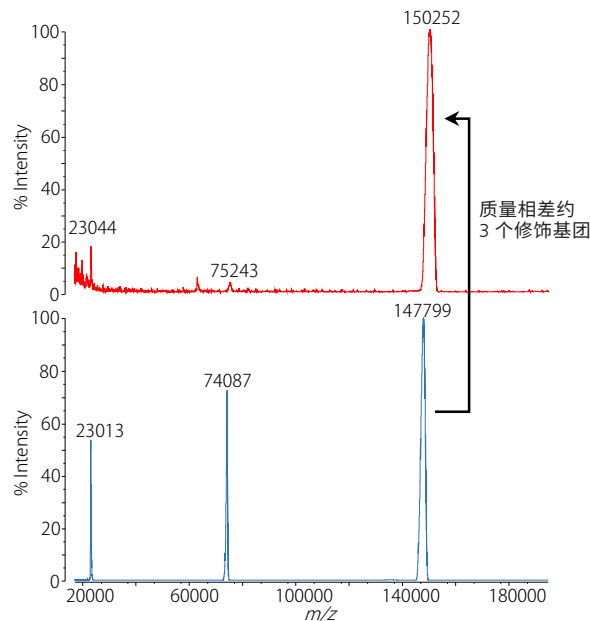


图 3 修饰处理抗体与未处理抗体的质谱图  
(上: 修饰处理抗体、下: 未处理抗体)

## ■ 实施了还原处理的抗体的质谱分析

在修饰处理抗体及未处理抗体（各 4  $\mu\text{L}$ ）中分别加入 50 mM DTT 水溶液（1  $\mu\text{L}$ ），在 57°C 条件下进行 1 小时的还原处理。取各反应溶液（0.5  $\mu\text{L}$ ）滴加到 MALDI 靶板上，覆盖 0.5  $\mu\text{L}$  的基质溶液（10 mg/mL 芥子酸、50% 乙腈、0.1% 三氟乙酸），干燥后进行质谱分析。

从测定结果来看（图 4），修饰处理抗体和未处理抗体的轻链（ $m/z \sim 23160$ ）未发现变化。但是，对于重链（ $m/z \sim 51,000$  &  $\sim 52,000$ ）来说，修饰处理抗体中检测到了与未处理抗体相比约一个修饰基团和约两个修饰基团的质量偏移信号。

由图 3、图 4 的结果可知对于本次实验中使用的修饰处理抗体来说：(i) 添加三个 Me-fluorescein-ABNO 基团的成分占比最多，

(ii) 化学修饰只出现在抗体的重链中；(iii) 而且，在构成抗体分子的两条重链中，一条只在一处发生了修饰，另一条在两处发生了修饰（图 5）。

这次使用的标准抗体中共有 22 个能够结合 Me-fluorescein-ABNO 的色氨酸残基，但其中仅有 3 个色氨酸被修饰的抗体检测到的丰度最高。这可能是由于抗体的立体结构限制了 Me-fluorescein-ABNO 的进入。

台式 MALDI-TOF MS “MALDI-8020” 的一个重要特点是样品的快速导入，使用者可以从导入样品后的数分钟内开始分析，提高了实验效率。在这里，我们以发生修饰的单克隆抗体为例，证明 MALDI-8020 可以快速、简便地确定抗体中小分子修饰的程度。

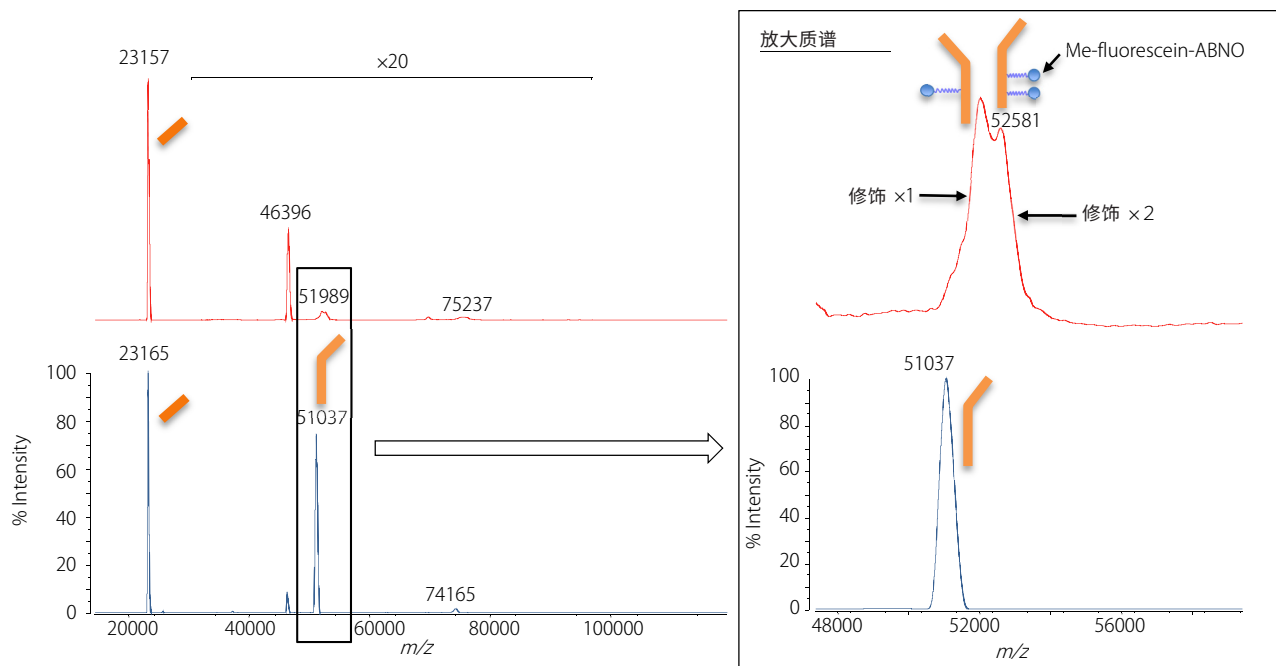


图 4 还原处理后的修饰处理抗体与未处理抗体的质谱图  
(上：修饰处理抗体、下：未处理抗体)

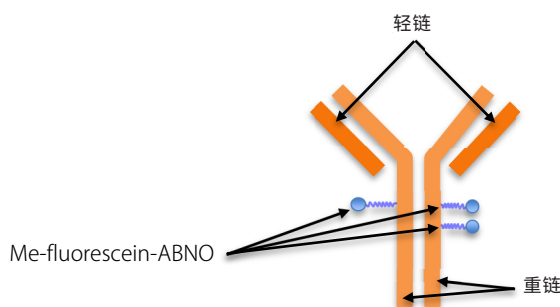


图 5 在本次的分析中推测为主要成分的修饰处理抗体的模式图

### 参考文献

1) Y Seki, T Ishiyama, D Sasaki, J Abe, Y Sohma, K Oisaki, and M Kanai., Transition Metal-Free Tryptophan-Selective Bioconjugation of Proteins. J. Am. Chem. Soc. 2016,138 (34) ,10798-801.

### 致谢

感谢东京大学药物科学研究生院有机合成化学实验室准备 Me-fluorescein-ABNO 修饰抗体。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439  
400-650-0439

### 免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2018 年 12 月