

一种采用 LC-MS/MS 法检测 ADC 中 TCEP 含量的方法

技术领域

[01] 本发明属于生物医药领域，涉及一种采用液相色谱—串联质谱 (LC-MS/MS，或称 LC-MSMS) 法检测抗体药物偶联物 (Antibody Drug Conjugate, ADC) 样品中 TCEP 含量的方法。

背景技术

[02] TCEP，又被称为：三(2-羧乙基)膦，是一种非常有效的硫醇类还原剂，广泛用作蛋白质化学及蛋白质组学研究中二硫键的定量还原剂。该试剂在水溶液中的稳定性和溶解性都很好，在酸性、碱性溶液中的稳定性也不错，因而在蛋白质化学及蛋白质组学研究常常优先选择 TCEP。

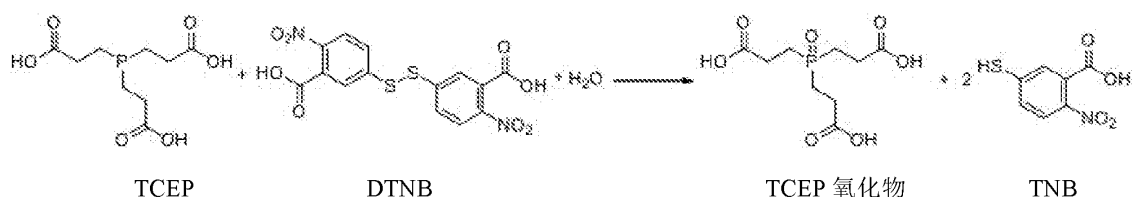
[03] 与用于还原蛋白质的其他两种常见的药剂（二硫苏糖醇和 β -巯基乙醇）相比，TCEP 是一种无味的，更强力且不可逆的还原剂，TCEP 介导的二硫键裂解的产物实际上是两个游离硫醇/半胱氨酸，更亲水，更耐空气氧化。它也不会减少固定化金属亲和层析中使用的金属。

[04] TCEP 目前广泛用于 ADC 产品的生产，添加步骤为单抗还原工序，主要目的是保护还原后的蛋白。工艺实践表明：在无还原剂添加时无法正常偶联 ADC 或者偶联后产品质量下降，但是在抗体还原之后的合成步骤中就不再需要 TCEP，而在现有合成 ADC 的技术中的后续处理中没有特定针对 TCEP 的去除工艺，只在产品透析过程中有去除，因此其在 ADC 产品中具有残留的可能性，对后续成药安全性有一定的负面影响，不容忽视。目前现有技术未发现有专门针对 ADC 相关产品中的 TCEP 检测的研究。

[05] LC-MS/MS 实际上是将 LC 技术与两次 MS 技术结合的一项综合性检测技术。LC-MS/MS 是液相色谱 (LC) 与质谱 (MS) 的组合使用，其工作原理为：样品进样后首先在流动相的携带下进入色谱柱，经过色谱柱分离后，进入质谱进行检测。质谱根据被测物的质荷比 (m/z) 进行检测，被测物在离子源转换成气相离子进入质谱，在三重四级杆中一级质谱扫描特定范围离子或允许特定离子进入碰撞室，在碰撞室内分子离子碰撞裂解，形成子离子进入二级质谱，二级质谱扫描特定范围离子或允许特定离子进入检测器。由此可见，LC-MS/MS 联用的优点非常显著，因为气相色谱只能分离易挥发且不分解的物质，而液相色谱则大大拓宽了分离范围，由此可见，LC 与高选择性、高灵敏度的 MS/MS 结合，可对复杂样

品进行实时分析,即使在 LC 难分离的情况下,只要通过 MS1 及 MS2 对目标化合物进行中性碎片扫描,则可发现并突出混合物中的目标化合物,显著提高信噪比。

- [06] 在一定 pH 值范围内,三(2-羧乙基)膦(TCEP)能定量地将芳香族双硫键化合物还原,因此可通过测量与 Ellman (DTNB) 反应后形成的 5-巯基-2-硝基苯甲酸(TNB)的量来方便地确定 TCEP 的浓度(见 Analytical Biochemistry, 1994, 220: 5~10),因此,目前报道的 TCEP 检测中多采用 Ellman 反应衍生。其反应原理如下所示:



- [07] 但是蛋白药物和药物中用的很多试剂也可以和 DTNB 反应生成 TNB,因此,通过检查 TNB 的量来确定 ADC 中 TCEP 的浓度的方法容易受到样品中其他还原剂的影响,准确性不高。

- [08] 且目前针对 TCEP 含量的检测方法较少。由于 TCEP 极性大, C18 无保留,在 UV 检测器下响应较低,质谱响应低。因而没有有效的直接检测方法。本申请发明人将 LC-MS/MS 用于抗体药物偶联物产品中的 TCEP 检测,开发了一种高效、稳定、准确性高的检测方法。

发明内容

- [09] 本专利采用 LC-MS/MS 法检测抗体药物偶联物产品中的 TCEP,样品采用 Ellman 法衍生,检测 TCEP 衍生化产物的含量,而非检测 TNB 的含量,能够排除复杂 ADC 样本中可能与 Ellman 试剂(DTNB)反应的物质带来的干扰,且无需进行样品前处理,专属性强。

- [10] 本发明第一方面涉及一种采用液相色谱—串联质谱(LC-MS/MS)检测 ADC 样品中 TCEP 含量的方法,其特征在于,检测的 ADC 样品采用 Ellman 反应衍生,采用 C18 色谱柱,无需样品前处理。

- [11] 进一步的,采用的流动相 A 为包括甲酸的水溶液;优选包括 0.1% 甲酸的水溶液。

- [12] 进一步的,采用的流动相 B 为包括甲酸的乙腈/甲醇溶液;优选包括

0.1%甲酸的乙腈/甲醇(80/20, v/v)溶液。

[13] 进一步的, 加入的 Ellman 试剂的浓度约为 5—20 $\mu\text{g/ml}$, 进一步优选为 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

[14] 进一步的, 所述方法采用 TCEP 制作标准品溶液。

5 [15] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 其中所述方法采用 TCEP 制作标准品溶液。

[16] 进一步的, 所述标准品溶液优选为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP 溶液。

[17] 进一步的, 所述 TCEP 溶液的配置及标准曲线系列溶液配制包括如下步骤:

10 [18] 1) TCEP 工作液配制: 称取 5~10 mg 的 TCEP · HCl 参比品到 EP 管中, 称取质量用 m 表示, 用适量样品溶解液溶解, 通过 TCEP · HCl 与 TCEP 摩尔比为 1: 1 的关系计算 TCEP 浓度后, 用稀释液逐级稀释至 TCEP 浓度为 1.0 $\mu\text{g/ml}$;

15 [19] 2) 标准曲线系列溶液配制: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP 标准品溶液, 用稀释液将其稀释成浓度分别为 16 ng/ml、8 ng/ml、4 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml、0.5 ng/ml 的 TCEP 标准品溶液。

[20] 所述方法进一步包括质控溶液, 所述质控溶液采用稀释液分别稀释 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP 溶液制备而成, 质控溶液的浓度为 12 ng/ml(HQC)、3 ng/ml(MQC)、1 ng/ml(LQC)的 TCEP 质控溶液。

20 [21] 进一步的, 所述稀释液为 50%的甲醇水溶液。

[22] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 所述液相色谱仪包括但不限于: 美国安捷伦公司 Agilent 1200 型液相色谱仪、Teledyne Isco 高压制备液相色谱仪、安捷伦 HPLC 1260 高效液相色谱仪;

25 [23] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 所述串联质谱仪包括但不限于: 美国 AB Sciex 公司 API 4000 型串联质谱仪、岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪、GBC 电感耦合等离子体直角加速式飞行时间质谱仪 Optimass;

[24] 根据本发明第一方面任一实施方案所述的方法, 液相色谱采用 C18 柱, 包括但不限于: YMC-C18、Agilent Extard-C18、资生堂 PAK CR-18;

[25] 在本发明任一方面的任一实施方案中,任一技术特征可以适用于其它实施方案中的该技术特征,只要它们不会出现矛盾。本发明所引述的所有文献,它们的全部内容通过引用并入本文,并且如果这些文献所表达的含义与本发明不一致时,以本发明的表述为准。

5 附图说明

[26] 图 1: 线性拟合标准曲线

[27] 图 2: LC-MS/MS 法测定 TCEP 含量检测结果

具体实施方式

实施例 1 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定 TCEP 含量

10 1)工作液的配制;

[28] TCEP 工作液配制:精密称取 5~10 mg 的 TCEP·HCl 参比品到 EP 管中,称取质量用 m 表示,用适量样品溶解液溶解,通过 TCEP·HCl 与 TCEP 摩尔比(1: 1)计算 TCEP 浓度(TCEP 浓度=250.19m/286.65)后,用稀释液逐级稀释至 TCEP 浓度为 1.0 μ g/ml。

15 [29] DTNB 工作液配制:精密称取 5~10 mg 的 DTNB 到 EP 管中,用适量样品溶解液溶解至浓度 10 mg/ml,用稀释液逐级稀释至 10 μ g/ml。

[30] 标准曲线系列溶液配制:按照表 1 用稀释液将 1.0 μ g/ml 的 TCEP(设为 A1)稀释成浓度分别为 16 ng/ml、8 ng/ml、4 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml、0.5 ng/ml 的 TCEP 参比品溶液,分别取上述不同浓度溶液 200 μ l,各自
20 加入 20 μ l 浓度为 10 μ g/ml 的 DTNB 工作液,涡旋混合,室温避光反应 2h 后可直接上机检测。

[31] 表 1

样品名称	工作液名称	工作液体积(μl)	稀释液体积(μl)	总体积(μl)	终浓度(ng/ml)
A2	A1	50	450	500	100
STD6	A2	80	420	500	16
STD5	STD6	250	250	500	8
STD4	STD5	250	250	500	4
STD3	STD4	250	250	500	2
STD2	STD3	250	250	500	1

STD1	STD2	250	250	500	0.5
------	------	-----	-----	-----	-----

[32] 质控溶液配制：按照表 2 用稀释液将 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP（设为 A1'）稀释成浓度分别为 400 ng/ml (HQC)、200 ng/ml (MQC)、100 ng/ml (LQC) 的 TCEP 质控溶液。分别取上述不同浓度的 TCEP 质控溶液各 200 μl ，加入 20 μl 浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTNB 工作液，旋涡混合，室温避光反应 10 min 后，直接上机检测。

[33] 表 2

样品名称	工作液名称	工作液体积(μl)	稀释液体积(μl)	总体积(μl)	TCEP 终浓度(ng/ml)
HQC	A1'	400	600	1000	400
MQC	HQC	500	500	1000	200
LQC	MQC	500	500	1000	100

2)液相色谱-串联质谱测定：

[34] 待测样品处理：以流动相（0.1%甲酸的乙腈/甲醇(80/20, v/v)溶液）作为稀释液，将 ADC 样品浓度稀释至适当浓度（样品 TCEP 含量在线性区间内，若超出范围则需加大/减小稀释倍数再次检测）。取 200 μl 样品稀释液，加入 20 μl 浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 DTNB 溶液，涡旋混合，室温避光反应 2h 后，直接上机检测。

[35] 流动相 A 的配制：量取 800 ml 水，加入甲酸 800 μl ，超声混匀即得。

[36] 流动相 B 的配制：量取 800 ml 乙腈、甲醇 200 ml，加入甲酸 1 ml，超声混匀即得。

[37] 流动相 A 和流动相 B 按照表 3 所示的浓度梯度进行洗脱。

[38] 表 3

洗脱梯度	洗脱时间 (min)	模块	事件	参数
	0.2	Pumps	Pump B ConC	5
	4	Pumps	Pump B ConC	60
	5	Pumps	Pump B ConC	95
	6	Pumps	Pump B ConC	95

	6.1	Controller	Stop	/
--	-----	------------	------	---

3)数据处理与分析

[39] 评价标准： $r\geq 0.9800$ ，定量下限与定量上限之间的浓度范围为标准曲线的定量范围，标准曲线浓度点回收率在 85%-115%之间，定量上限及定量下限浓度点回收率在 80%-120%。

- 5 [40] 质控的回收率在 85%-115%之间，每一浓度的质控样品至少 50%符合该范围，且同一分析批次至少 4 个质控浓度点符合要求。

具体结果如下：

[41] 表 4：标准曲线（具体拟合曲线参见图 1）

样品名称	样品类型	实际浓度(ng/ml)	峰面积	保留时间	计算浓度(ng/ml)	准确性
STD1	Standard	2	2.85E+04	2.99	1.99	99.5
STD2	Standard	4	6.23E+04	2.98	4.127	103.16
STD3	Standard	8	1.18E+05	2.98	7.661	95.76
STD4	Standard	16	2.45E+05	2.98	15.684	98.02
STD5	Standard	32	5.21E+05	2.97	33.17	103.65
STD6	Standard	64	1.01E+06	2.98	63.932	99.89

[42] 线性拟合后获得标准曲线如下：

- 10 [43] $y = 16058x - 416744$ ， $R^2 = 0.9936$ ，根据图 1 的结果显示， $R^2>0.99$ ，拟合性极好。

实施例 2 检测方法结果与评价

1) 重复性

- 15 [44] 取供试品 1000 μl ，加入 TCEP 标准品（浓度 1.0 $\mu\text{g/ml}$ ）8 μl ，取上述溶液 200 μl ，加入 100 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的 DTNB 溶液 20 μl ，涡旋混合，室温避光反应 2h，平行制备 6 份，测定 6 份的浓度结果进行评价。具体结果见表 5。

[45] 表 5

样品	实测浓度	样品中 TCEP	测得标准品
----	------	----------	-------

	(ng/ml)	浓度 (ng/ml)	浓度 (ng/ml)
1	12.565	3.636	8.925
2	13.019	3.636	9.379
3	13.448	3.636	9.808
4	12.706	3.636	9.066
5	12.456	3.636	8.816
6	13.116	3.636	9.476
	RSD(%)		4.1

[46] 定量分析领域中，重复性是指在相同操作条件下，由同一个分析人员在较短的间隔时间内测定所得结果的精密度，重复性的可接受标准：主峰浓度 $RSD \leq 15.0\%$ ，本试验 $RSD = 4.1\%$ ，因此本方法的可重复性很好。

2) 准确性

- 5 [47] 取适量供试品，高、中、低浓度标准品 TCEP 加入量及标准品终浓度分别是质控溶液的 LQC 溶液（4 ng/ml），MQC 溶液（16 ng/ml）和 HQC 溶液（50 ng/ml）。供试品与标准品加入量如表 6 所示，准确性结果见表 7。

[48]

表 6

浓度(ng/ml)	供试品加入量 (μ l)	标品 TCEP 浓度 (ng/ml)	标准品加入量 (μ l)
	960	100	40
4	960	100	40
	960	100	40
	984	1000	16
16	984	1000	16
	984	1000	16
	950	1000	50
50	950	1000	50
	950	1000	50

[49]

表 7

加标浓度	实测浓度	样品中浓度	加入标准品浓度	RSD	回收率
(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(ng/ml)	(%)	(%)
4	9.183	5.866	3.318	3.1	82.9
	9.391	5.866	3.526		88.1
	9.311	5.866	3.446		86.1
16	7.164	3.636	16.677	2.5	104.2
	7.365	3.636	15.918		99.5
	7.415	3.636	16.559		103.5
50	21.629	3.636	51.235	0.8	102.5
	22.239	3.636	51.245		102.5
	22.888	3.636	51.987		104.0

- [50] 准确性的可接受标准：回收率在 70.0%—130.0%， $RSD \leq 15.0\%$ ；本实验中的回收率在 82.9%~104.2%之间，RSD 分别为 3.1%、2.5%、0.8%，因此，根据的检测结果来看，本方法准确、选择性强、灵敏度高，适合检测抗体药物偶联物样品中的 TCEP 浓度。
- [51] 以上通过本发明较佳实施例对本发明的精神作了详细阐述。本领域技术人员理解，凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何修改、等同变化与修饰，均落在本发明的保护范围内。

权 利 要 求 书

1. 一种采用液相色谱—串联质谱 (LC-MS/MS) 检测 ADC 样品中 TCEP 含量的方法, 其特征在于, 检测的 ADC 样品采用 Ellman 反应衍生, 采用 C18 色谱柱, 无需样品前处理。

2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述 C18 色谱柱使用的流动相 A 为包括甲酸的水溶液; 优选包括 0.1% 甲酸的水溶液。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其特征在于, 所述 C18 色谱柱使用的流动相 B 为包括甲酸的乙腈/甲醇溶液; 优选包括 0.1% 甲酸的乙腈/甲醇 (80/20, v/v) 溶液。

4. 根据权利要求 3 所述的方法, 其特征在于, 加入的 Ellman 试剂的浓度约为 5—20 $\mu\text{g/ml}$, 进一步优选为 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 。

5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其特征在于, 所述方法采用 TCEP 制作标准品溶液。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述标准品溶液优选为 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP 溶液。

7. 根据权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述 TCEP 溶液的配制及标准曲线系列溶液配制包括如下步骤:

1) TCEP 工作液配制: 称取 5~10 mg 的 TCEP · HCl 参比品到 EP 管中, 称取质量用 m 表示, 用适量样品溶解液溶解, 通过 TCEP · HCl 与 TCEP 摩尔比为 1: 1 的关系计算 TCEP 浓度后, 用稀释液逐级稀释至 TCEP 浓度为 1.0 $\mu\text{g/ml}$;

2) 标准曲线系列溶液配制: 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP 标准品溶液, 用稀释液将其稀释成浓度分别为 16 ng/ml、8 ng/ml、4 ng/ml、2 ng/ml、1 ng/ml、0.5 ng/ml 的 TCEP 标准品溶液。

8. 根据权利要求 7 的所述的方法, 其特征在于, 所述方法进一步包括质控溶液, 所述质控溶液采用稀释液分别稀释 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 TCEP 溶液制备而成, 质控溶液的浓度为 12 ng/ml、3 ng/ml、1 ng/ml 的 TCEP 质控溶液。

9. 根据权利要求 7-8 任一项所述的方法, 其特征在于, 所述稀释液为 50% 的甲醇水溶液。

10. 根据权利要求 1-8 任一项所述的方法, 所述液相色谱包括但不限于: 美国安捷伦公司 Agilent 1200 型液相色谱仪、Teledyne Isco 高压制备

液相色谱仪、安捷伦 HPLC 1260 高效液相色谱仪。

11. 根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述串联质谱包括但不限于：美国 AB Sciex 公司 API 4000 型串联质谱仪、岛津三重四极杆液相色谱质谱联用仪、GBC 电感耦合等离子体直角加速式飞行时间质谱仪
5 Optimass。

12. 根据权利要求 1-8 任一项所述的方法，所述 C18 色谱柱，包括但不限于：YMC-C18、Agilent Extard-C18、资生堂 PAK CR-18。