

蛋白質科學 暨 技術服務 電子報

技術佈告欄 Technical Bulletin

抗體藥物複合體與其分析方法簡介

介紹抗體藥物複合體(ADC)的結構組成，分類以及其分析方法。

值日生
PSS

焦點新聞 News

法規資訊-

2015年12月TFDA公告新的生物相似性
單株抗體藥品查驗登記基準

明生焦點-

明生生物科技全新官網上線，歡迎瀏覽!

抗體藥物複合體與其分析方法簡介

(Antibody drug conjugate analysis)

前言

抗體藥物複合體 (ADC, Antibody drug conjugate) 為一種新興的抗癌生物治療藥物 (Bio-therapeutic)，藉由單株抗體 (monoclonal antibody) 之專一性，引導高殺傷力的細胞毒素 (cytotoxin) 至癌細胞處清除腫瘤，和傳統的單株抗體療法相比，藥效更強，不會阻礙單株抗體本身引起的細胞毒殺作用 (ADCC, Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) 與補體作用 (CDC, complement-dependent cytotoxicity)，更能帶著低劑量即可發揮作用的小分子藥物直接抵達目標癌細胞，而不會錯殺正常的健康細胞。至今已有兩個成功上市的ADC：T-DM1, Trastuzumab emtansine (Kadcyla™) 與 Brentuximab vedotin (Adcetris™)，最近出現通過臨床第三期的抗體藥物複合體 Inotuzumab ozogamicin 成功得到FDA認證的突破性治療藥物認證 (BTD, Breakthrough therapy designation)^[9]。儘管第一個抗體藥物複合體 Gemtuzumab ozogamicin, (Mylotarg™) 因安全性問題在2010年下市，但這種新型藥物仍被各界看好，相當具有潛力。目前約有50個抗體藥物複合體處於臨床試驗階段，其中25% 正在臨床試驗第二期與第三期。

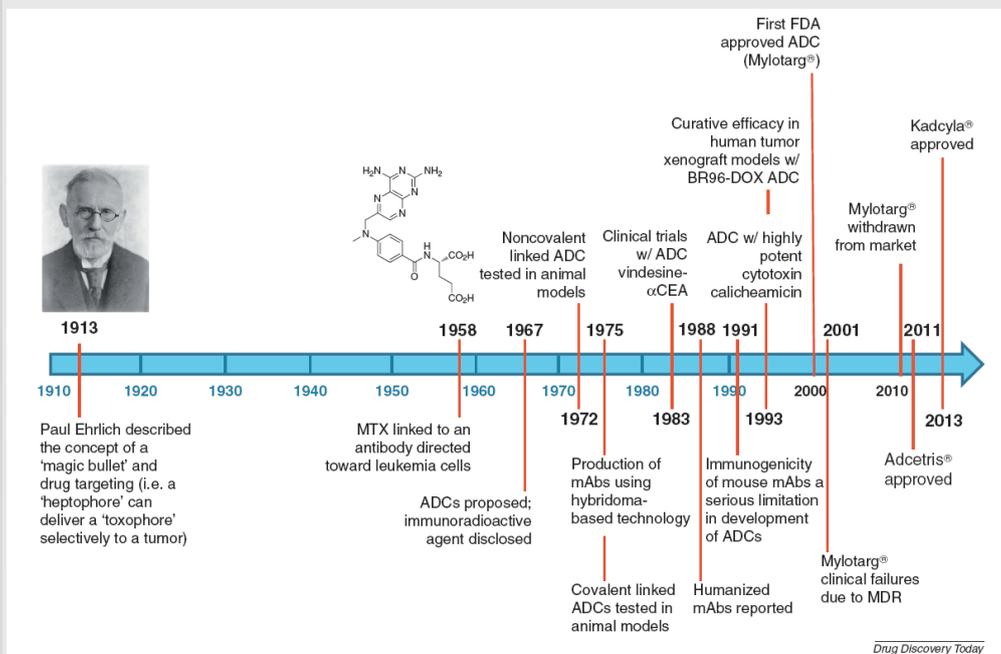


圖1. 抗體藥物複合體(ADC, Antibody drug conjugate) 發展時間軸。縮寫: mAbs, monoclonal antibodies; MDR, multidrug resistance; MTX, methotrexate^[1](Perez, H. L. et al. Drug discovery today 19, 869–881 (2014).)。

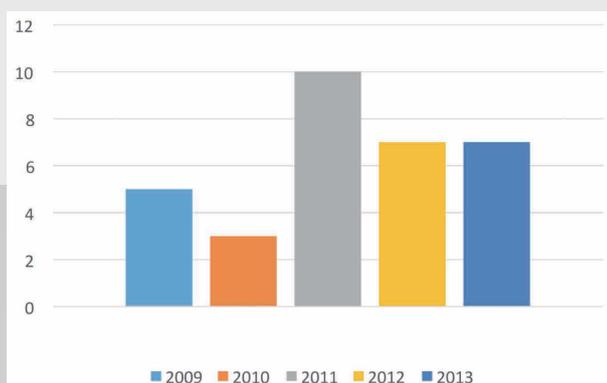


圖2. 截至2013年底各年度進入臨床試驗之ADC數量^[7] (Beck, A. & Reichert, J. M. mAbs 6, 15–17 (2014).) °

抗體藥物複合體(ADC)簡介

1. ADC的結構

ADC結構主要分為三個部分：具有專一性能夠辨認腫瘤細胞表面抗原(antigen)並提供連接位點(attachment site)胺基酸的單株抗體(monoclonal antibody)、一種在低劑量也能作用的小分子藥物(例如：cytotoxin)、一個可在抗體與小分子藥物間產生共價鍵結但會在適當時機分離的连接子(linker)。

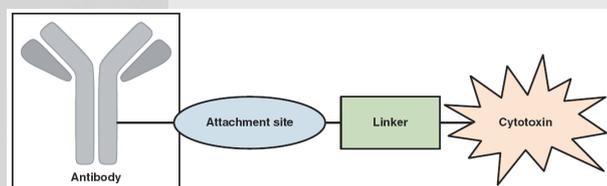


圖3. 抗體藥物複合體的主要組成內容^[1](Perez, H. L. et al. Drug discovery today 19, 869–881 (2014).) °

2. ADC的分類

ADC可依照藥物和抗體上不同鍵結位點的胺基酸分類，目前主要分成兩大類：離胺酸鍵結(lysine-linked)型與半胱氨酸鍵結(cysteine-linked)型(圖4)。Lysine-linked的ADC特徵是結構複雜，異質性高，好處是鍵結穩固，抗體的結構不太會因測定方式產生改變、測定過程中可能造成變性(denature)的條件並不易使抗體上的藥物掉落，例如：逆相層析法(reversed-phase chromatography)、還原劑、強酸、高溫。目前市面上的ADC中，Trastu-

zumab emtansine即為此類型代表。

另一種為半胱氨酸鍵結(Cysteine-linked)型，這類型的ADC可再細分為兩類：一種大多利用抗體本身帶有的八對雙硫鍵進行還原後加上連接子(linker)與細胞毒素(cytotoxin)；一種則是設計特定位點提供鍵結，前者優點是跟lysine-linked型相比鍵結位置較固定，結構較單純，然而當一個抗體的藥物負載量(payloads)提高時，必然需要使用更多的雙硫鍵進行藥的接合，如此一來維持結構的雙硫鍵(指連接重鏈和輕鏈的雙硫鍵與兩個重鏈之間的雙硫鍵，inter-chain disulfide bonds)也會進行反應，抗體便不是以共價鍵維持原本構型，在非自然(non-native)的環境下進行分析時，可能會使抗體失去原本結構而分解，例如：逆相層析(reversed-phase HPLC)；而設計特定位點的類型大多還在試驗階段，但是和前者相比除了不會破壞抗體結構的優點(不使用inter-chain disulfide bonds)外，鍵結位置只有兩個位點非常專一(site-specific)，此類新型ADC被稱為TDC(TIOMAB drug conjugate)為近來研究的重點之一。目前市面上的cysteine-linked型ADC代表為Brentuximab vedotin。

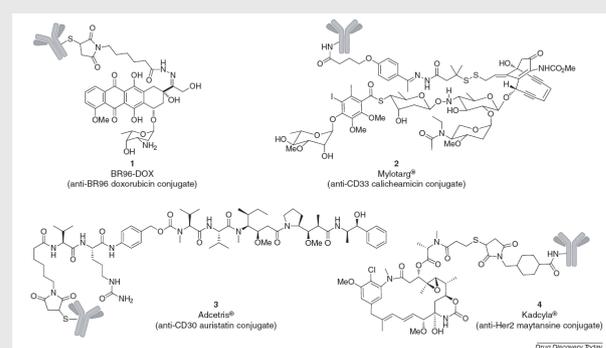


圖4. ADC的結構範例^[1](Perez, H. L. et al. Drug discovery today 19, 869–881 (2014).) °

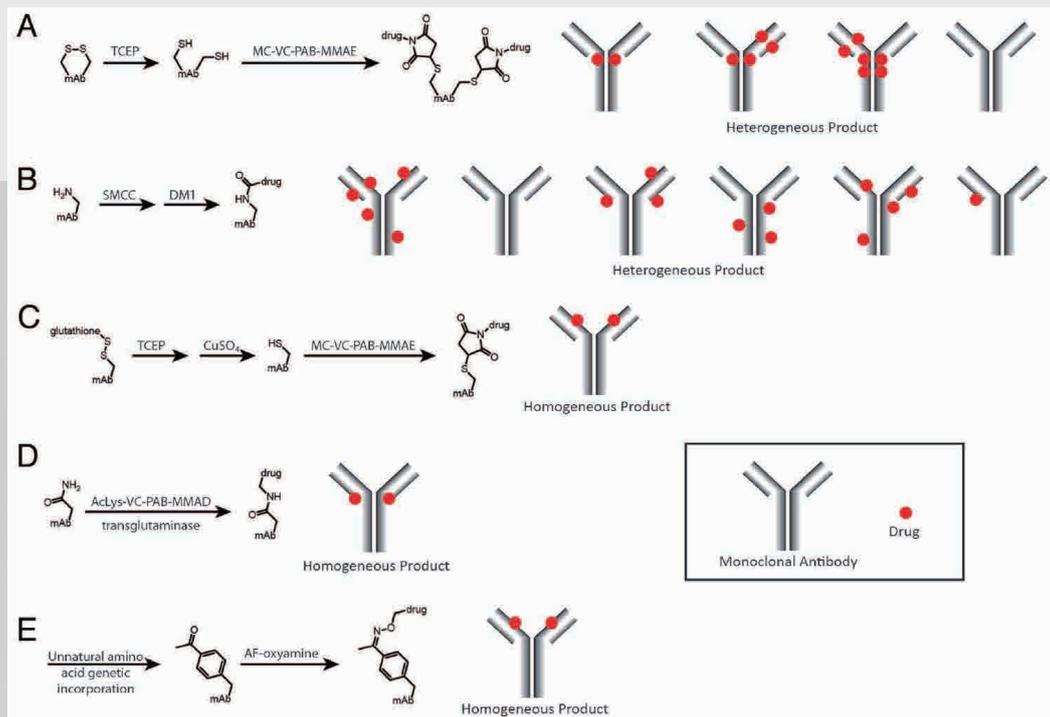


圖5. ADC的幾種常見合成方式，其中A, B為非專一位點接合，C, D, E為專一位點接合 [2](Behrens, C. R. & Liu, B. mAbs 6, 46–53 (2014).)。

3. ADC的品質指標

(1) DAR (Drug to Antibody Ratio)

DAR是判斷一種ADC品質最重要的指標，意即平均一個抗體上結合的細胞毒殺藥物數目。DAR決定了有多少藥物負載量(payload)能夠有效抵達腫瘤細胞，並且與這種藥物的安全性和效率息息相關，因此DAR是一個拿來判斷每個批次的ADC是否合乎標準的指標。DAR的計算公式大致原則為：個別負載量個數(n)乘以個別負載量波峰面積(Area_n)的總和除以波峰面積總和，不過因應不同測定方法計算方式也會改變。

$$DAR = \frac{\sum n \times Area_n}{\sum Area_n}, n = \text{payloads}$$

(2) Payload distribution 藥物負載量分佈

除了DAR之外，藥物負載量分佈(payload distribution)也是ADC中一個相當重要的指標，不同的分佈形態可能會改變此ADC的藥物動力學與毒理學性質。以Lysine作為鍵結點的ADC因為複雜度過高，相當難以層析法分離不

同藥物負載量分佈之ADC，也因此才開始建立使用質譜儀分析不同藥物負載量之ADC的方法。一般來說cysteine-linked的ADC的藥物負載分佈大多是0, 2, 4, 6, 8，因為使用雙硫鍵結的緣故呈現偶數，而lysine-linked型ADC藥物負載分佈則是0~7。

ADC分析方法

ADC的測定方法可大致分為幾種：紫外光/可見光分光光譜儀(UV/Vis)、質譜分析(ESI-MS, MALDI-MS等)、層析分析(CE-SDS、HIC)，依分析方式主要可分成兩大類型：UV和質譜儀；目前最常用的是將質譜與層析合併分析(LC-ESI-MS)，以下介紹各分析方法：

1. 紫外光(UV)

(1) 紫外光/可見光分光光譜儀(UV/Vis, UV/Visible spectrophotometer)

UV/Vis主要原理是利用比爾定律(Beer-Lambert law)具有加總性，利用已知濃度的藥物溶液與抗體溶液計算出藥物與抗體各自

的 ϵ ，接著推算出藥物與抗體在ADC溶液中個別的濃度後，計算兩者之間比例即可得到DAR。

比爾定律： $A = \epsilon cl$

A ：吸收度(Absorbance)

ϵ ：吸光係數

c ：吸光物質的濃度(g/L或mol/L)

l ：吸收介質的厚度(cm)

$$A_{280} = (\epsilon_{drug}^{280} c_{drug} + \epsilon_{drug}^{mAb} c_{mAb}) l$$

$$A_{\lambda(D)} = (\epsilon_{drug}^{\lambda(D)} c_{drug} + \epsilon_{mAb}^{\lambda(D)} c_{mAb}) l$$

$$c_{mAb} = (A_{280} \epsilon_{drug}^{\lambda(D)} - A_{\lambda(D)} \epsilon_{drug}^{280}) / [(\epsilon_{mAb}^{280} \epsilon_{drug}^{\lambda(D)} - \epsilon_{mAb}^{\lambda(D)} \epsilon_{drug}^{280}) l]$$

$$c_{drug} = (A_{280} \epsilon_{mAb}^{\lambda(D)} - A_{\lambda(D)} \epsilon_{mAb}^{280}) / [(\epsilon_{drug}^{280} \epsilon_{mAb}^{\lambda(D)} - \epsilon_{drug}^{\lambda(D)} \epsilon_{mAb}^{280}) l]$$

ϵ_{drug}^{280} ， ϵ_{drug}^{mAb} ， $\epsilon_{drug}^{\lambda(D)}$ ， $\epsilon_{mAb}^{\lambda(D)}$ 皆可藉由測定已知濃度的藥物與抗體以比爾定律來計算得出，接著套入以上四列算式分別解出 c_{drug} 和 c_{mAb} ，即可算出 $DAR = c_{drug} / c_{mAb}$

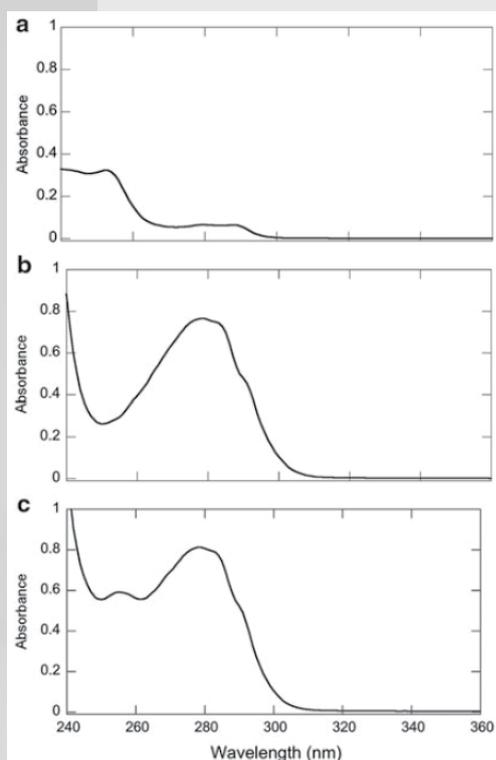


圖6. UV吸收光譜(a)小分子藥物(DM1),(b)單株抗體 (trastuzumab),和(c)抗體藥物複合體trastuzumab emtansine (T-DM1)^[6](Antibody-Drug Conjugates.1045,(Humana Press,2013).)。

UV/Vis優點是泛用性廣，目前市面上的藥物幾乎都可偵測，例如：maytansinoid DM1,

methotrexate, CC-1065 類似物, adriamycin, calicheamicin類似物, vc-MMAE等，缺點是有一些限制條件：(1)藥物本身必須有發色團(chromophore) (2)藥物與抗體在各自最大吸收波長(A_{max})時之光譜需有明顯差異(圖6) (3)藥物與抗體的存在本身不得互相干擾對方的吸收。最大的前提是溶液必須符合比爾定律的基本要求。此外UV/Vis法無法同時得到此ADC之藥物負載分布(payload distribution)，只能計算得出DAR。

(2) 疏水性層析法 (HIC, hydrophobic interaction chromatography)

疏水性層析法特別適合拿來測定半胱氨酸鍵結(cysteine-linked)型的ADC，由於大部分的此類ADC的連接子(linker)與藥物(payload)都會增加ADC的疏水性(hydrophobicity)，於是不同負載量的ADC在HIC管柱內的滯留時間不同；負載量越大的ADC滯留時間越長，能夠在圖譜上看到清楚分離的各波峰，如果想要確認分離的各波峰為何種藥物負載量則必須同時掃描大範圍的UV光譜，之後疊圖確認(圖7)；與此相反，離胺酸鍵結(lysine-linked)型的ADC則因為異質性過高，無法使用此法進行分離。不過由於HIC使用的動相皆屬於高鹽類成分，大部分甚至含有磷酸鹽，因此不適合與質譜儀串連進行分子量鑑定，假如想要進一步測定則必須個別收集每根波峰的產物並去鹽後才能在質譜儀上進行分析。

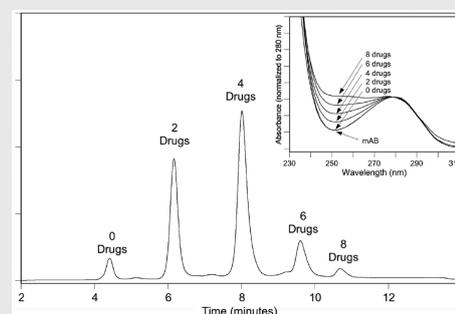


圖7. HIC層析圖譜：利用HIC能夠將帶有vc-MMAE之cysteine-linked型的藥物分離成五個明顯的波峰，分別對應到0, 2, 4, 6, 8個藥物負載量^[3](Wakankar, A., Chen, Y., Gokarn, Y. & Jacobson, F. S. mAbs 3, 161–172 (2011).)。

(3) 逆相層析法(Reversed-phase HPLC)

先前提過cysteine-linked型ADC的雙硫鍵已進行過部分還原，維持抗體結構的作用力不全是共價鍵結，故結構不如原本穩定，而此層析方法常使用低pH值與高比例有機溶劑的易變性環境作為動相，加上對蛋白質有吸附作用的管柱作為層析基質，因此cysteine-linked型ADC若以此法直接進行分析會使得結構分散而產生許多不規則ADC片段分子，增加分析複雜度；但此分析方法可分離經還原處理後帶有不同藥物負載量(payloads)的抗體分子重鏈(heavy chain)與輕鏈(light chain)(圖8)，之後便能利用各波峰面積計算DAR，計算方式調整如下：

$$DAR = 2 \left(\frac{\sum n \times \text{light chain peak area}_n}{\sum \text{light chain peak area}} + \frac{\sum n \times \text{heavy chain peak area}_n}{\sum \text{heavy chain peak area}} \right), n = \text{payloads}$$

如果和質譜儀串聯，則可同步進行分子量的鑑定，得到更進一步的證據確定各波峰代表的ADC片段是否正確。

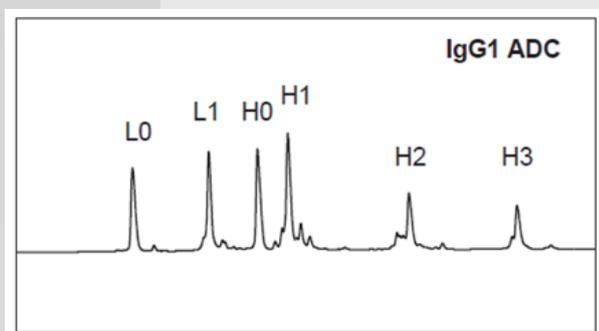


圖8. 還原後的cysteine-linked ADC之逆相層析UV圖譜，其中L代表輕鏈，H代表重鏈，字母後面的數字則是代表此輕鏈/重鏈上的藥物負載量(payloads) [8](Wiggins, B., Liu-Shin, L., Yamaguchi, H. & Ratnaswamy, G. Journal of Pharmaceutical Sciences 104, 1362–1372 (2015).)。

2. 質譜儀(MS)

(1) 逆相層析法(Reversed-phase HPLC)

Lysine-linked型的ADC由於複雜度過高，接合位點不專一，即便還原處理過後也不適合用上述RP-HPLC-UV的方法分析，因此，質譜儀在lysine-linked型的ADC的分析上扮演重要

的角色。將RP-HPLC與質譜儀串連後，質譜數據上顯示帶有不同負載量的ADC會形成極複雜的質荷比(m/z)訊號(圖9右上)，接著將此質譜數據經解析運算(deconvolution)後，即可得到個別不同負載量ADC的質量分佈(圖9)，由於無法在層析圖譜上分別針對不同質量的ADC進行積分運算，因此DAR的計算是根據解析後的質量分佈數據，針對個別不同負載量的ADC訊號強度(intensity)進行加總：

$$DAR = \frac{\sum n \times \text{Intensity}_n}{\sum \text{Intensity}}, n = \text{payloads}$$

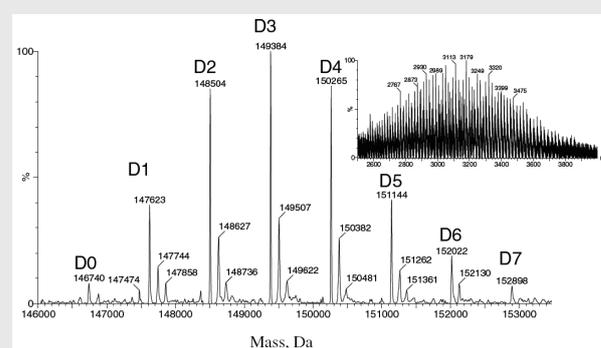


圖9. 與maytansinoid接合之lysine-linked型ADC以RP-HPLC與質譜儀串連後，解析數據得到之各藥物負載量相對強度圖，右上方為質譜儀解析前的原始質譜圖 [4] (Lazar, A. C. et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19, 1806–1814 (2005).)。

(2) 分子篩排除層析法(SEC, Size exclusive chromatography)

分子篩排除層析法原用於測定抗體在儲存過程中是否有聚合或分解現象，適用於監測不同批次間的單株抗體產物是否穩定。若將SEC與質譜儀串聯，可藉由解析帶有不同負載量的ADC質荷比(m/z)訊號計算DAR。SEC和HIC不同，可使用低鹽類或高有機的動相進行層析，因此適合和質譜儀串連；若使用低鹽類作為動相，可以在幾乎不會變性的條件下進行測定，減少層析過程中可能會脫落的輕鏈與重鏈或是藥物，而且SEC對於cysteine-linked型(圖10)和lysine-linked型(圖11)的ADC皆適用。由於在層析圖譜上只會看到一個波峰，因此DAR的計算和上述逆相層析法相同，需根據解析運算後 (deconvolution) 個別負載量的強度(intensity)進行加總：

$$DAR = \frac{\sum n \times \text{Intensity}_n}{\sum \text{Intensity}}, n = \text{payloads}$$

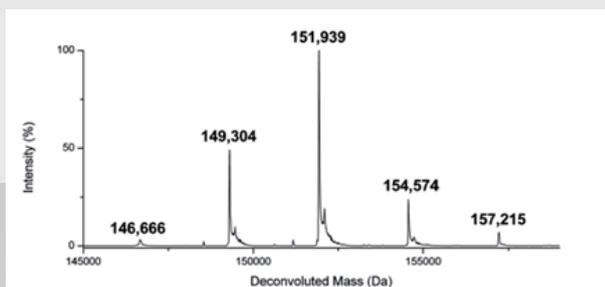


圖 10. 以 SEC-MS 方式分析與 v-c-MMAE 接合的 cysteine-linked 型 ADC，數據解析的結果^[5](Valliere-Douglass, J. F., Hengel, S. M. & Pan, L. Y. Molecular Pharmaceutics 12, 1774–1783 (2015).)。

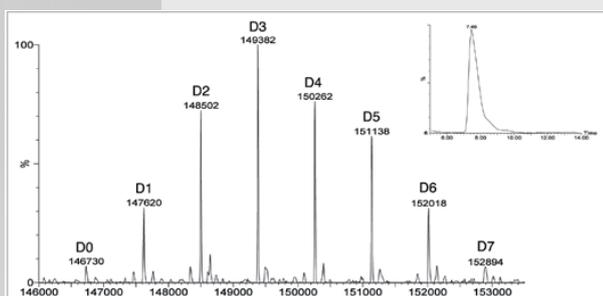


圖 11. 以 SEC-MS 方式分析與 maytansinoid 接合的 lysine-linked 型 ADC 解析數據得到之各藥物負載量相對強度圖，右上方為 SEC 層析圖^[4](Lazar, A. C. et al. Rapid Communications in Mass Spectrometry 19, 1806–1814 (2005).)。

結論

ADC 在結構上的複雜度使其分析不易，然基於藥品安全及效能的考量各國法規單位仍要求且鼓勵對其特性盡可能完整分析。近年來高解析質譜儀問世，搭配漸趨成熟的各種層析方法分析 ADC 的 DAR 與 Payload 已經不是不可能的任務，亦有報導單以直接注射的方式進行質譜分析。這些技術進步與生技藥物發展相輔相成，期許能加速適合的藥品問世幫助患者。

綜合比較

表 1. 兩種類型的 ADC 比較

	K-linked	C-linked
分析方法	UV/Vis RP-LC-MS SEC-MS	HIC-UV RP-LC-UV(須還原) RP-LC-MS(須還原) SEC-MS
分析中穩定性	較高	較低
複雜度	較高	較低
質譜儀仰賴度	較高	較低

*註 K:Lysine C:Cysteine

表 2. 各 ADC 分析方法之比較

	串聯方法	適用 ADC 類型	樣品前處理	ADC 變性程度	計算 DAR	計算 Payload distribution
UV	UV/Vis	K-linked C-linked	少	無	○	×
	HIC	C-linked	少	幾乎無	○	○
	RP	C-linked	較多	嚴重	○	○
MS	RP	K-linked C-linked	較多	嚴重	○	○
	SEC	K-linked C-linked	較多	幾乎無	○	○

*註 K:Lysine C:Cysteine

參考文獻：

1. Perez, H. L. et al. Antibody—drug conjugates: current status and future directions. *Drug discovery today* 19, 869—881 (2014).
2. Behrens, C. R. & Liu, B. Methods for site-specific drug conjugation to antibodies. *mAbs* 6, 46—53 (2014).
3. Wakankar, A., Chen, Y., Gokarn, Y. & Jacobson, F. S. Analytical methods for physicochemical characterization of antibody drug conjugates. *mAbs* 3, 161—172 (2011).
4. Lazar, A. C. et al. Analysis of the composition of immunoconjugates using size-exclusion chromatography coupled to mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19, 1806—1814 (2005).
5. Valliere-Douglass, J. F., Hengel, S. M. & Pan, L. Y. Approaches to interchain cysteine-linked ADC characterization by mass spectrometry. *Molecular Pharmaceutics* 12, 1774—1783 (2015).
6. *Antibody-Drug Conjugates*. 1045, (Humana Press, 2013).
7. Beck, A. & Reichert, J. M. Antibody-drug conjugates: Present and future. *mAbs* 6, 15—17 (2014).
8. Wiggins, B., Liu-Shin, L., Yamaguchi, H. & Ratnaswamy, G. Characterization of cysteine-linked conjugation profiles of immunoglobulin G1 and immunoglobulin G2 antibody—drug conjugates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104, 1362—1372 (2015).
9. <http://adcreview.com/news/inotuzumab-ozogamicin-pfizers-investigational-antibody-drug-conjugate-receives-fda-breakthrough-therapy-designation/>

法規資訊-

2015年12月TFDA公告新版生物相似性單株抗體藥品查驗登記基準

自TFDA於2013年發布生物相似性單株抗體藥品查驗登記基準以來，去年年底又再次發表更新的查驗基準文件，此文件中對於參考藥品之選擇規定得更加詳細與嚴格，品質議題的部分後比起前一版本對於一級結構比較有明確規定需要雙硫鍵分析等補充敘述，在規格的敘述明確的指出需遵照ICH Q6B之比較性研究規範，此外，在臨床試驗部分更動最多，例如：相等性評估的敘述中詳細規範了統計學上的各種數據標準，藥效指標與臨床安全的部分新增了非常多關於擴增(extrapolation)適應症的敘述；此份查驗登記基準大致的方向和之前2015年4月FDA發表的生物相似藥指引相同：一開始與參考藥品廣泛的比對性分析研究(包含物理化學特性)非常重要，盡

可能提供分析比對參考藥品與申請藥品間的相似性，可以減少之後一些臨床實驗的補充，詳情請上TFDA網站仔細參閱。



圖片來源:<http://io9.gizmodo.com/5899339/the-science-behind-counterfeit-cancer-drugs>

明生焦點-

明生生物科技全新官網上線，歡迎瀏覽！

為服務國內外生技公司與藥廠，提供公司資訊與各項服務介紹，即日起明生官網已正式更新上線，歡迎舊雨新知立即上線瀏覽。明生公司通過國內外官方與第三方認證單位之證書，與各項藥品分析服務均已建置更新，未來將持續更新生物藥品分析與藥物臨床試驗分析等項目介紹，並將每期電子報內容與公司型錄進行上線。歡迎大家上線瀏覽與定期追蹤各項最新消息，期待各位藥界先進留下建議與指教，提供明生公司持續進步的動力。

