

Bruker 升級影像質譜、代謝體學、生物相似藥等解決方案

影像軟體 SCiLS 整合 MALDI-2 資料庫與 QuPath 平台

今年 ASMS 2020 會議上，Bruker 推出了世界上第一個商用 MALDI 後電離 (Post-ionization, PI) 離子源 MALDI-2 (圖 1)，可用於 timsTOF fleX 質譜儀上，全新的 MALDI-2 離子源可將小分子和脂質分析的靈敏度提高一到兩個數量級，從而進一步擴大 MALDI 技術的質譜成像應用範圍。在對應的軟體上，影像處理軟體 SCiLS 的最新版本也整合了 MALDI-2 資料庫，並能與 MetaboScape® 2021 跨軟體平台整合，讓代謝體學的研究成為一完整解決方案，與 MetaboScape® 的 SpatialOMx 工作流程集成。

MALDI 2

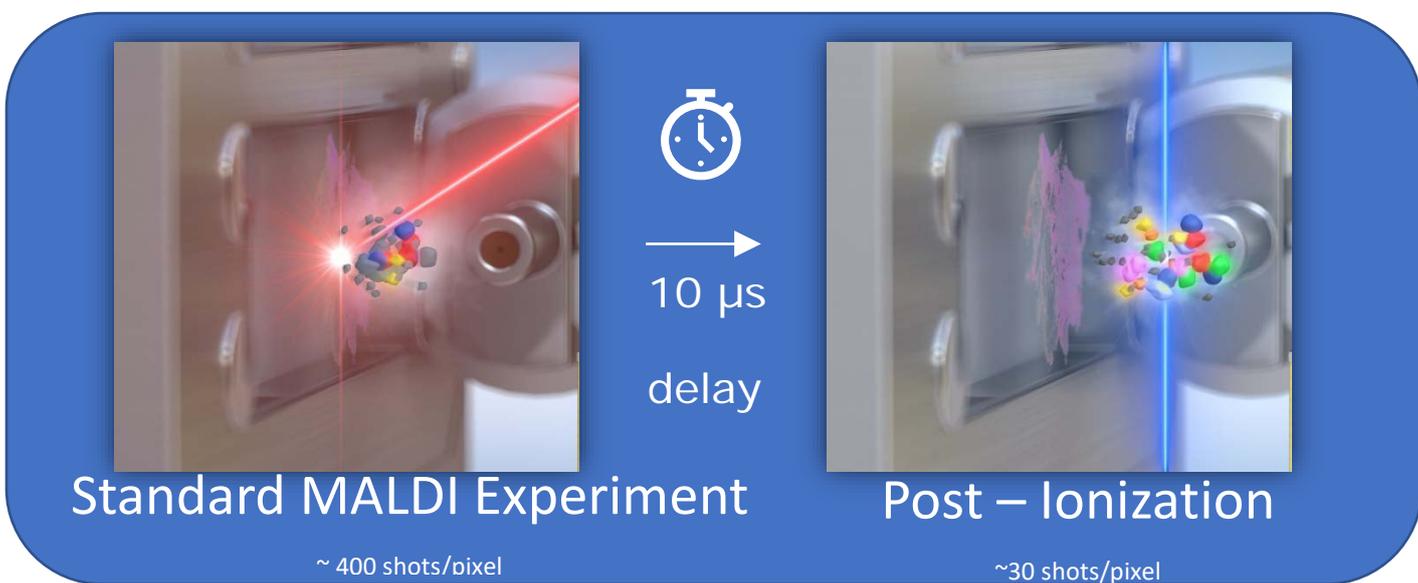


圖 1 Bruker 發表 MALDI-2：在 MALDI 游離源後使用第二道雷射激發中性分子提升游離效率
測試 MALDI-2 對添加 BI-YYY 藥物標準品在組織切片上靈敏度的增強，並在大鼠用 Chloroquine 或 BI-YYY 給藥後，用 MALDI-2 成像分析，以確定靈敏度提高是否轉變為重要的藥物定位資訊。此外，還研究了 Chloroquine 代謝物分佈，大鼠在分別給予 Chloroquine 或 BI-YYY 藥物 2 小時或 24 小時後取組織樣本，在配置了 MALDI-2 的 timsTOF fleX 質譜系統上採集切片的質譜資料，圖原尺寸為 50µm。用 SCiLS 軟體處理得到組織切片分子圖像，然後用 MetaboScape®

2021 軟體中全新的 BioTransformer 模組，預測了 35 個代謝產物¹，對其中 19 個特別代謝物做了鑑定和強度測量，並計算了相對含量。小分子藥物游離效率因使用 MALDI-2 顯著提高了所有受測試化合物的靈敏度，其中新的藥物 BI-YYY 的峰值強度使用 MALDI-2 提高了 300 倍 (圖 2)，結果皆能展示在 SCiLS 軟體中。

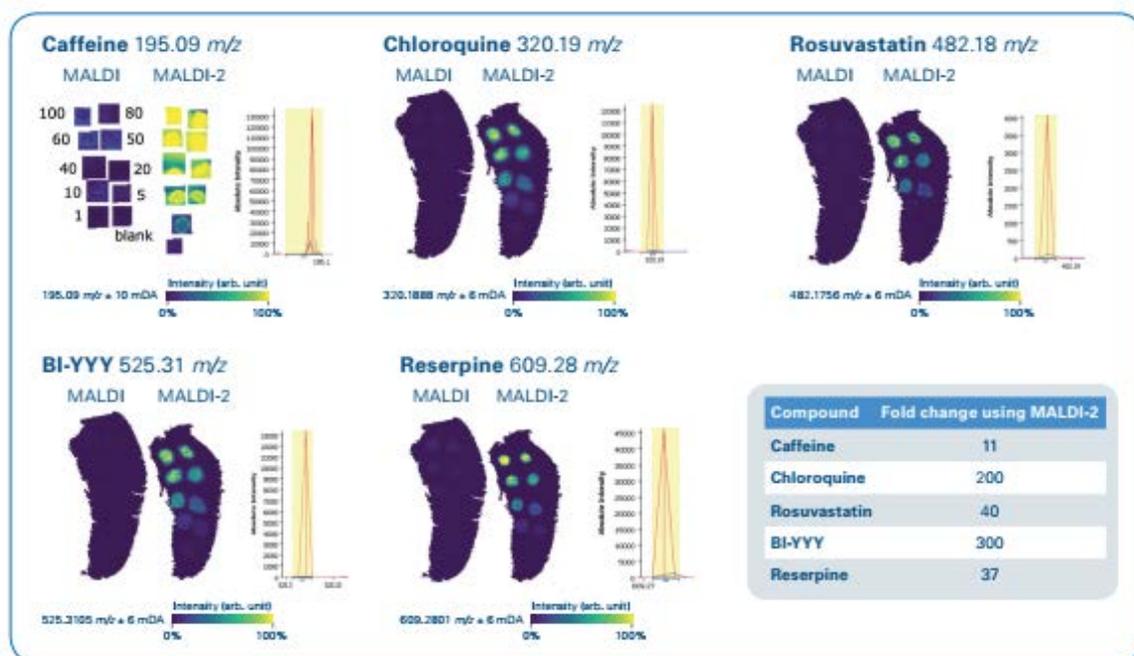
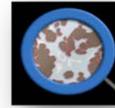


圖 2 使用 MALDI-2 後，小分子化合物的靈敏度得到數量級的提高

此外，影像軟體 SCiLS 新增 QuPath 型態分析能力，QuPath 是一個開源性、可擴展的軟體平台，它提供了廣泛的功能，包括：標註和視覺化工具；IHC 和 H&E 分析的工作流程；常見的新穎演算法，例如：細胞分割、組織微陣列解排列；互動式機器學習，例如：細胞和紋理分類；基於物件的分層資料模型，添加新功能或對不同圖像源支援，易於與其他工具集成，例如 MATLAB 和 ImageJ 可用於整個切片圖像分析。QuPath 一般為病理學家廣泛使用。Bruker 現在發展出在 QuPath 中標註的區域可通過 SCiLS 外掛程式導出，外掛程式將圖像和標註導出到 SCiLS，即可將帶有標註的圖像載入 SCiLS 檔中，因此新版的 SCiLS 提供更佳的標註工具，支援多種組織學的數據格式 (圖 3)，足見 Bruker 整合臨床應用與基礎研究的發展方向。

1 Annotate regions in QuPath & export via SCiLS plugin



2 Load annotated image into SCiLS Lab file

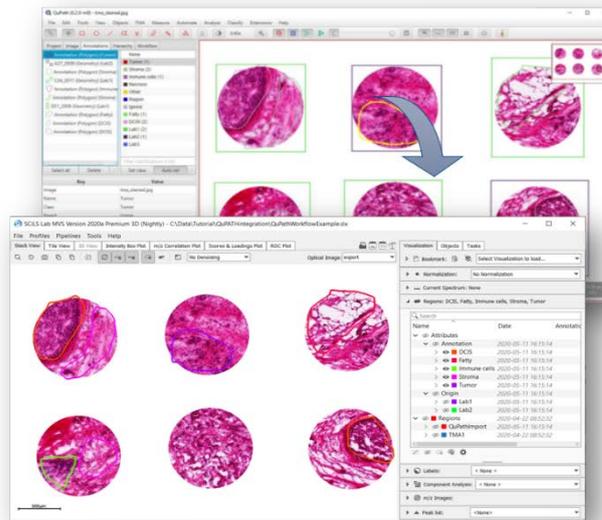


圖 3 QuPath 與 SCiLS 軟體平台整合示意圖

因應 Bruker 推出的 timsTOF fleX，SCiLS 的新功能也包括獨立呈現 TIMS 模式下的數據可視化，亦即通過 CCS 分離圖像，為 MALDI 分子組織圖像提供特徵（代謝物、脂質、聚醣等）的獨特 CCS 標註。以圖 4 為例，此為老鼠組織成像， m/z 同為 754.612 的化合物，其中有兩種不同的 CCS 值分子（橘色顯示 $1/K_0$ 為 1.36 的分佈，藍色顯示 $1/K_0$ 為 1.42 的分佈）。

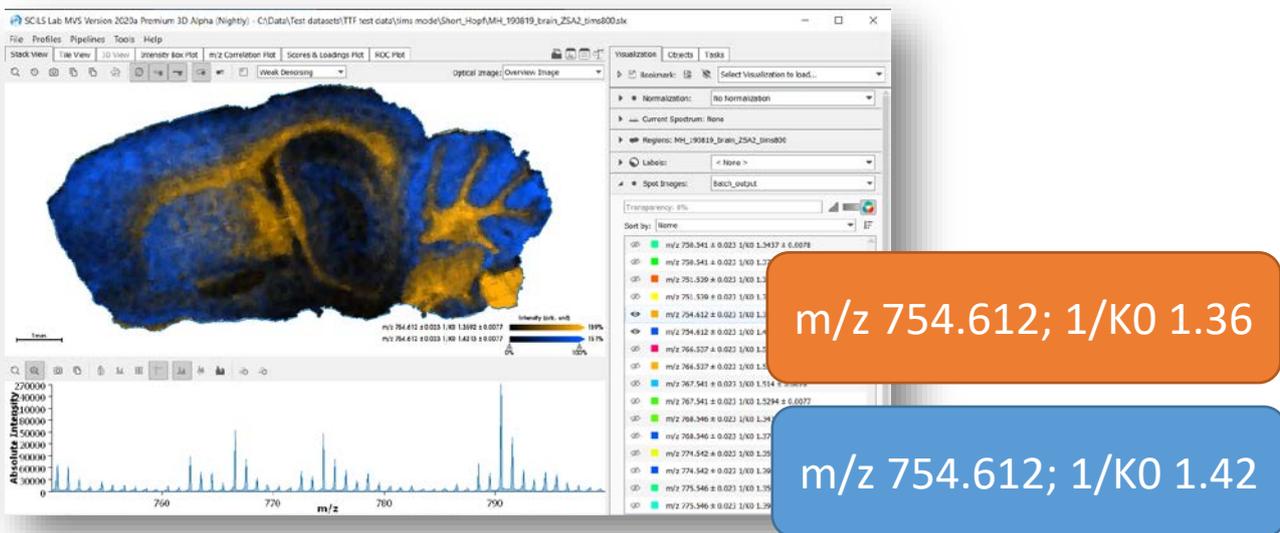


圖 4 相同 m/z 的化合物，在 CCS 離子遷移率分離維度上，呈現的訊號和影像

MetaboScape[®] 在表型與代謝體學上應用新模組 BioTransformer

非標的代謝體學涉及不同的研究領域，如藥物開發、表型組學、環境暴露和非標的篩選等。雖

然研究目標不盡相同，但卻有相同的需求，如：差異標誌物的尋找、未知化合物鑑定和化合物相對定量等。LC-PASEF 工作流程結合 MetaboScape[®] 軟體，以 4D 特徵提取器 (T-ReX 4D) 從 timsTOF 資料中提取 CCS 值，提高非標的物鑑定信心度。整體化解決方案包括批量資料的採集處理、統計學分析、化合物鑑定、數據可視化以及代謝途徑解析。無論是使用 ESI 或 MALDI 影像數據都可進行藥物代謝研究，新版 MetaboScape[®] 2021 增加了新模組 BioTransformer，提供代謝時間序列分析和化合物代謝物預測的功能，

以不同反應終止時間 (0、5、15、30、45、60、90 和 120 min) 的藥物體外代謝肝微粒體模型為範例，在時間序列下依序終止反應收集產物，所有樣品經離心稀釋後使用 Bruker Elute UPLC-timsTOF Pro 進行分析 (+ESI, PASEF 模式)，再將數據導入 MetaboScape[®] 2021 進行資料分析。在 MetaboScape 軟體中可使用 SmartFormula、Analyte List、Spectral Library、CCS predict 和 BioTransformer 等工具對化合物進行鑑定，Chlorpromazine 體外代謝肝微粒體模型的代謝物模擬結果見圖 5。

Predictions	Mass [Da]	Formula	AQ	Reaction
Chlorpromazine	318.09575	C17H19ClN2S		
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ N	233.00660	C12H8ClNS		N-Dealkylation of
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ CNS + O	101.08406	C9H11NO		N-Dealkylation of
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ CNS + O	103.09971	C9H13NO		Reduction of alde
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ CNS + O ₂	117.07898	C9H11NO ₂		Aldehyde oxidati
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ CNS + O ₂	103.06333	C9H9NO ₂		alpha-Oxidation o
Chlorpromazine - C ₂ CNS + O ₂	283.11107	C11H19NO ₂		O-Glucuronidator
Chlorpromazine - C ₂ CNS + O ₂	294.11889	C11H21NO ₂		N-Glucuronidator
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Hydroxylation of a
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		S-Oxidation of dia
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Aromatic hydroxyl
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Aromatic hydroxyl
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Aromatic hydroxyl
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Aromatic hydroxyl
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		N-Oxidation of ali
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Hydroxylation of c
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Hydroxylation of c
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ N + O	289.03281	C15H12ClNOS		N-Dealkylation of
Chlorpromazine - C ₂ H ₅ CNS	45.05785	C2H7N		N-Dealkylation of
Chlorpromazine - CH ₃	304.08010	C16H17ClN2S		N-Dealkylation of
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Aliphatic hydroxyl
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Aliphatic hydroxyl
Chlorpromazine + O	334.09066	C17H19ClN2OS		Hydroxylation of c

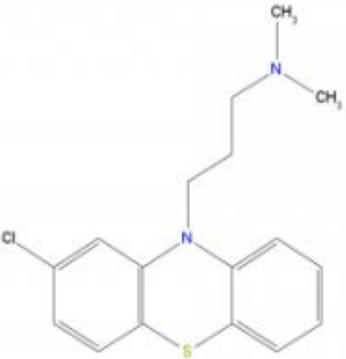


圖 5 使用 MetaboScape 預測的 Chlorpromazine 代謝物列表

此預測結果直接連結到資料庫中進行比對，以 Chlorpromazine+ O (C17H19ClN2SO，m/z 335.0979) 代謝物為例，在資料庫中共比對到兩個可能結果，其層析滯留時間分別為 2.72min 和 2.81min (圖 6，綠色與紫色 EIC 結果)。

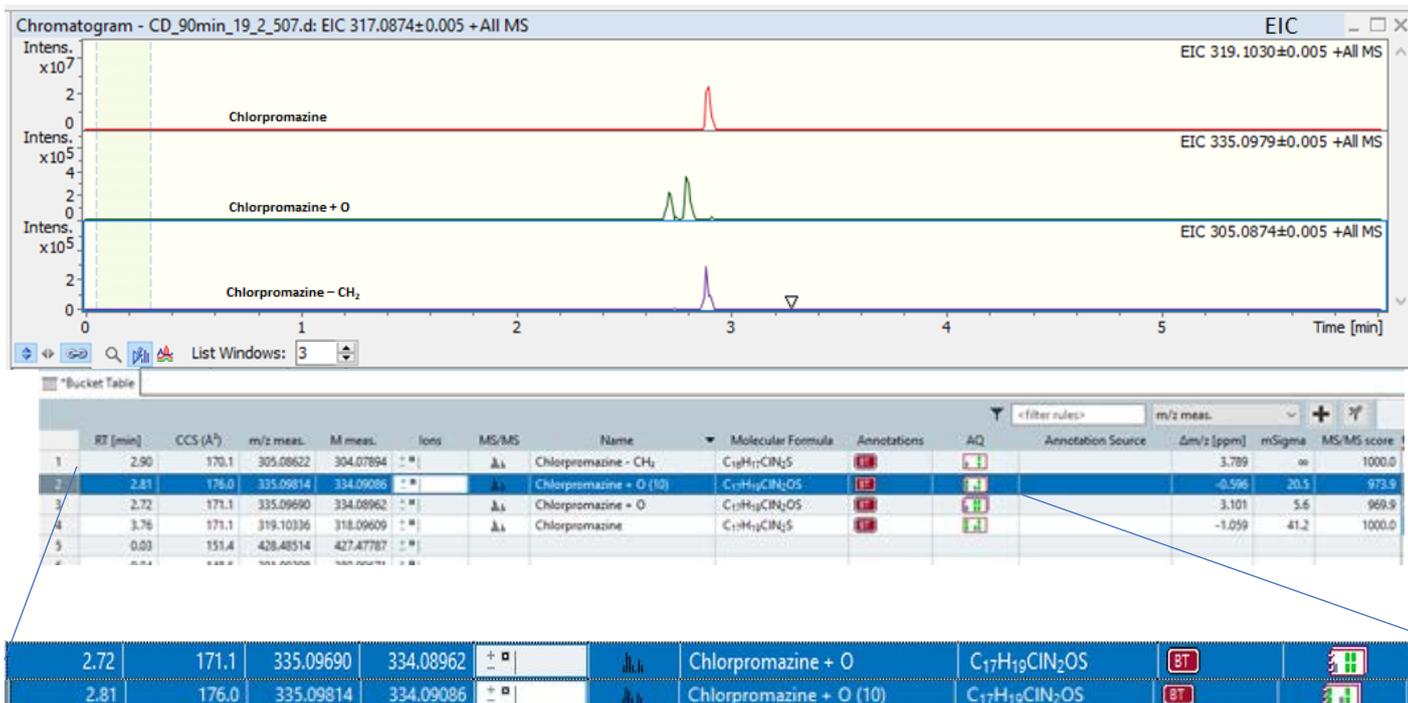


圖 6 MetaboScape 比對 Chlorpromazine+ O 代謝物的結果

基於文獻中 Chlorpromazine+O 代謝物可能存在同分異構體 (hydroxy- · sulfoxide 和 N-oxide 結構) 的情況，對資料提取離子遷移 CCS 圖，。離子遷移分離維度圖顯示 2.72min 和 2.81 min 的 CCS 值分別為 171.2 和 175.9 (圖 7)，顯示分別為兩種不同的代謝物。結合代謝物 MS/MS 資料庫 (MetaboBASE® Personal Library 3.0) 的比對結果，保留時間為 2.72min 的化合物 sulfoxide 結構的與資料庫中 MS/MS 偏差較小，而另一可能代謝物 N-oxide 結構的二級質譜圖匹配度很低。再進一步對比實測和預測的 CCS 值，sulfoxide 結構的偏差為 1.3%，hydroxy-結構的偏差為-0.9%，故 2.72min 化合物為 Chlorpromazine-SO，同理，推測得 2.81min 代謝物為 Chlorpromazine-7OH，MS/MS 與 CCS 的雙重驗證提高非標的物鑑定可信度。

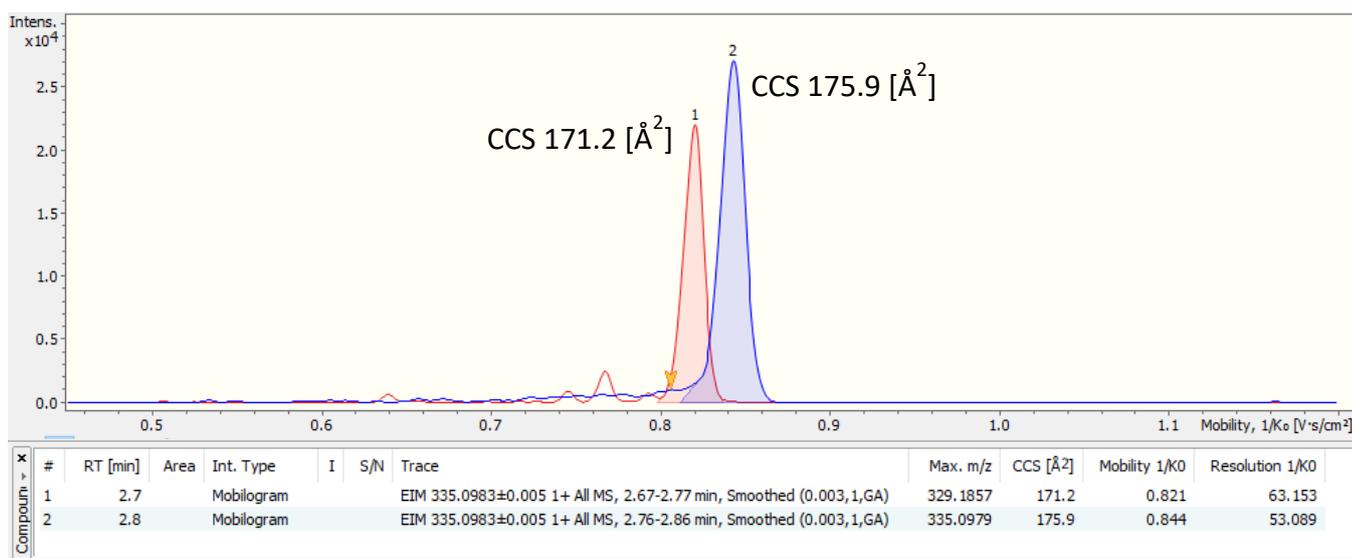


圖 7 離子遷移分離圖顯示 2.72 分鐘和 2.81 分鐘的 CCS 值分別為 171.2 和 175.9 Å²

MetaboScape® 2021 也可以提供代謝物隨時間變化的視覺化結果。圖 8 左為滯留時間為 2.72min 的 Chlorpromazine-SO，右為滯留時間為 2.81min 的 Chlorpromazine-7OH 兩種代謝物強度隨時間變化的情況。可以發現 Chlorpromazine-SO 代謝物的體外肝微粒體代謝狀況持續增長到 120 分鐘後，而 Chlorpromazine-7OH 則是在 90 分鐘後開始衰減。

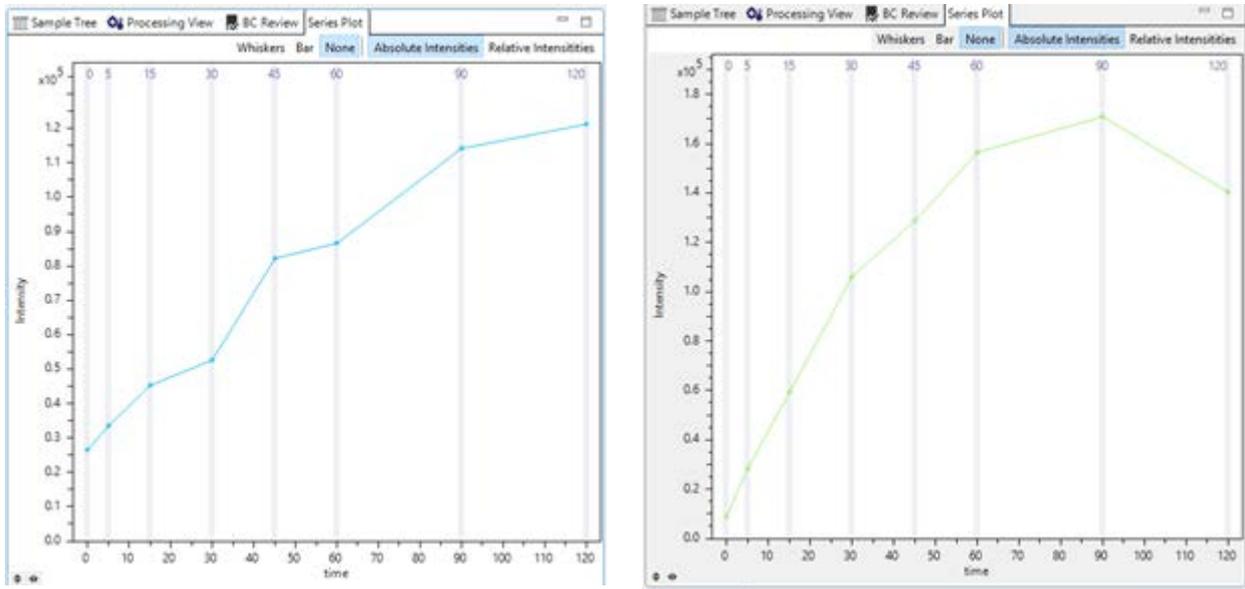


圖 8 (左) RT 2.72min Chlorpromazine-SO (右) RT 2.81min Chlorpromazine-7OH 代謝物隨時間強度變化

BioPharma Compass®: 加速生物製劑與生物相似藥開發與分析

美國的前 10 大暢銷藥物中有 5 種為單株抗體藥物，也有數據指出生物製劑佔美國處方藥的 40%^{2,3}。面對此趨勢，生物製劑與生物相似藥開發過程需要新技術來增加對產品與製程的瞭解、品質控管，才能加速藥品開發過程。這些趨勢與美國食品藥物管理局 (FDA) 所提出的品質源自設計 (QbD) 理念相符，旨在提升藥物品質，減少不良事件。生物製藥產業因此面臨更多挑戰，複雜度高的大分子抗體或是抗體-藥物接合物 (Antibody-drug conjugate)，通常需要精密與多樣分析工具才能鑑定，並且必須是靈敏的監測工具才能在開發與製程中掌握這些大分子沒有發生改變，而影響後續的藥效。

質譜 (MS) 分析技術與日俱進，已成為蛋白質類藥物分析最佳工具，利用 MS 進行多種屬性監測 (Multi-Attribute Methods，以下簡稱 MAM) 的趨勢也隨之提高，原因在於 MS 的靈敏度與選擇性比傳統光學或物理化學偵測更佳，LC-MS 更能在單次分析中監測與定量多種產品關鍵品質屬性 (Critical quality attributes，簡稱 CQA)，此外，數據與文件的產出需有符合法規要求的資訊系統與平台搭配，以確保資料完整性，並可轉換到各製造階段與對應的法規需求，因此軟體的整合更是工作流程的主導角色。

Bruker 的 BioPharma Compass[®] 提供自動化的生物藥物 MAM 分析程序，提供了從自動測量到報告生成的專用 LC 和 MS 工作流程，例如：驗證蛋白質序列並量化產物和過程相關的異質性，例如：修飾圖譜與定量結果。這些 MAM 能使用高分辨率 ESI-QTOF 或 MALDI-TOF 質譜得到數據後，整合至 BioPharma Compass[®] 中，並自動產出符合法規的報告，減少人員與報告的處理時間。

新版的 BioPharma Compass[®] 2021 除了維持先前版本的完整蛋白質分析 (例如：醣型和異質性篩選)、Top-down 的蛋白質序列變異測序與定位、肽段平行序列分析和屬性監控、LC-ESI QTOF 和 MALDI-TOF 的多重目標物篩選 (例如：寡核苷酸和肽合成品質控制)，增加了使用 PASEF 數據和 Mascot 進行宿主細胞蛋白 (Host cell proteins，簡稱 HCP) 識別、蛋白質篩選擴展出平均藥物抗體比 (average drug-antibody ratio，簡稱 DAR)⁴ 計算與蛋白質裁截分析 (Clipping analysis)、Top-down 測序 ESI / MALDI 工作流程也可用於 Clipping analysis。

圖 9 為 BioPharma Compass[®] 針對完整蛋白質分析篩選結果，利用軟體內建的向量式演算法為結果評分，得到直觀的分析結果 (圖中綠色或紅色標註)。

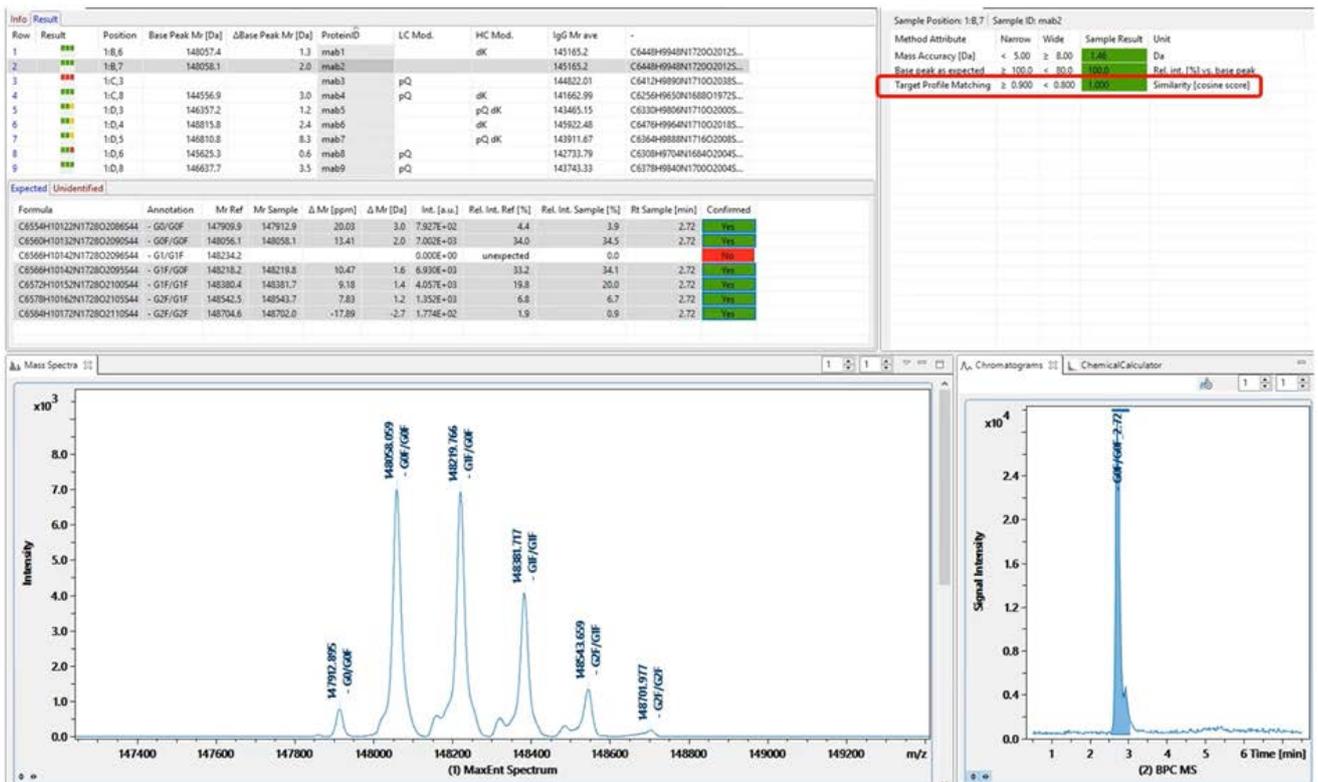


圖 9 完整蛋白質異質性篩選結果展示

圖 10 展示 ADC 藥物 Kadcyla (Trastuzumab+Emtansine) 的 LC-ESI QTOF 分析後載入 BioPharma Compass[®] 計算出的平均 DAR 結果為 3.49，以及 DAR 分佈從 0 到 7，蛋白質篩選自動化工作流程簡化平均 DAR 計算，建立複雜的目標參考資料。

Annotated MaxEnt Spectrum of Kadcylya (Trastuzumab + Emtansine)

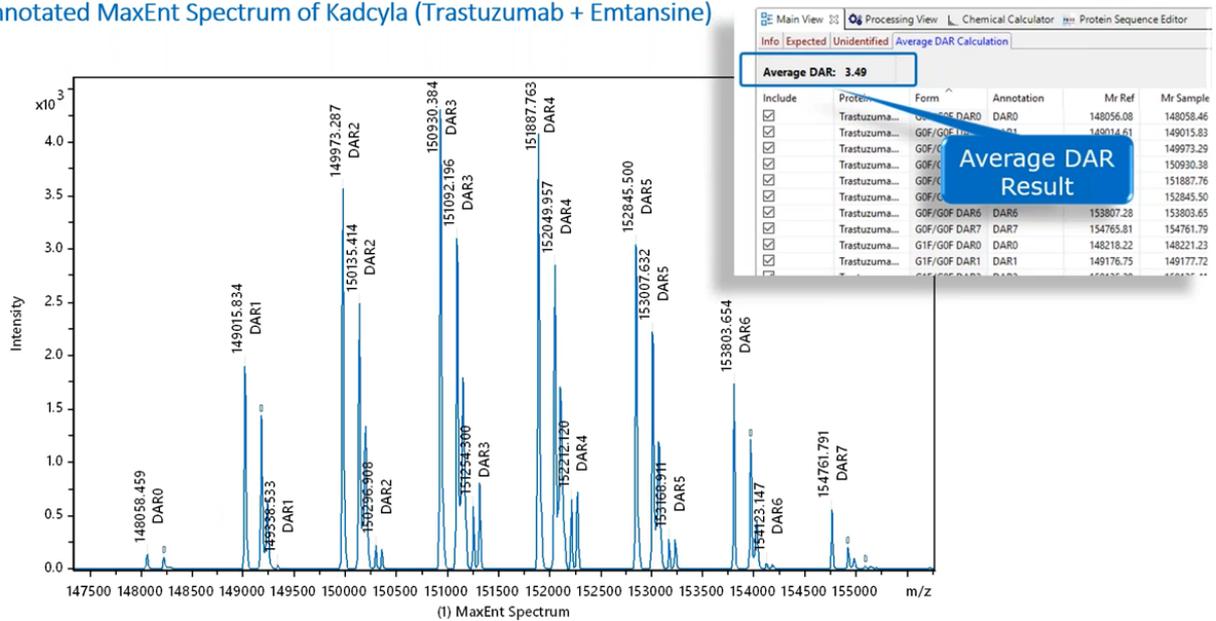


圖 10 Kadcylya 帶標註的 DAR 分布以及平均計算結果

在生產或製造抗體藥的過程中，由於步驟繁瑣，易發生抗體藥物異質性 (Heterogeneity)，或是裁截 (clipping) 現象，伴隨副產物產生，BioPharma Compass[®] 也提供了自動化的 clipping 分析結果。圖 11 為 Panitumumab 的 Clipping 分析結果。FabULOUS (SpeB) 是一種重組產生的半胱氨酸蛋白酶，在還原條件下可在許多物種的抗體 IgG 鉸鏈區中裂解，由於此酵素裂解 IgG1 特異性很高，但是對於 IgG2 的切點特異性卻較低，明顯可見 Panitumumab 的 clipping 副產物。

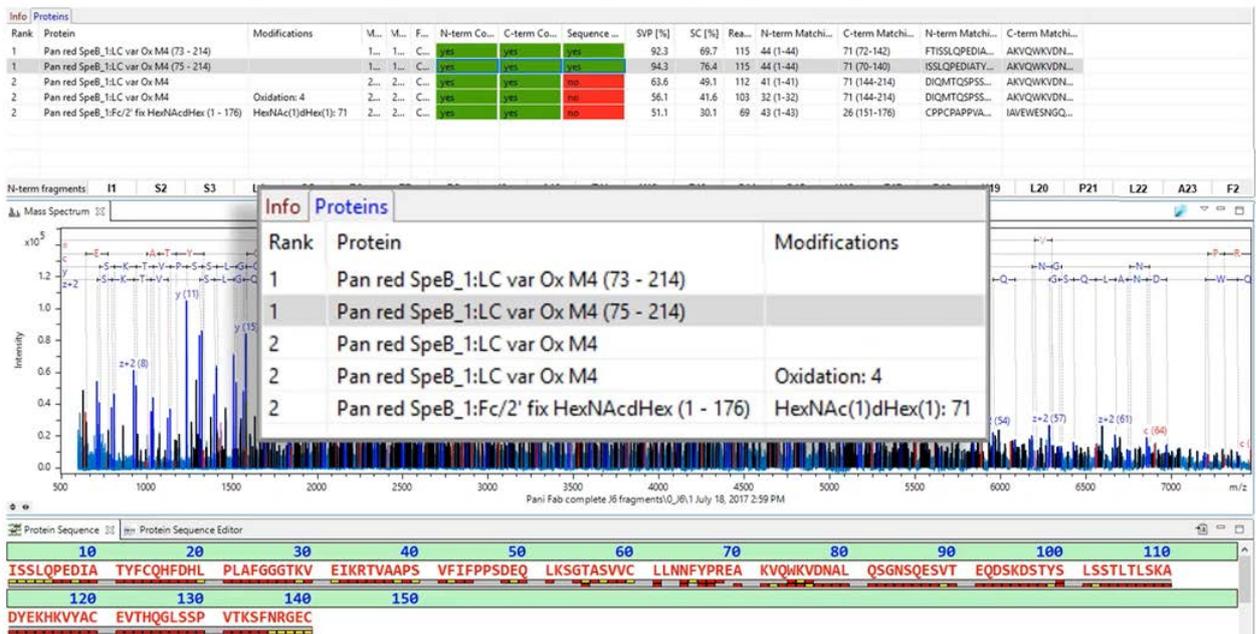


圖 11 Panitumumab 的抗體蛋白質裁截分析，結果自動導出相關副產物

結語

Bruker 除了戮力發展質譜硬體，在軟體、生物資訊大數據、資料庫比對與數據可視化等各方面持續推陳出新，務求提供使用者工作流程自動化的整合性解決方案，並能符合基礎研究或是嚴格的

法規需求。SCiLS、MetaboScape 與 BioPharma Compass 的更新，足見跨越病理、表型與代謝、生物製藥等各領域的應用，各軟體之間更能自由導入或導出數據，為使用者提供資料處理的彈性與自由度。

參考文獻：

1. Joubou-Feunang et al. BioTransformer: a comprehensive computational tool for small molecule metabolism prediction and metabolite identification, *Journal of Cheminformatics*, 2019, 5;11(1):2.
2. Fredette, J. and Diehl, D. Meeting Analytical Demands for Biopharmaceuticals with Mass Spectrometry in Late Development, Manufacturing, and Quality Control. *The Column*. 2016, 12, 10-13.
3. <http://www.pharmtech.com/therapeutic-product-rd-market-trends>, sept 2017
4. Jones J, Pack L, Hunter JH, Valliere-Douglass JF. Native size-exclusion chromatography-mass spectrometry: suitability for antibody–drug conjugate drug-to-antibody ratio quantitation across a range of chemotypes and drug-loading levels, *mAbs*, 2020, 12:1, 1682895.