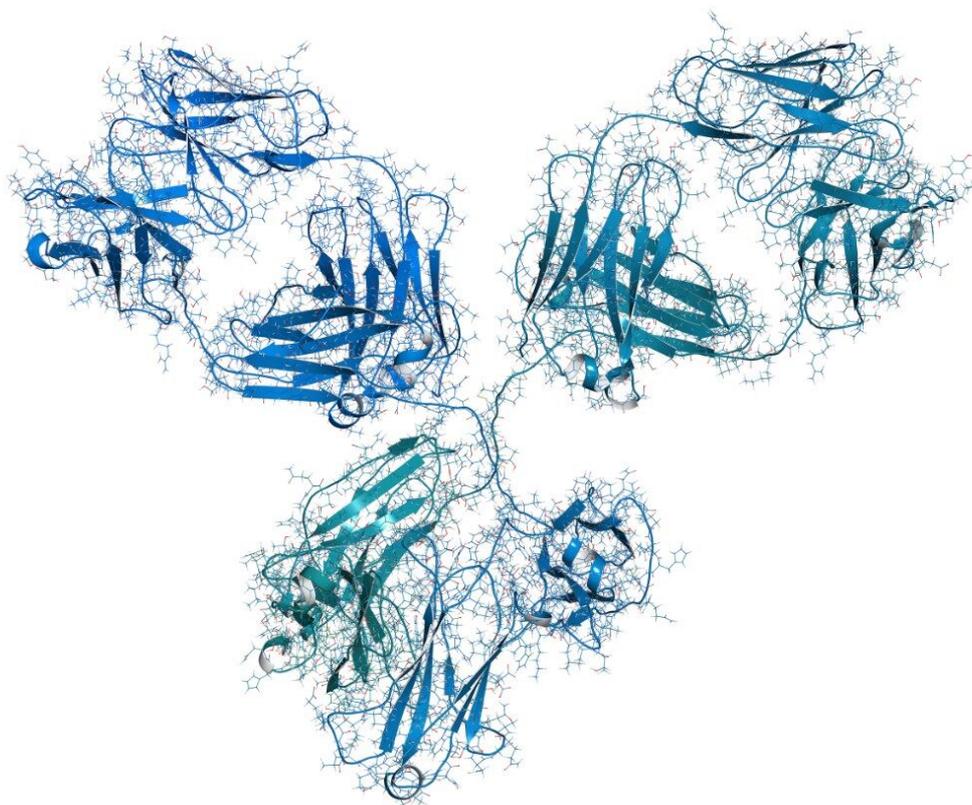


应用纪要

使用BioAccord系统提高生物类似药N-糖分析的工作效率和可信度

Ximo Zhang, Corey Reed, Henry Shion, William R. Alley, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation



摘要

本研究的目的是证明BioAccord系统能够在生物类似药的开发中提高游离寡糖分析的可信度和工作效率。

SmartMS赋能的BioAccord系统是一种简便易用的LC-MS平台解决方案，该系统经过专门设计，针对N-糖鉴定和糖谱分析等特定分析内置分析工作流程，可实现生物治疗药品的全面分析。BioAccord系统将ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与UNIFI科学信息软件控制的ACQUITY RDa检测器联用，可获得高度稳定的色谱分离和准确的质量数信息。ACQUITY RDa检测器是一款紧凑型台式飞行时间质谱检测器，内置自动校准功能和简单的仪器方法设置（图1B和1C），可显著降低MS仪器操作的复杂性。结合完善的工作流程，为游离寡糖分析获得高质量LC-FLR和LC-MS数据并转化为有用结果，在不牺牲产品质量的前提下减少生物类似药开发的成本和时间。

优势

- 符合法规要求的全方位LC-FLR-MS解决方案，可用于全面的N-糖分析
- 从样品制备到数据报告均采用自动化工作流程，提高了生物类似药开发的工作效率
- 耐用、高专属性的平台解决方案，可提高游离寡糖分析的可信度

简介

单克隆抗体(mAb)药物具有极高的疗效和特异性，对于各种疾病的有效治疗已非常成熟。由于多种市售mAb药物的专利即将在未来几年内到期，研究人员投入越来越多的精力以开发更便宜的生物类似药作为mAb原研药的替代品。为减少高成本临床试验的需要和规模并加快药物商业化过程，制造商必须通过全面分析证明生物类似药与其参比品的分析特性高度相似¹。糖基化可影响药物疗效与安全性，是mAb药物的关键质量属性之一，因此需要对生物类似药的相似性评估和质量保证进行充分表征²。由于mAb的糖基化谱图极为复杂，所以通常使用质谱(MS)等正交技术补充常规LC荧光(FLR)方法以提高特异性。然而高分辨率质谱通常需要由经验丰富的科学家进行仪器操作、数据处理和解析，这一过程耗时又耗力。因此，非常需要可扩展的技术和方法，方便部署并提高结果可信度，在生物类似药开发中实现全面的游离寡糖分析。

SmartMS赋能的BioAccord系统是一种简便易用的LC-MS平台解决方案，该系统经过专门设计，针对N-糖鉴定和糖谱分析等特定分析内置分析工作流程，可实现生物治疗药品的全面分析。BioAccord系统将ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与UNIFI科学信息软件控制的ACQUITY RDa检测器联用，可获得高度稳定的色谱分离和准确的质量数信息（图1A）。ACQUITY RDa检测器是一款紧凑型台式飞行时间质谱检测器，内置自动校准功能和简单的仪器方法设置（图1B和1C），可显著降低MS仪器操作的复杂性。结合完善的工作流程，为游离寡糖分析获得高质量LC-FLR和LC-MS数据并转化为有用结果，在不牺牲产品质量的前提下减少生物类似药开发的成本和时间。

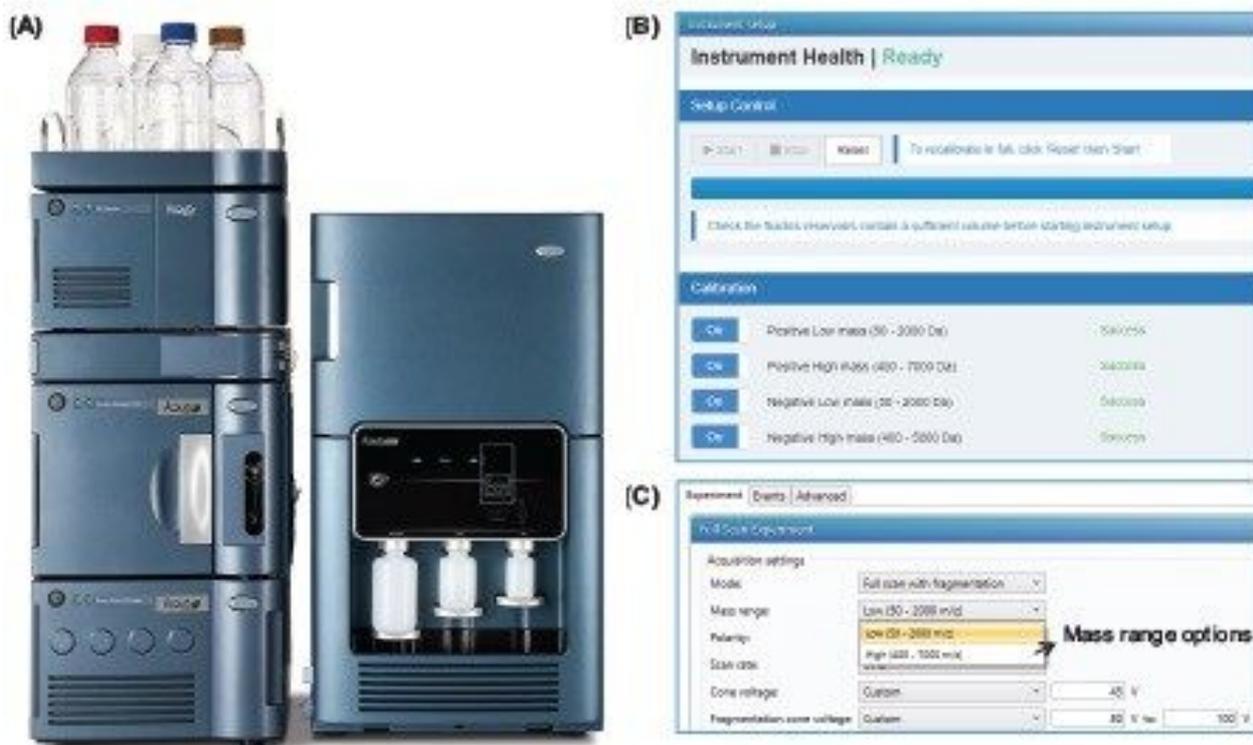


图1. BioAccord系统。(A) 用于简化游离寡糖分析的集成式仪器配置。(B) ACQUITY RDa检测器设置页面，展示了SmartMS™赋能的自动校准功能，可实现高效的仪器操作。(C) 用于MS数据采集的仪器方法页面。针对游离寡糖分析选择了低质量范围选项(50~2000 m/z)。

本研究的目的是证明BioAccord系统能够在生物类似药的开发中提高游离寡糖分析的可信度和工作效率。使用BioAccord系统分析英夫利昔单抗抗原研药和生物类似药中的游离寡糖，作为评估糖基化相似性的示例。

实验

化学品和试剂

英夫利昔单抗抗原研药和生物类似药样品由外部合作者捐赠。LC-MS级水和乙腈购自Honeywell，开封即用，无需其它处理。利用甲酸铵浓缩液 (P/N186007081) 作为添加剂制备流动相。

样品前处理

用水将两个英夫利昔单抗抗原研药(Remicade)样品和一个生物类似药(Inflectra)样品稀释至最终浓度1.5 μ

g/ μ L。在Andrew Alliance自动化样品前处理平台上，使用GlycoWorks RapiFluor-MS N-糖试剂盒（部件号176004082）³从15 μ g稀释的英夫利昔单抗样品中释放出N-糖，并进行标记⁴。每次分析的进样量为2.5 pmol游离寡糖样品。

LC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器:	ACQUITY FLR检测器, $\lambda_{ex}=265$ nm, $\lambda_{em}=425$ nm, ACQUITY RDa 质谱检测器
LC色谱柱:	ACQUITY BEH Amide, 1.7 μ m, 130 Å, 2.1 \times 150 mm游离寡糖分析专用柱（部件号186004742）
柱温:	60 °C
样品瓶:	12 \times 32 mm全回收玻璃样品瓶（部件号600000750cv）
流动相A:	50 mM甲酸铵水溶液, pH = 4.4
流动相B:	乙腈

梯度表:

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B
初始	0.4	25	75
35	0.4	46	54
36.5	0.2	80	0
39.5	0.2	80	0

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B
43.1	0.2	25	75
47.6	0.4	25	75
55	0.4	25	75

ACQUITY RDa检测器设置

质量范围:	50-2000 <i>m/z</i>
模式:	ESI+
采集模式:	连续
采样速率:	2 Hz
锥孔电压:	45 V (全扫描模式) 80~100 V (碎裂模式)
脱溶剂气温度:	300 °C
毛细管电压:	1.5 kV
时时校正标准液:	亮氨酸脑啡肽, 50 fmol/ μ L, 溶于含0.1%甲酸的50/50水/乙腈中
信息学软件:	UNIFI 1.9.4内的游离寡糖应用解决方案

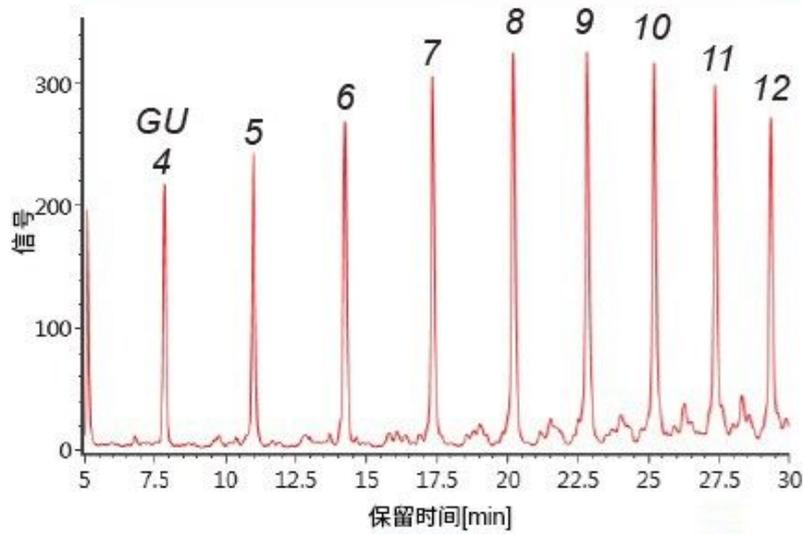
结果与讨论

作为一款集成解决方案, BioAccord系统支持的游离寡糖分析工作流程已非常成熟, 可用于简化生物类似药的

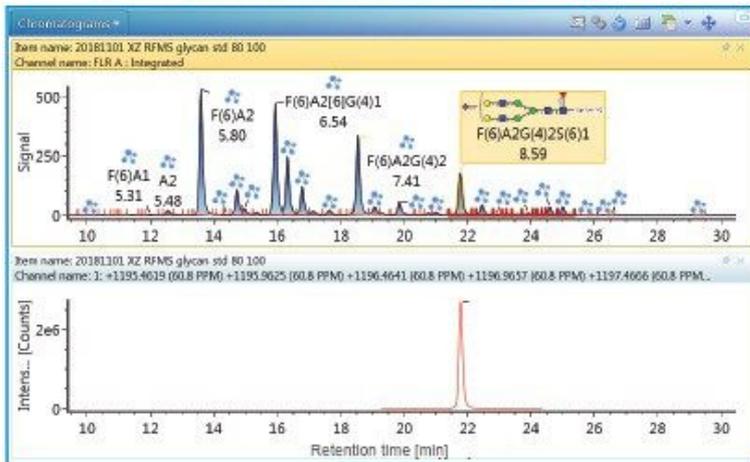
糖基化鉴定和比较过程⁵。为了展示该工作流程，我们使用*RapiFluor*-MS标记了英夫利昔单抗原研药和生物类似药中释放出的N-糖进行HILIC分离，然后使用BioAccord系统进行在线FLR和MS检测。利用RDa质谱检测器的自动校准和自动调谐功能，高效获得了高质量MS数据。利用UNIFI内的“游离寡糖FLR和MS确证”工作流程进行数据解析，该工作流程支持使用分离所得游离寡糖的保留时间和准确质量数信息进行自动化数据处理⁶。如图2所示，根据葡聚糖校准曲线标准品对游离寡糖的保留时间进行校准，并将其转换为葡萄糖单位(GU)值，然后结合准确质量数信息，在UNIFI软件中进行游离寡糖科学数据库搜索来鉴定峰。利用GU值进行谱库搜索，可最大程度减少不同分析中保留时间的潜在变异，从而确保高可信度的峰归属。

HILIC-FLR-MS RT和准确质量数

使用葡聚糖校准曲线标准品进行RT校准



游离寡糖样品数据处理



谱库搜索结果

Component name	Structure	Expected GU	Δ GU	GU Std Dev	Expected m/z	Δ m/z	Mass Confirmed
F(6)A1G(4)1Sq...		8.5800	0.0068	0.0000	734.9525	-75.0063	<input type="checkbox"/>
A2G(4)2S(3)32		8.5700	0.0168	0.0140	1267.9861	33.0218	<input type="checkbox"/>
F(6)A2G(4)2S(6)1		8.5500	0.0368	0.0000	1195.4673	0.0054	<input checked="" type="checkbox"/>
A2B(4)2S(6)1		8.5500	0.0368	0.0000	1223.0761	0.0045	<input checked="" type="checkbox"/>
A2[6]G(4)2S(6)1		8.6800	0.1032	0.0000	694.6104	-115.3484	<input type="checkbox"/>

FLR和MS确证” 工作流程

图3显示了英夫利昔单抗原研药经过处理的FLR图，其中的每个峰均自动分配并标注了游离寡糖名称及相关的结构信息。进行自动数据处理后，在10 ppm的质量数偏差内，两个英夫利昔单抗原研药样品中共鉴定出26种N-糖，英夫利昔单抗生物类似药中共鉴定出27种N-糖，表明ACQUITY RDa检测器具有极高的灵敏度和准确度。对于鉴定出的游离寡糖，可以使用该工作流程自动评估原研药和生物类似药mAb之间的糖谱相似性。

在生物类似药的产品开发过程中，关键糖基结构通常被列为高风险质量属性，需要根据FDA推荐的三个层级进行等效性试验（第1级），以评估分析相似性⁷。为此，定量比较糖谱的简单方法对于促进生物类似药mAb的开发尤为重要。在BioAccord系统工作流程中，可以在定性和定量模式下进行直接比较。图4A展示了两个英夫利昔单抗原研药样品（黑色和红色线）和一个生物类似药样品（蓝色线）的FLR叠加色谱图，表明两个原研药mAb样品之间的糖谱高度相似。同时，在原研药和生物类似药mAb之间观察到多种唾液酸化游离寡糖物质的相对丰度存在差异，如图4A中的放大色谱图（插图）所示。为确认这些差异，可以单击工作流程步骤（图4B）访问“汇总图”，定量比较所选游离寡糖物质的FLR响应或相对丰度。如图4B的右侧所示，%含量的汇总图证实两个原研药mAb样品中FA2G1Sg1（F=岩藻糖，A2=双天线，G=半乳糖，Sg = 神经氨酸）的相对丰度一致，生物类似药mAb中的丰度升高。综上所述，上述结果表明BioAccord系统能够有效地将LC-MS数据转化为对生物相似性评估有用的结果。

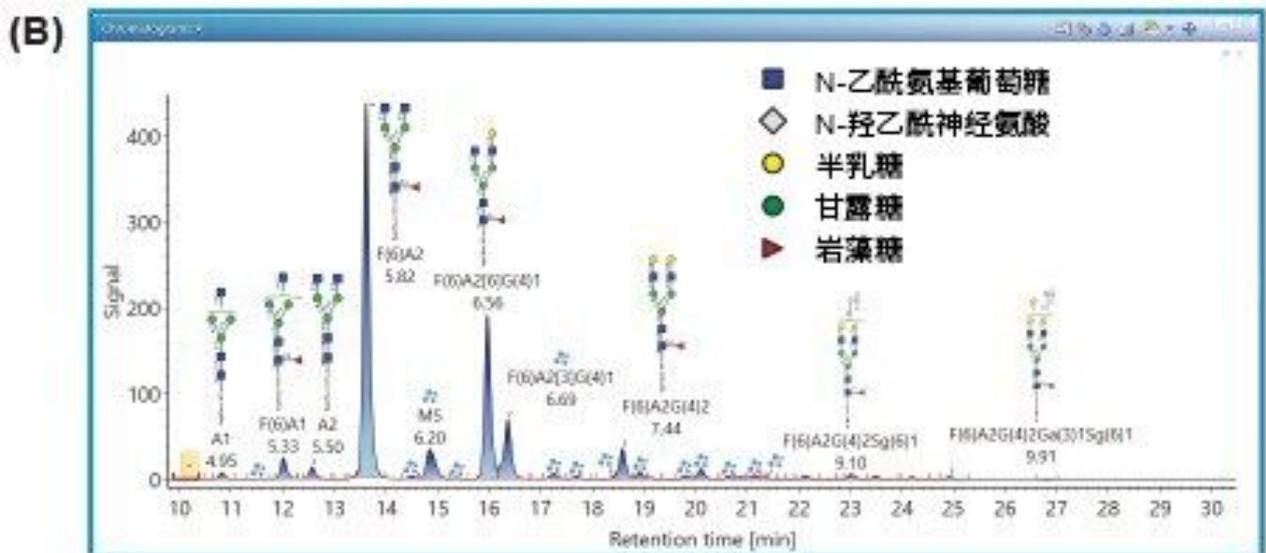
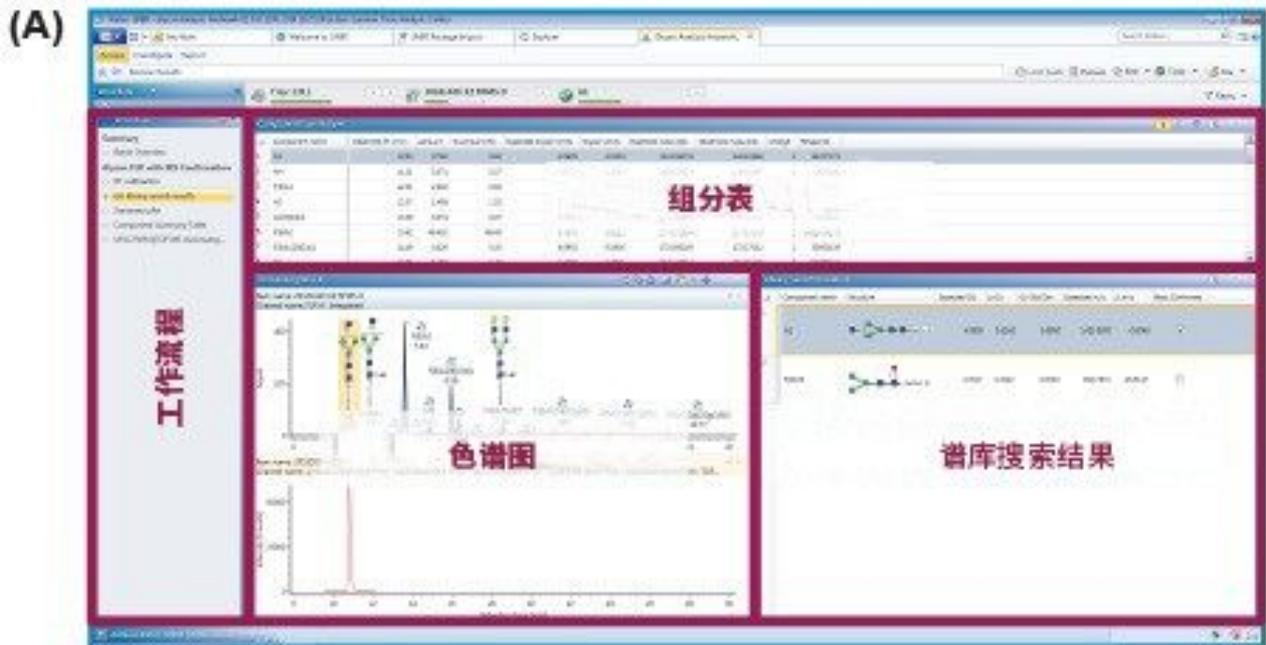


图3. 查看处理后的结果。(A)“查看”选项卡显示了已鉴定峰的可单击工作流程步骤、经处理的色谱图以及谱库搜索结果。(B)“查看”选项卡中经处理的FLR图，显示出标注了游离寡糖名称、GU值及相关结构信息的已鉴定峰。为避免结构显示过于拥挤，只需将鼠标悬停在IBM连接图标上，即可查看详细的游离寡糖结构。用户可以自行选择CFG或Oxford结构命名法进行显示（本应用纪要的图中使用CFG）。

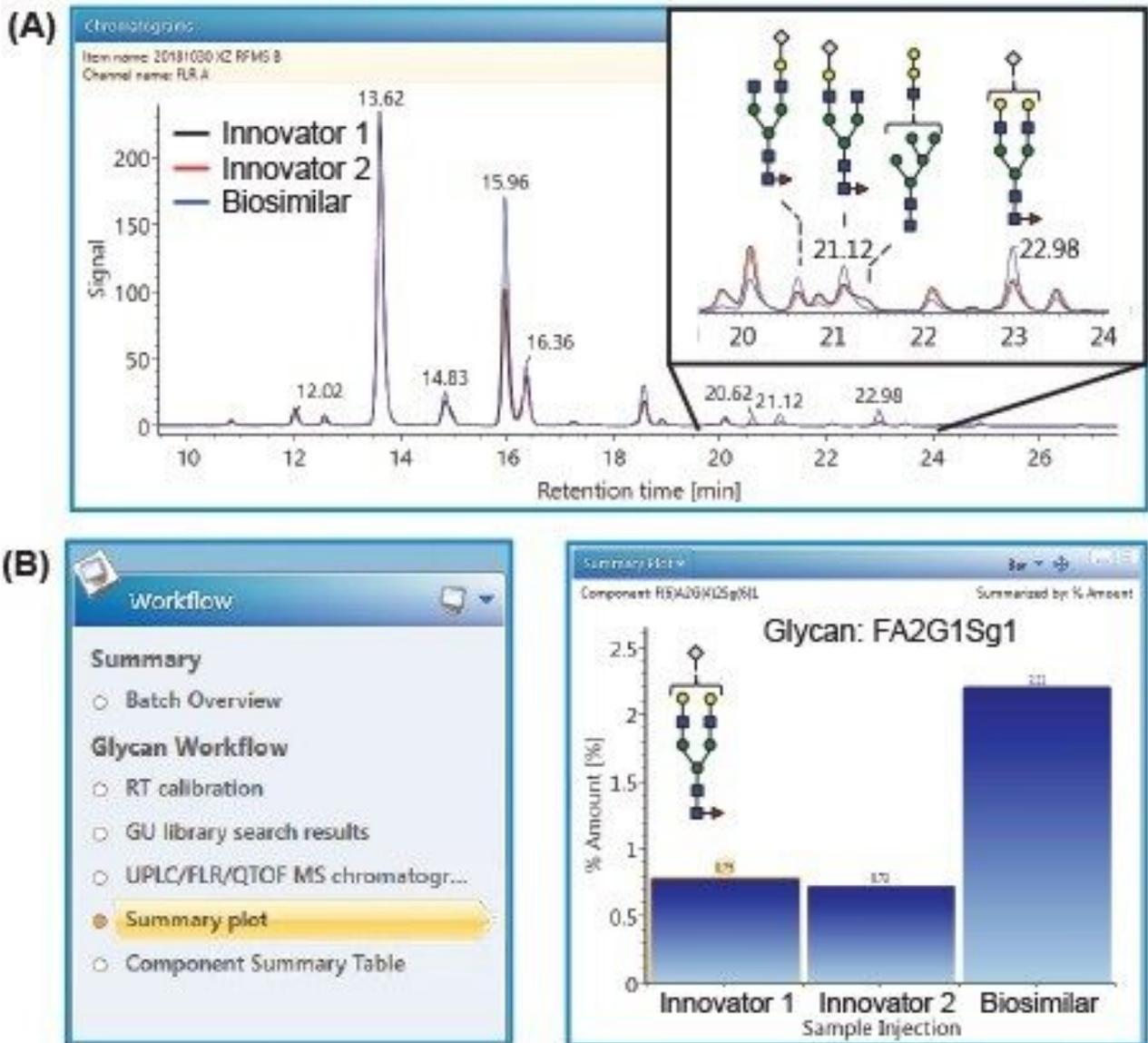


图4. 英夫利昔单抗原研药样品和生物类似药样品的糖谱比较。(A) *FLR*叠加色谱图。放大色谱图显示了低丰度区域的游离寡糖。(B) 可单击工作流程中的“汇总图”部分示例，表明生物类似药物*mAb*中游离寡糖FA2G1Sg1 (Sg代表*N*-羟乙酰神经氨酸) 的丰度升高。

在执行生物类似药*mAb*的游离寡糖分析时，通常需要对具有杂质谱图的聚糖（例如游离寡糖同分异构体）进行正确归属，这可能导致游离寡糖分析结果不一致。高碰撞能量碎裂是常用的质谱方法，有助于区分结构相似的游离寡糖同分异构体。ACQUITY RDa检测器可以在交替扫描模式下采集低碰撞能量和高碰撞能量的MS碎片离子谱图，无需提前选择母离子，从而提供额外的诊断碎片离子以提高结构分配的可信度。（注：缺省情况下，低能量MS通道用于通过游离寡糖GU科学数据库进行分子量确认）。图5显示了MS碎片离子数据帮助鉴定游离寡糖关键分析物对的示例。如图5A所示，游离寡糖FA2G2的洗脱时间非常接近其免疫原性异构体FA2G1Ga1

(G1Ga1 = Gal- α (1,3)-Gal)，因此二者的GU值极为相似。同时采集的MS碎片离子数据有助于对游离寡糖同分异构体进行结构区分。图5B所示为两个峰的高质量MS全扫描和碎片数据，其中在肩峰（确认鉴定为FA2G1Ga1）的MS碎片离子谱图中观察到 α -1,3半乳糖的诊断离子(m/z 528)为最主要的碎片离子³。因此，BioAccord系统能够灵活解析结果，从而提高生物类似药开发中游离寡糖分析的稳定性和可信度。

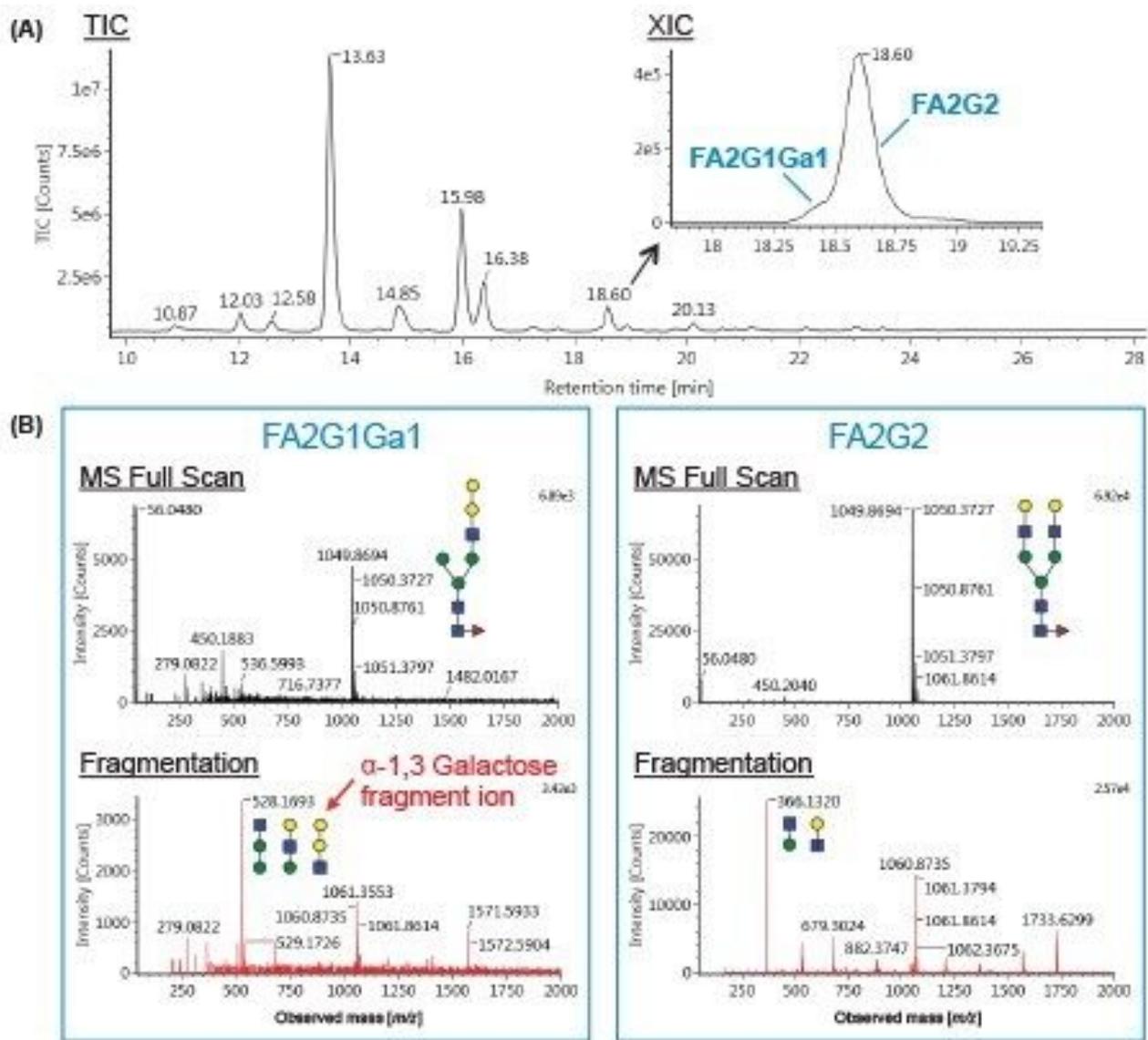


图5. “研究”选项卡下的其它详细信息用于手动解析数据。(A) 英夫利昔单抗抗原研药中游离寡糖的MS (TIC) 色谱图。放大图显示了两种游离寡糖同分异构体FA2G1Ga1和FA2G2的XIC色谱图。(B) FA2G1Ga1和FA2G2的MS全扫描和碎片离子数据，显示了 α -1,3半乳糖的诊断离子(m/z 528)。

为进一步加快游离寡糖分析速度，UNIFI软件可自动生成分析报告，从而简化数据的查看、共享和归档过程。

为展示UNIFI软件的报告功能，可使用自定义模板创建一份报告，对游离寡糖分析结果进行汇总。如图6所示，报告中包含分析信息、色谱图和汇总表，展示了对不同样品中鉴定出的N-糖的相对丰度进行直接比较的结果。报告中还包含不同游离寡糖组的比较结果。为满足不同实验室的要求，可自定义报告，使其包括想要的信息，从而简化分析结果的查看。

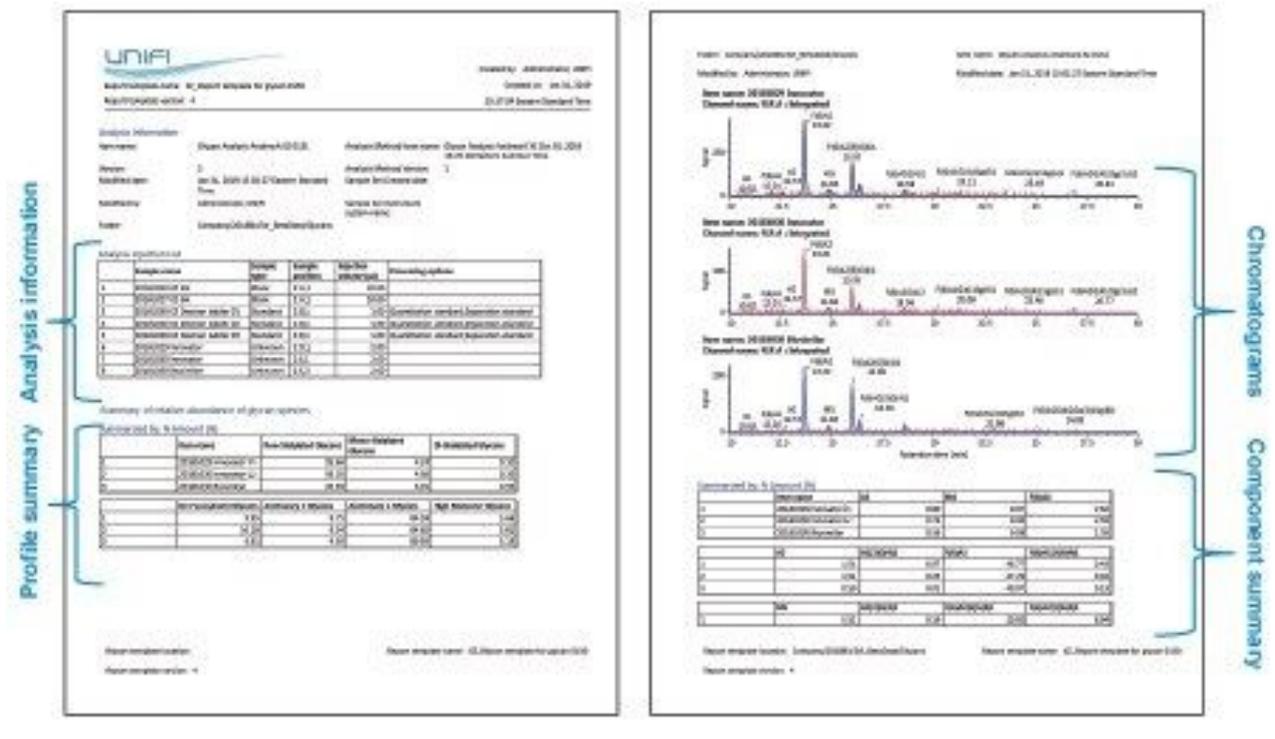


图6. 分析结果报告（所选页面）。自定义报告显示了样品列表、色谱图和汇总表，可轻松查看不同样品之间的差异。

结论

本研究证明了一种使用BioAccord系统对荧光标记的游离寡糖进行全面分析的高效工作流程。使用集成式工作流程为N-糖分析获得了高度稳定的分离和准确的质量数测量信息，并自动转换为分析结果，可快速确定游离寡糖的鉴定结果和丰度差异。综上，BioAccord系统简化了生物相似性评估的工作流程，可用于提高生物类似药物mAb开发中游离寡糖分析的工作效率和可信度。

参考文献

1. Xie, H., et al. Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced liquid chromatography and mass spectrometry technologies. *MAbs*. 2010 Jul-Aug; 2(4): 379–394.
2. Shields, R. L. et al. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγR3 and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002. 277:26733–26740.
3. Lauber, M. A., et al. Rapid preparation of released N glycans for HILIC analysis using a labeling reagent that facilitates sensitive fluorescence and ESI-MS detection. *Anal. Chem.* 2015, 87, 5401–5409.
4. Reed, C. E., et al. Automated preparation of ms-sensitive fluorescently labeled N-glycans with a commercial pipetting robot. *SLAS TECHNOLOGY*. 2018. 23(6): 550–559.
5. Alley, W. R. J. and Yu, Y. Q. Combining RapiFluor-MS and UNIFI Scientific Information System for a total N-linked glycan solution for innovator vs. biosimilar infliximab comparisons. Waters Application Note. 720005753EN. 2016.
6. Yu, Y. Q. A holistic workflow for acquiring, processing, and reporting fluorescent-labeled glycans. Waters Application Note. 720004619EN. 2016.
7. Food and Drug Administration. Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity Guidance for Industry. 2017.

特色产品

BioAccord系统 <<https://www.waters.com/waters/135005818>>

720006545ZH, 2019年4月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.