

在数据完整性环境下进行可重现的完整分子量例行分析

Henry Shion, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了集成式完整分子量分析工作流程的性能，该工作流程使用BioAccord系统自动采集、处理和报告数据，能够部署在受法规管制的实验室环境中。

简介

完整蛋白和亚基水平的生物治疗药物质谱(MS)分析贯穿于产品开发生命周期的整个过程，这些分析为确认序列完整性和产品变异提供了信息。完整分子量分析技术的实用性和易用性更高，能够在原研药和生物类似药分子的监管备案中发挥广泛的支持作用¹。尽管完整分子量分析已经有广泛实践，但通常仍需要由经验丰富的MS用户来管理仪器操作、数据处理和结果解析。为将完整分子量分析能力扩展到以后的开发中，最终成为QC的一部分，需要为非MS专业用户提升易用性，使他们能够获得常规由经验丰富的分析人员才能获得的高质量结果。

一些公司已经意识到，强大的MS功能对于受法规管制的实验室而言具有诸多好处²⁻³。更熟悉光学检测方法的分析人员在采用MS时会面临诸多挑战（主观或客观），原因有MS技术固有的复杂性以及合规信息学平台相对更新的易

用性，这些平台能够将原始质谱数据转换为产品质量属性结果。

由于生物治疗界在后期开发和质控方面对于耐用系统的需求与日俱增，BioAccord系统（图1）应运而生，该系统的操作模式经过简化和优化，旨在为蛋白质、肽和糖基提供自动、准确和可重现的分子量测量。BioAccord系统是一个紧凑型高性能LC-MS平台，集成了ACQUITY RDa质谱检测器与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统，由UNIFI科学信息系统控制。这款基于UNIFI控制的系统具备集成特性，使用基于方法、工作流驱动的流程简化了数据采集、处理和报告操作。内置校准参考标准用于仪器自动校准，结合导引式仪器和方法设置，实现工作流程自动化、增加用户易用性和性能标准化的目标。

BioAccord系统



图1. BioAccord系统由ACQUITY UPLC I-Class PLUS组成，该系统配备与ACQUITY RDa质谱检测器串联的光学检测器(TUV/FLR)。

本应用纪要介绍了BioAccord系统在完整单克隆抗体和IdeS生成亚基的完整分子量分析中的性能特征。研究数据表明，BioAccord系统生成的高质量、可重现的完整分子量分析数据减少了用户的数据处理和管理负担，使更多实验室能够生成信息丰富的结果，更有效地做出更好的分析决策。

实验

样品前处理

本研究使用了人源mAb质量数检查标准品（沃特世部件号=186009125 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html>>）和mAb亚基标准品（沃特世部件号=186008927 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>>）。完整分子量分析：向含有80 µg完整mAb的样品瓶中加入400 µL水，制成0.2 µg/µL溶液，然后进样(2 µL)。亚基分析：向含有25 µg mAb亚基的样品瓶中加入250 µL水，制成0.1 µg/µL溶液，然后进样(2 µL)。

BioAccord系统：

ACQUITY UPLC I-Class PLUS

ACQUITY RDa质谱检测器

TUV光学检测器

UNIFI科学信息系统1.9.4版

完整分子量分析 - LC-MS方法设置

色谱柱：	ACQUITY UPLC-BEH300 C4, 2.1 x 50 mm（沃特世部件号=186004495）
柱温：	80 °C

流动相A:	0.1%甲酸的水溶液（或0.1% TFA，数据见图6）
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液（或0.1% TFA，数据见图6）
光学检测:	UV 280 nm

完整mAb分析的LC梯度表

时间(min)	流速(mL/min)	组分A (%)	组分B (%)	曲线
0.00	0.400	95.0	5.0	初始
1.00	0.400	95.0	5.0	6
3.50	0.400	15.0	85.0	6
3.70	0.400	15.0	85.0	6
4.00	0.400	5.0	95.0	6
4.50	0.400	15.0	85.0	6
5.00	0.400	95.0	5.0	6
5.50	0.400	95.0	5.0	6
7.00	0.400	95.0	5.0	6

总运行时间：7.0 min。

完整分子量分析的MS条件

采集设置

模式:	全扫描
质量范围:	高(400-7000 m/z)
极性:	正
扫描速率:	2 Hz
锥孔电压:	自定义(70V) (或150V, 使用含有0.1% TFA的流动相时)
毛细管电压:	自定义(1.50 V)
脱溶剂气温度:	自定义(550 °C)
智能数据捕获(IDC):	关

亚基分子量分析的LC-MS方法设置

色谱柱:	BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm (沃特世部件号=186008944)
柱温:	80 °C
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
光学检测:	UV 280 nm

完整mAb分析的LC梯度表

时间(min)	流速(mL/min)	组分A (%)	组分B (%)	曲线
0.00	0.300	80.0	20.0	6
10.00	0.300	60.0	40.0	6
10.30	0.300	20.0	80.0	6
11.30	0.300	20.0	80.0	6
11.60	0.300	80.0	20.0	6
15.00	0.300	80.0	20.0	6

总运行时间：15.0 min。

亚基分析的MS条件

采集设置

模式：	全扫描
质量范围：	高(400-7000 m/z)
极性：	正
扫描速率：	2 Hz
锥孔电压：	自定义(30 V)

毛细管电压:	自定义(1.00 V)
脱溶剂气温度:	自定义(450 °C)
智能数据捕获(IDC):	关

结果与讨论

BioAccord系统中完整分子量分析工作流程的设置

在UNIFI软件平台的控制下，BioAccord系统通过自动化和标准化通用分析工作流程（图2），简化了从采集方法创建、数据处理到最终报告的完整分子量分析过程。特别是为降低ACQUITY RDa仪器操作的复杂性，将具体操作简化成四种标准化模式。

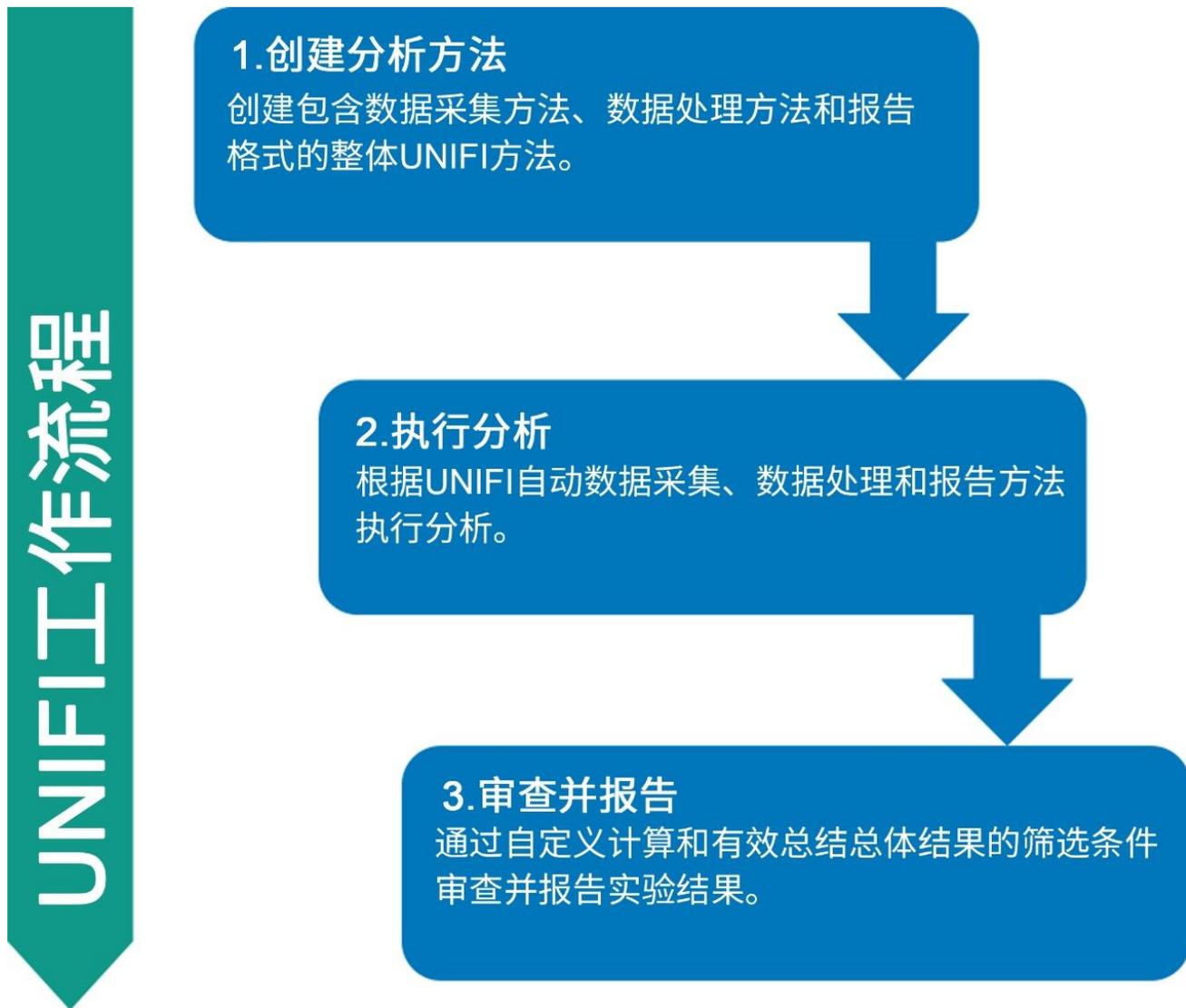


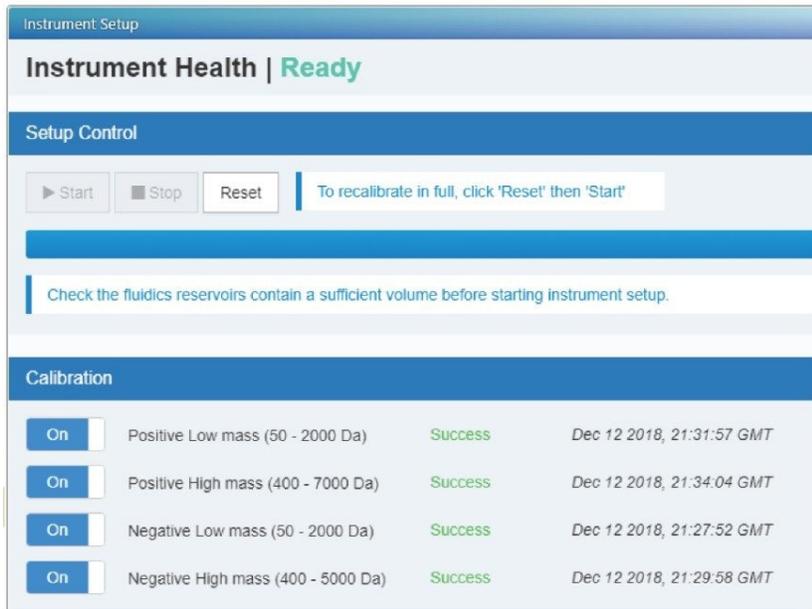
图2.完整分子量分析工作流程的自动化和标准化

- (1).正离子模式低分子量分析（数据采集最高 $m/z = 2000$ ，适用于肽图分析）；
- (2).正离子模式高分子量分析（最高 $m/z = 7000$ ，适用于完整分子量和亚基分析）；
- (3).负离子模式低分子量分析（最高 $m/z = 2000$ ）；
- (4).负离子模式高分子量分析（最高 $m/z = 5000$ ）。

标准化操作模式、简单直观的用户界面、自动优化高级调谐参数以及预编程校正检查有助于将系统集成到标准操

作程序中，确保不同操作员之间以及不同实验室之间的一致性。图3所示为ACQUITY RDa仪器控制窗口的屏幕截图，其中显示了调谐参数的标准设置。

3A.



3B.

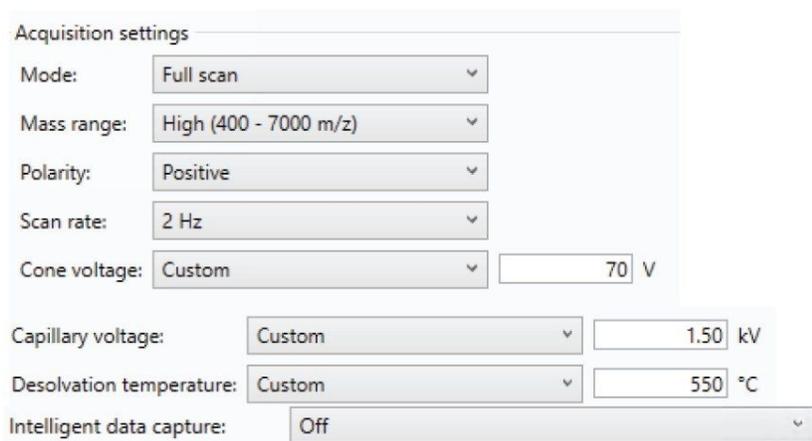


图3.(A) ACQUITY RDa MS离子源控制参数和完整分子量分析的方法设置；(B).完整分子量分析的ACQUITY RDa MS数据采集参数（使用含有0.1%甲酸的流动相）。

使用BioAccord系统进行完整mAb分析

使用2.1 x 50 mm ACQUITY BEH色谱柱分析400 ng沃特世人源mAb质量数检查标准品(P/N=186009125 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html>>)的完整MS谱图见图3。m/z 400–7000范围的质谱图能观察到大分子蛋白质的典型电荷分布。放大图（图4B）显示了四个高丰度电荷态(51⁺ ~ 54⁺)的谱图，m/z范围为2730~2950，很好地显示了完整抗体的五个高丰度糖型以及所有电荷态中糖型相对丰度的一致性。

对完整MS谱图进行去卷积处理后，获得了这五种高丰度糖型和一系列低丰度糖型的完整分子量（图4C）。峰归属基于蛋白质序列的模拟计算，包括鼠mAb共有的双天线糖基结构。去卷积谱图（图4C）显示了主要糖型的相对丰度，其模式与原始谱图非常相似。

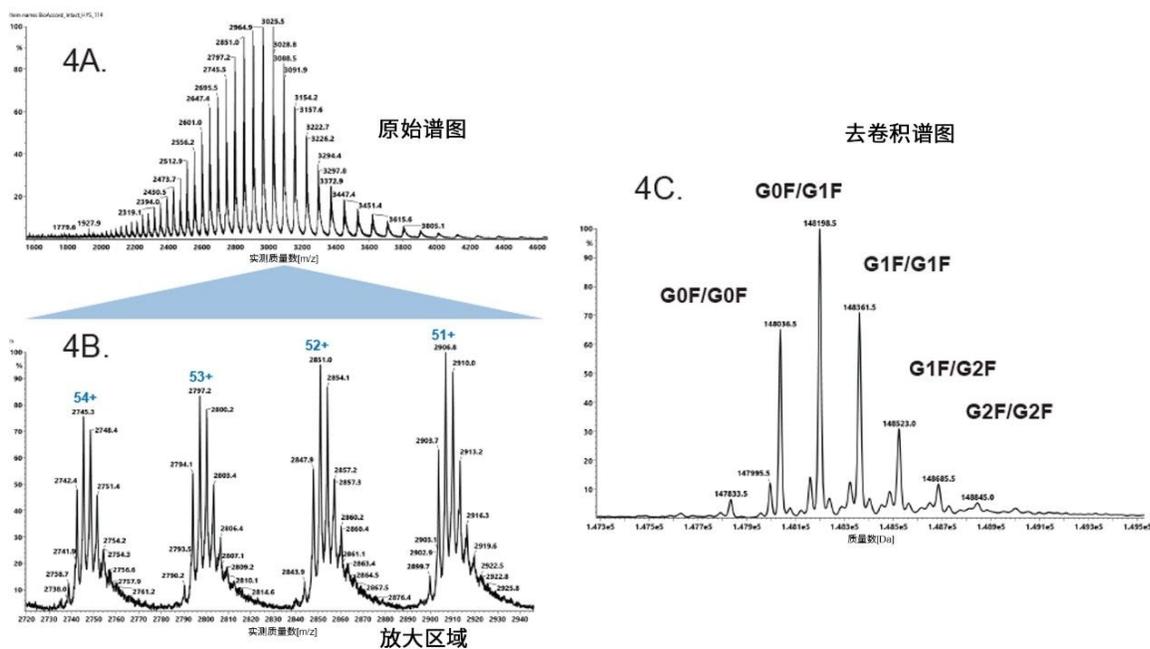
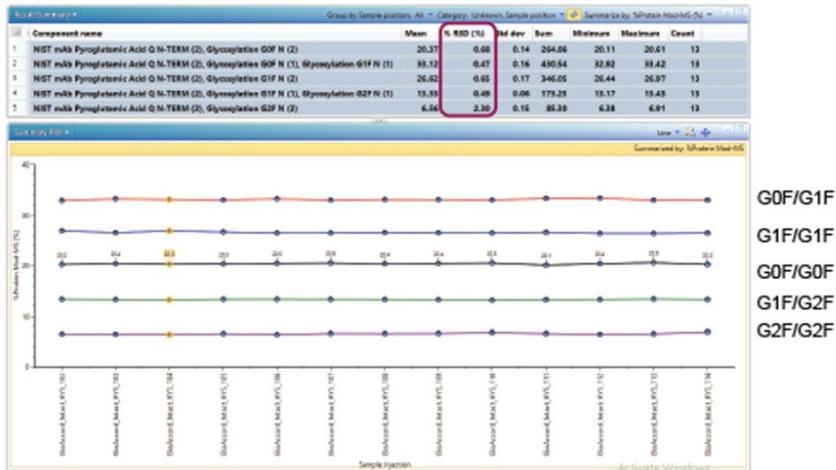


图4.使用含有0.1%甲酸的流动相获得的完整蛋白质谱图

本研究采集、处理并报告了13次沃特世人源mAb质量数检查标准品进样的自动LC-MS分析结果（图5）。这些数据代表一个简单的方法开发集，可用于评估糖型变异体产品的范围和分析重现性。趋势图（图5A）显示了软件在13次进样中识别的5种主要糖型的平均相对丰度。低于2.5%的严格% RSD值表明MaxEnt1处理的数据质量与经验丰富的LC-MS平台用户生成的数据质量相当。

5A.



G0F/G1F
G1F/G1F
G0F/G0F
G1F/G2F
G2F/G2F

5B.

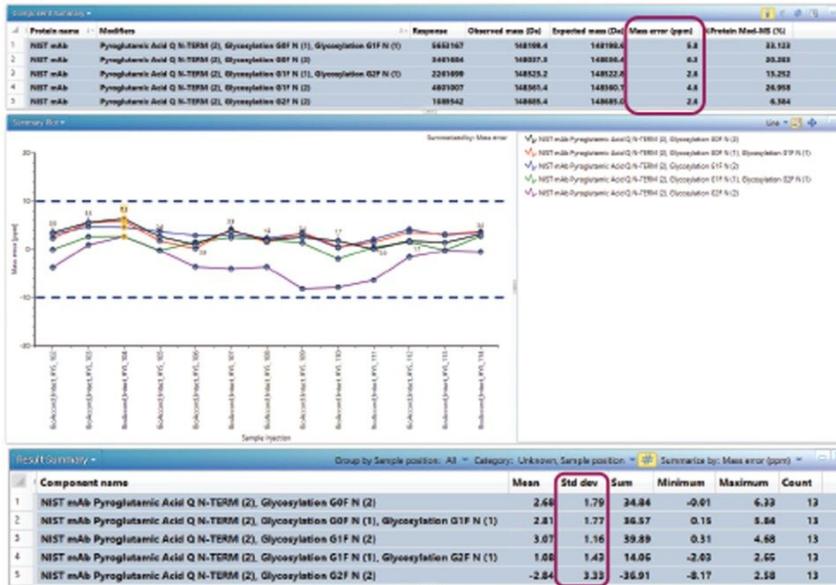


图5A.谱图质量和数据一致性是完整分子量分析成功的关键因素。此处显示了NIST mAb参比标准品的主要糖型相对定量结果。在13次进样中，我们能够获得一致的糖型相对百分比。RSD%低于2.5%时以红色突出显示。5B.自动计算的NIST mAb完整分子量分析实验结果显示在UNIFI“查看”窗格中。单个进样和整个数据集都获得了良好的质量精度。

沃特世人源mAb质量数检查标准品的完整分子量分析（图5B）包括通过MS响应的前5个主要糖型的成分表、观察和预期（理论）分子量、计算的ppm质量数误差以及各糖型每次进样的相对丰度。下面的汇总图一目了然地显示

了13次进样中鉴别的5种主要糖型的质量数误差。

三氟乙酸(TFA)通常用作蛋白质和肽反相LC (RP-LC)分离的流动相添加剂。TFA是一种离子对试剂，通过尽可能减少蛋白质官能团与硅胶LC颗粒上硅烷醇残基之间的相互作用来改善蛋白质的色谱峰形。虽然TFA会干扰、减弱MS信号，降低分析的绝对MS灵敏度，但TFA对UV检测量有积极作用。因此，在过去使用光学分析方法的实验室中，TFA已广泛用作添加剂，这可能是未来LC-MS方法的基础。

与含有0.1%甲酸的流动相相比，使用含0.1% TFA的流动相时，完整沃特世人源mAb质量数检查标准品的LC-MS谱图的 m/z 电荷峰簇分布范围更广(m/z 2000~6500)。更高的样品消耗量 (~5倍) 克服了电喷雾过程中普遍观察到的TFA离子抑制效应，可以生成与使用甲酸分析相同的数据。更高的锥孔电压 (150 v与60 v) 证明可更有效地去簇任何TFA加合物，从BioAccord系统产生高质量的谱图数据 (图6B)，与0.1%FA数据相当 (图5B)。

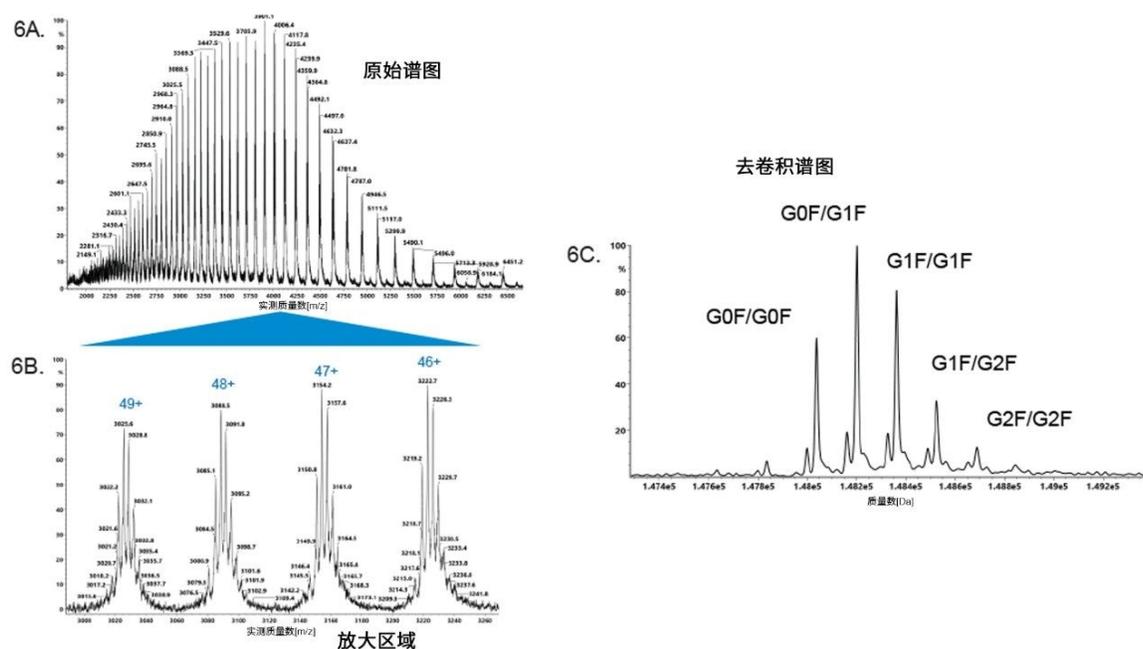


图6.使用含有0.1% TFA的流动相获得的完整蛋白质谱图

使用BioAccord系统分析mAb亚基标准品 (scFc、LC和Fd)

亚基分析 (图7A-B) 采用mAb亚基标准品 (沃特世部件号=186008927 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>>) 进行。TIC色谱图 (图7A) 包含三个分离色谱峰 (scFc、LC和Fd)，报告的保留时间分别为

4.06、5.39和7.93 min。图7B为合并原始谱图，对应于沃特世人源化mAb质量数检查标准品（柱上进样量200 ng）亚基：scFc的每个峰。LC和Fd有较高的s/n，亚基的多个电荷谱图峰簇会自动处理成去卷积结果（图7C）。组分汇总表显示了已识别的LC、scFc和Fd亚基及各自的MS响应、去卷积质量数、计算的质量数误差、保留时间和亚基的修饰百分比。“查看”窗格还显示了组分图中去卷积后scFc中自动识别和标记的主要糖型。

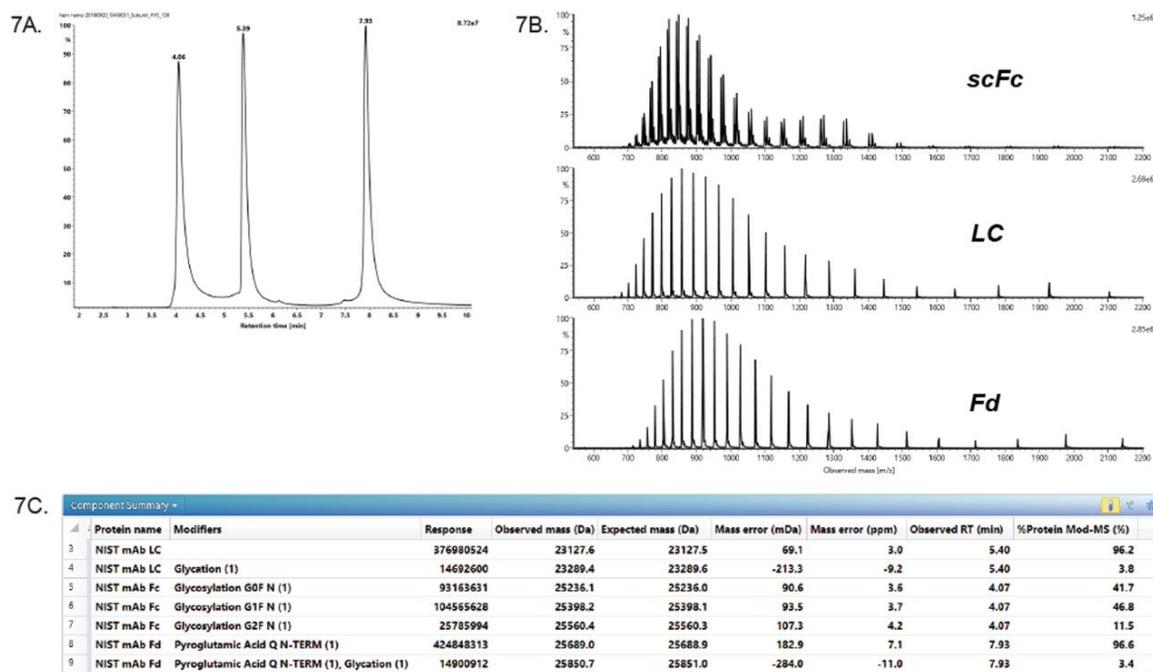


图7.NIST mAb（柱上进样量100 ng）IdeS酶解亚基scFc、LC和Fd的TIC、合并原始谱图和主峰

结论

在这项研究中，BioAccord系统展示了高度可重现的色谱、新型紧凑设计质谱检测器的优异性能、工作流程自动化以及简化的系统交互能力。该系统生成的UNIFI信息学平台mAb和mAb亚基质量数数据促进了自动归属和糖型相对丰度测定，这是典型的方法验证或常规操作样品集。在受管制和非管制的环境中，该系统的部署能力都可以促进快速方法开发，并简化这些方法向后期开发和质控组织的下游转移，这些组织面临着需要更快地做出更明智的分析决策的挑战。

参考资料

1. Rogstad, S., Faustino, A., Ruth, A., Keire, D., Boyne, M., and Park, J. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2017, Vol 28(5):786–794.doi: 10.1007/s13361-016-1531-9.
2. Sokolowska, I., Mo J., Dong, J., Lewis, M. J. and Hu, P. *MAbs.*2017, Vol 9, 498–505.
3. Xu, W., Jimenez, B. R., Mowery, R., Luo, H., Cao, M., Agarwal, N., Ramos, I., Wang, X. and Wang, J. *MAbs* .2017, 9, 1186–1196.

特色产品

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/en_US/BioAccord-LC-MS-System-for-Biopharmaceuticals/nav.htm?cid=135005818&locale=en_US>

720006472ZH, 2020年10月修订

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号