

## 质量数确认工作流程在生物治疗药物筛选中的应用

---

Henry Shion, Scott J. Berger, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

本研究报告了在waters\_connect信息学软件控制下运行BioAccord LC-MS系统<sup>1-10</sup>开发的高通量完整质量数确认工作流程。借助更强的信息学功能进行蛋白质目标质量数匹配，得以实现更快速的梯度LC-MS分析。此外，样品板采用颜色编码，以便使用简单的自定义计算直观显示每个样品的质量数确认状态。该质量数确认工作流程可应用于反相和非变性SEC LC-MS完整蛋白质质量数分析，每次分析的总LC运行时间为2.5分钟。该工作流程可提高LC-MS完整蛋白质质量数分析在克隆筛选、工艺开发及其他活动中的分析效率，在这些活动中，样品通量是生物治疗药物分析的重点问题。

### 优势

- 在反相和非变性SEC LC-MS完整蛋白质质量数分析中均可应用
- 样品板采用颜色编码，可快速查看每个样品的质量数确认状态
- 高通量LC-MS工作流程在符合法规要求的waters\_connect平台上运行，生物制药企业的各个部门皆可部署
- 基于目标分子量进行完整质量数确认

---

## 简介

在生物制药开发过程中，必须提供合适的分析技术用于表征生物治疗药物，例如单克隆抗体(mAb)。利用质谱进行完整蛋白质质量数分析可提供重要信息，例如分子量和样品异质性。由于生物治疗药物样品/候选药物的数量非常大，因此需要使用高通量分析方法在早期开发（例如，克隆筛选）阶段筛选产品属性，并在工艺开发过程中支持大量QbD研究。本研究报告了在waters\_connect信息学软件控制下运行BioAccord LC-MS系统<sup>1-10</sup>开发的高通量完整质量数确认工作流程。在高通量完整蛋白质质量数确认分析中借助更强的信息学功能进行目标质量数匹配，得以实现更快速的梯度LC-MS分析。样品板采用颜色编码，以便使用简单的自定义计算快速查看每个样品的质量数确认状态。该质量数确认工作流程可应用于反相和非变性SEC LC-MS完整蛋白质质量数分析，每次分析的总LC运行时间为2.5分钟。本研究考察了六种市售单克隆抗体和一种半胱氨酸偶联的抗体偶联药物样品。开发的工作流程有助于提高生物治疗药物开发（非常注重样品通量）中LC-MS完整蛋白质质量数分析的效率。



---

图1. Waters BioAccord LC-MS系统和waters\_connect信息学平台

---

## 实验

开发反相LC-MS和非变性SEC-MS方法进行更高通量的完整质量数确认筛选。本研究考察了六种单克隆抗体和一种半胱氨酸偶联ADC样品，以展示质量数确认工作流程。使用48样品瓶板装载重复样品进行分析。

## 样品描述

NIST参比mAb（美国国家标准技术研究院）、曲妥珠单抗（基因泰克，加利福尼亚州南旧金山）、英夫利昔单抗（杨森制药）、利妥昔单抗（渤健公司）、贝伐单抗（基因泰克）和阿达木单抗（艾伯维）均以原始制剂商购获得。ADC样品通过合作研究获得。进行反相LC-MS分析之前，先用50 mM乙酸铵(Sigma 431311)将样品稀释至0.2 mg/mL；进行非变性SEC LC-MS分析之前，先用50 mM乙酸铵（pH约7.0）将样品稀释至2.5 mg/mL。利用LC-MS级水和乙腈(Fisher Scientific Optima)制备流动相和系统溶液。甲酸（部件号：85178）购自Fisher Scientific。

## 方法条件

液相色谱条件（反相LC-MS分析）

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	ACQUITY RDa质谱检测器
样品瓶：	沃特世全回收样品瓶（部件号：186000385C）
色谱柱：	BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 50 mm（部件号：186008944）
柱温：	80 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	4 μL
流速：	0.4 mL/min
流动相A：	0.1 %甲酸

液相色谱条件（反相LC-MS分析）

流动相B:

0.1%甲酸的乙腈溶液

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.40	95.0	5.0	6
1.00	0.40	15.0	85.0	6
1.20	0.40	5.0	95.0	6
1.50	0.40	95.0	5.0	6
2.50	0.40	95.0	5.0	6

## 质谱条件

质谱系统:

ACQUITY RDa质谱检测器, BioAccord系统

电离模式:

正离子模式

采集范围:

$m/z=400\sim 7000$

扫描速率:

2 Hz

毛细管电压:

1.5 KV

脱溶剂气温度： 550 °C

锥孔电压： 70 V

智能数据采集： 关

## 液相色谱条件（非变性SEC LC-MS分析）

液相色谱系统： ACQUITY UPLC I-Class PLUS

检测器： ACQUITY RDa质谱检测器

样品瓶： 沃特世全回收样品瓶（部件号： 186000385C）

色谱柱： ACQUITY UPLC BEH SEC蛋白分析专用柱, 200 Å,  
1.7 μm, 2.1 mm × 150 mm（部件号  
： 186008471）

柱温： 30 °C

样品温度： 6 °C

进样体积： 10 μL

流速： 0.2 mL/min

流动相A： 50 mM乙酸铵

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.20	100.0	0.0	6
2.50	0.20	100.0	0.0	6

## 数据管理

信息学软件: waters\_connect

系统控制和数据处理: UNIFI (1.9.4版)

---

## 结果与讨论

为开发更高通量的质量数确认工作流程，创建了液相色谱梯度以缩短实验运行时间。反相LC-MS分析采用2.5 min 梯度方法（在标准方法中，流动相B由5%增加至85%，总运行时间7 min；在高通量方法中，流动相B在1.0 min 内由5%增加至85%，总运行时间缩短至2.5 min）。流速保持0.4 mL/min。利用这两种梯度方法得到的TIC（总离子流色谱图）比较见图2。

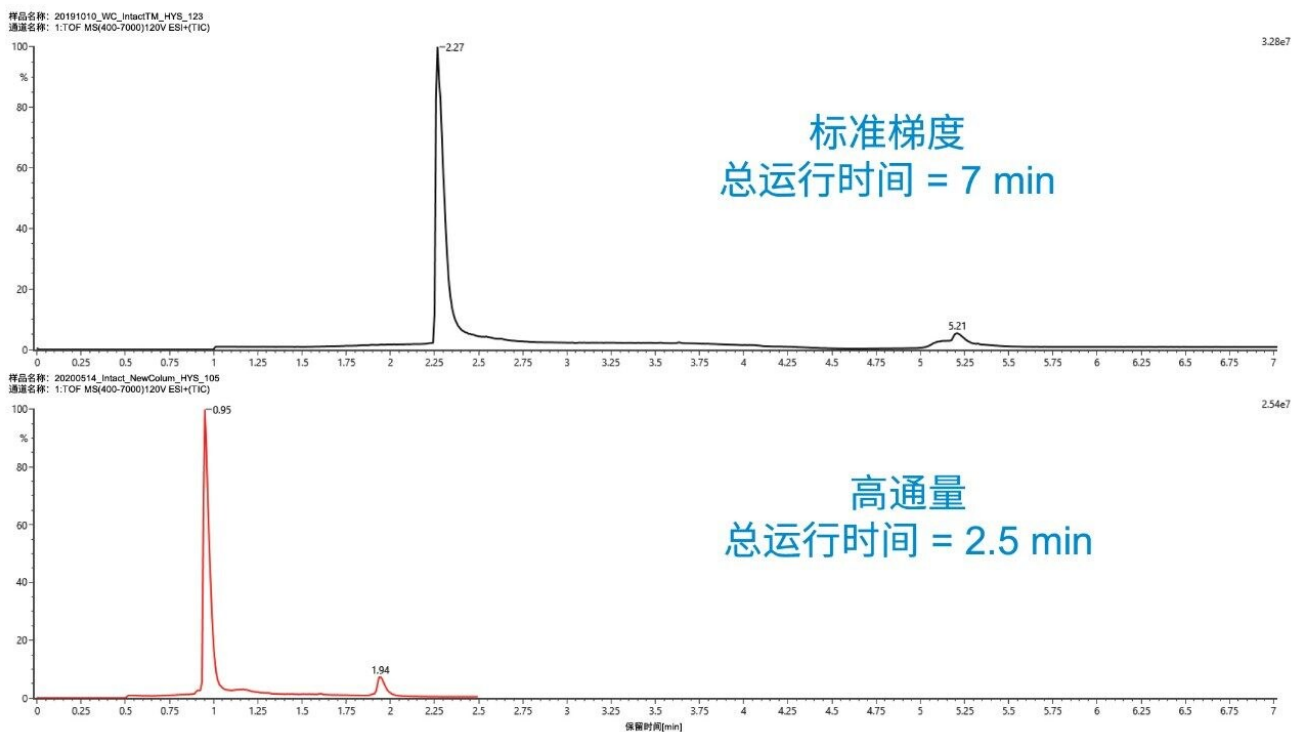


图2.标准反相LC-MS方法（上图）和高通量反相LC-MS方法（下图）的TIC比较。高通量方法的总运行时间缩短至2.5 min。

对于非变性SEC LC-MS分析，将液相色谱流速从0.075 mL/min增加至0.2 mL/min，总运行时间从7.0 min缩短至2.5 min。标准SEC LC-MS分析与高通量方法的TUV比较见图3。

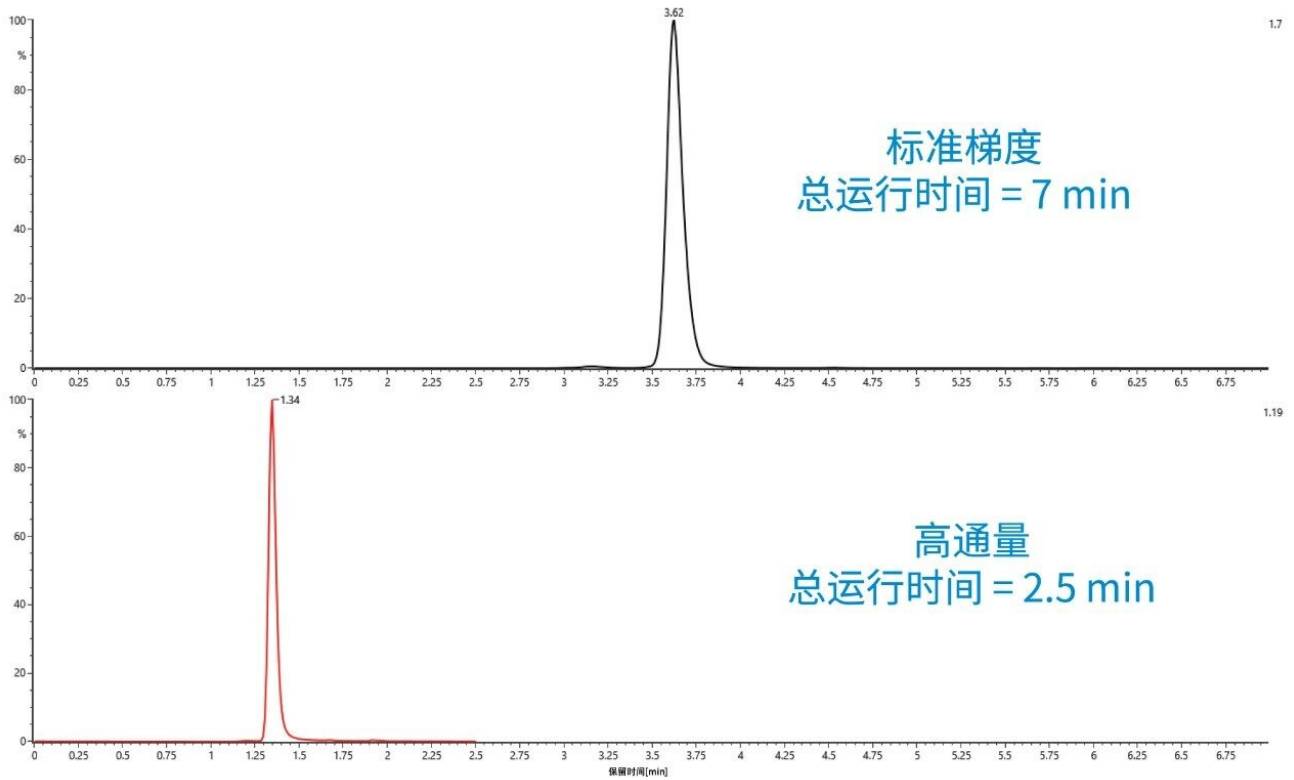


图3.标准SEC LC-MS方法（上图）和高通量SEC LC-MS方法（下图）的TUV比较。高通量方法的总运行时间缩短至2.5 min。

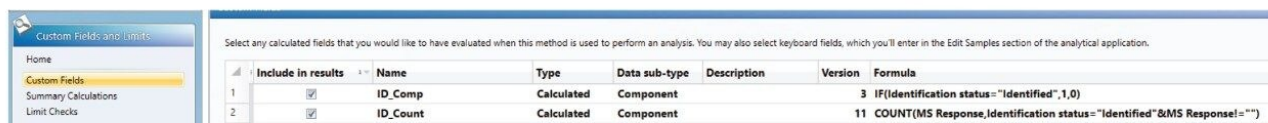
通过克隆筛选进行生物治疗药物发现研究时，往往不使用序列信息进行质量数确认。将样品外包给合同机构分析，同时公司希望保留序列专利时，通常也会出现这种情况。waters\_connect平台支持此功能，可以在数据处理过程中将目标质量数直接输入分析方法进行自动化质量数确认。图4显示了在反相LC-MS分析实验期间输入处理方法中的六种抗体质量数。该方法将现有的或添加到软件库中的翻译后修饰(PTM)与目标质量数结合使用，进行组分鉴定。



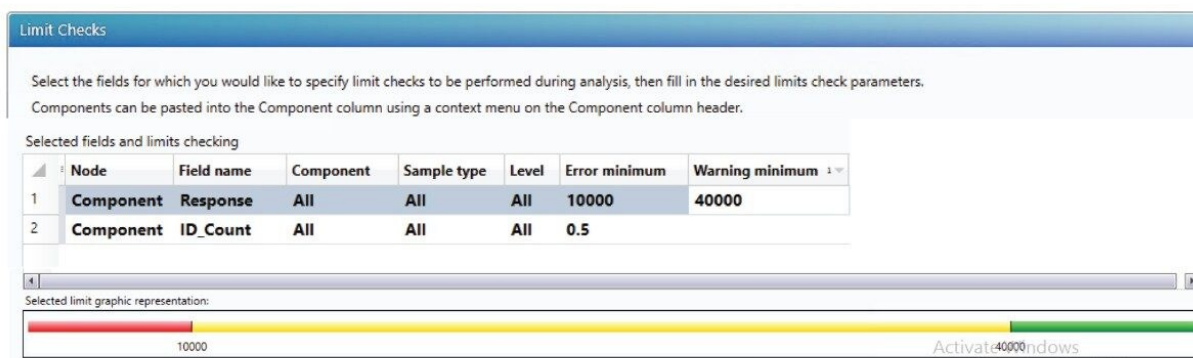
	Component n...	Expected RT (min)	Time window (min)	Expected mass (Da)	Description
1	mAb1	0.96	0.3	148037.0	mAb 1
2	mAb2	0.96	0.3	148058.0	mAb 2
3	mAb3	0.96	0.3	149199.0	mAb 3
4	mAb4	0.96	0.3	147078.0	mAb 4
5	mAb5	0.96	0.3	148078.0	mAb 5
6	mAb6	0.96	0.3	148512.0	mAb 6

图4.在数据处理过程中将目标质量数输入分析方法的*Expect mass (Da)*（预期质量数(*Da*））字段进行自动化质量数确认。

系统生成两个自定义字段，显示样品板上每个样品的质量数确认状态。其中一个自定义字段(*ID\_comp*)用于说明已鉴定（匹配）组分（质量数）的状态，另一个自定义字段(*ID\_count*)用于将鉴定状态链接至已鉴定组分（质量数）的信号响应。这些自定义字段包含在分析方法中，如图5A所示。在分析方法“Limit Checks”（限值检验，如图5B所示）中设置*ID\_count*的响应和自定义字段，以便对样品板上的质量数确认状态进行颜色编码。有关使用UNIFI/waters\_connect中的自定义字段进行完整蛋白质量数分析数据处理的详细说明，可参见参考文献<sup>11</sup>。



## A-2 自定义字段



## B-颜色编码的限值检验

图5A.在分析方法中生成并选择的两个自定义字段以及限值检验（图5B）设置，显示分析方法中的质量数确认状态并进行颜色编码（已确认：绿色，可疑：黄色，未确认：红色）。

建立方法后，便可通过集成的自动化数据采集和处理流程来运行简化的实验。图6显示了在BioAccord LC-MS系统上运行反相LC-MS实验的自动采集流程前后，48样品瓶板上每个重复样品的质量数确认状态示例。

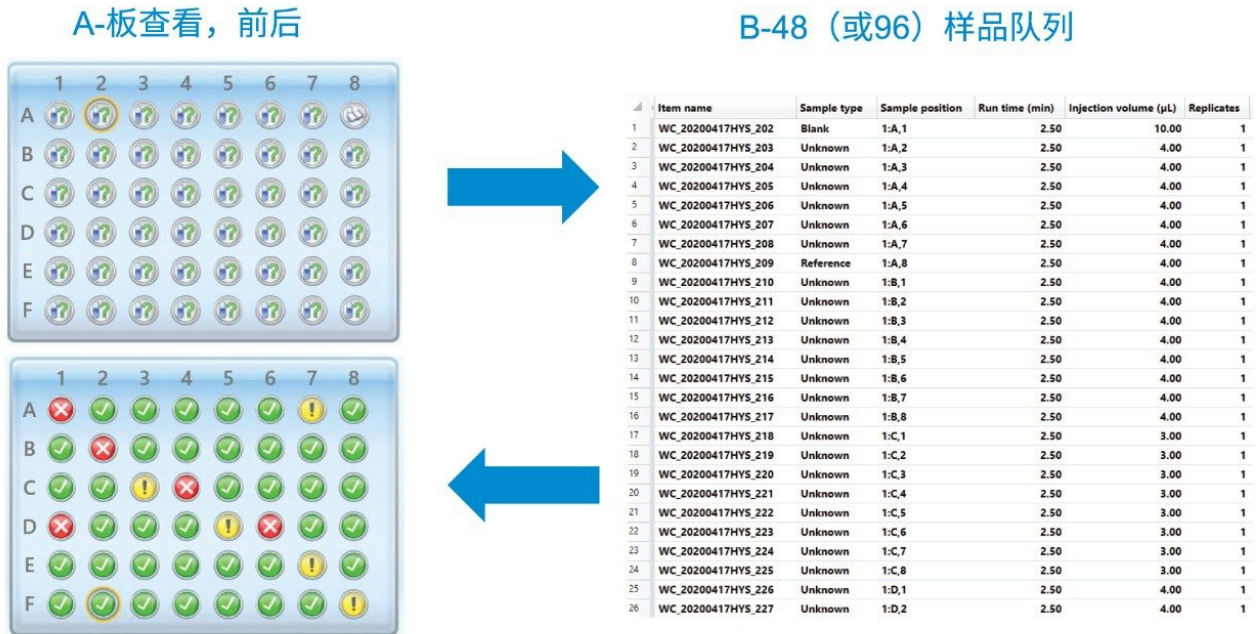


图6.在waters\_connect中进行自动化数据采集和处理前后, 48样品瓶板上每个样品的质量数确认状态。

几种质量数确认样品的示例TIC和去卷积质谱图如图7所示。样品板上的绿码表示该样品位置的质量数已确认与方法中的一个目标质量数匹配。黄码表示与方法中的一个目标质量数匹配, 但信号强度介于限值检验设置中的警告下限与失败下限之间。发生这种情况时, 建议对数据进行手动审查。红码表示与任何目标质量数均不匹配。如图7所示, 该样品未获得实际信号, 因此不存在潜在的匹配结果。

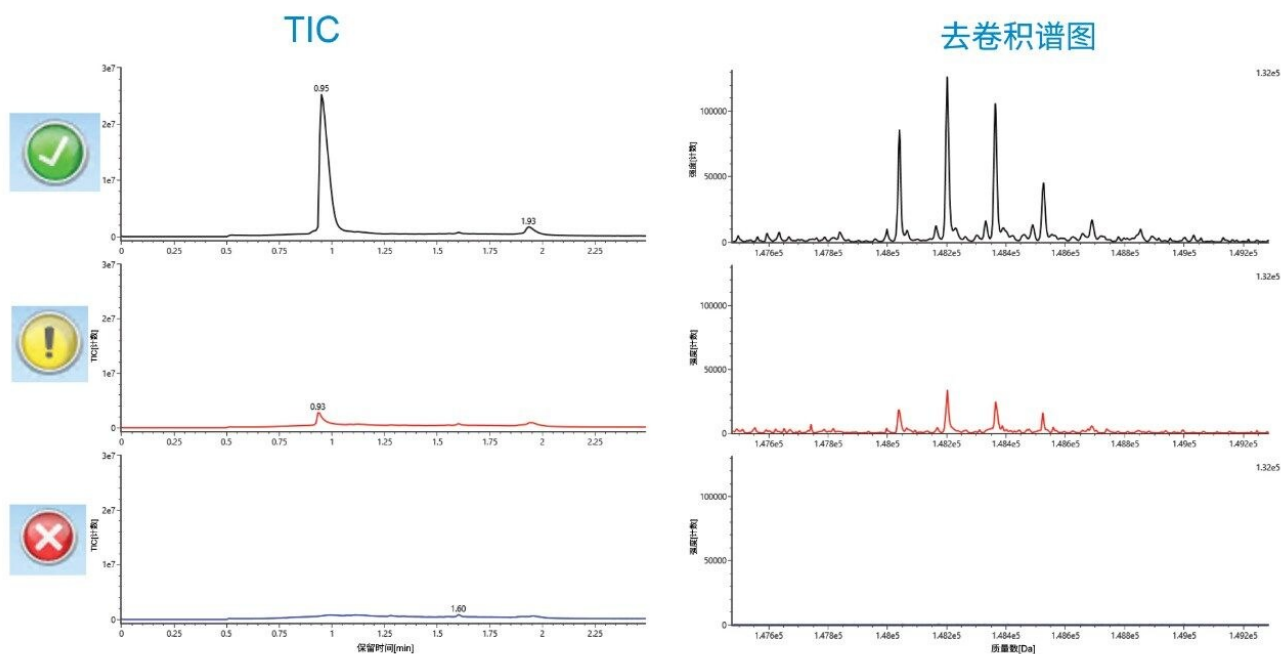


图7.反相LC-MS实验中具有不同质量数确认状态的TIC和去卷积谱图示例：（上图）绿色：质量数已确认；（中图）黄色：可疑，建议进行手动审查；（下图）红色：质量数未确认

利用反相LC-MS法分析六种抗体样品得到的TIC和去卷积谱图如图8所示。高质量数据显示，六种抗体的质量精度通常在5~15 ppm的范围内。

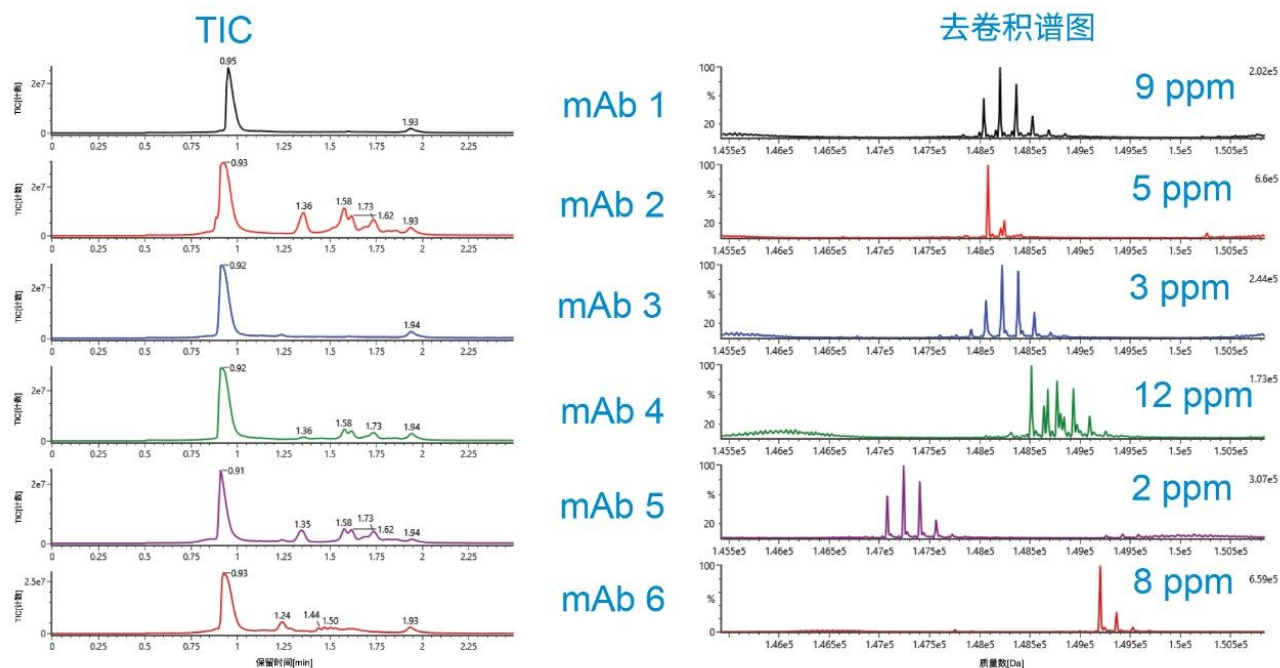


图8.利用高通量反相LC-MS方法分析六种抗体样品得到的高质量TIC和去卷积谱图

利用非变性SEC LC-MS方法分析六种抗体样品得到的UV色谱图（经过处理）和组合原始谱图如图9所示。在组合原始谱图中观察到多电荷抗体离子具有更高的 $m/z$ 峰簇（与反相方法相比）。去卷积处理后，所有六种抗体的质量精度均低于15 ppm（未显示）。

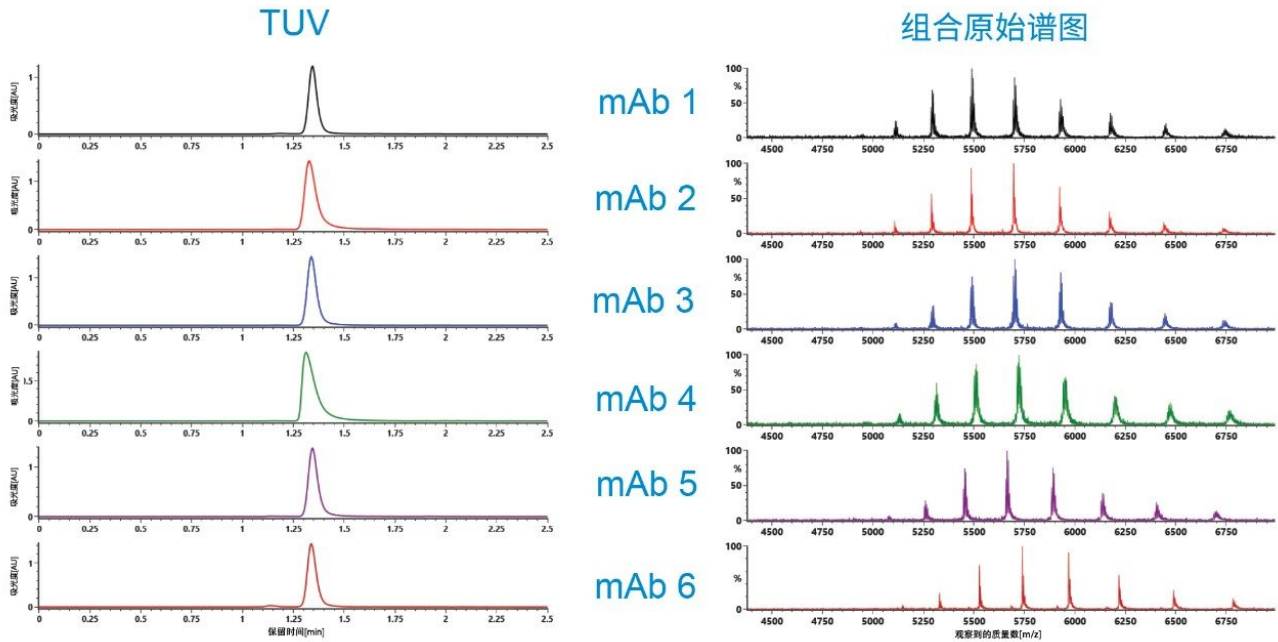


图9.非变性SEC LC-MS HTP方法筛选六种mAb得到的TUV和TIC

非变性质谱对于保持复杂生物样品内的非共价相互作用以便测量分子的复合质量数至关重要。除六种抗体样品以外，我们还使用反相（数据未显示）和非变性SEC LC-MS方法（图10）对半胱氨酸偶联ADC样品进行了对比实验。如预期一样，仅非变性方法能保持轻链与重链之间以及两条重链之间（将ADC分子结合在一起）的非共价相互作用，让我们能够使用其他自定义计算方法在完整质量数水平下成功测量药物抗体偶联比(DAR)<sup>6,11</sup>。

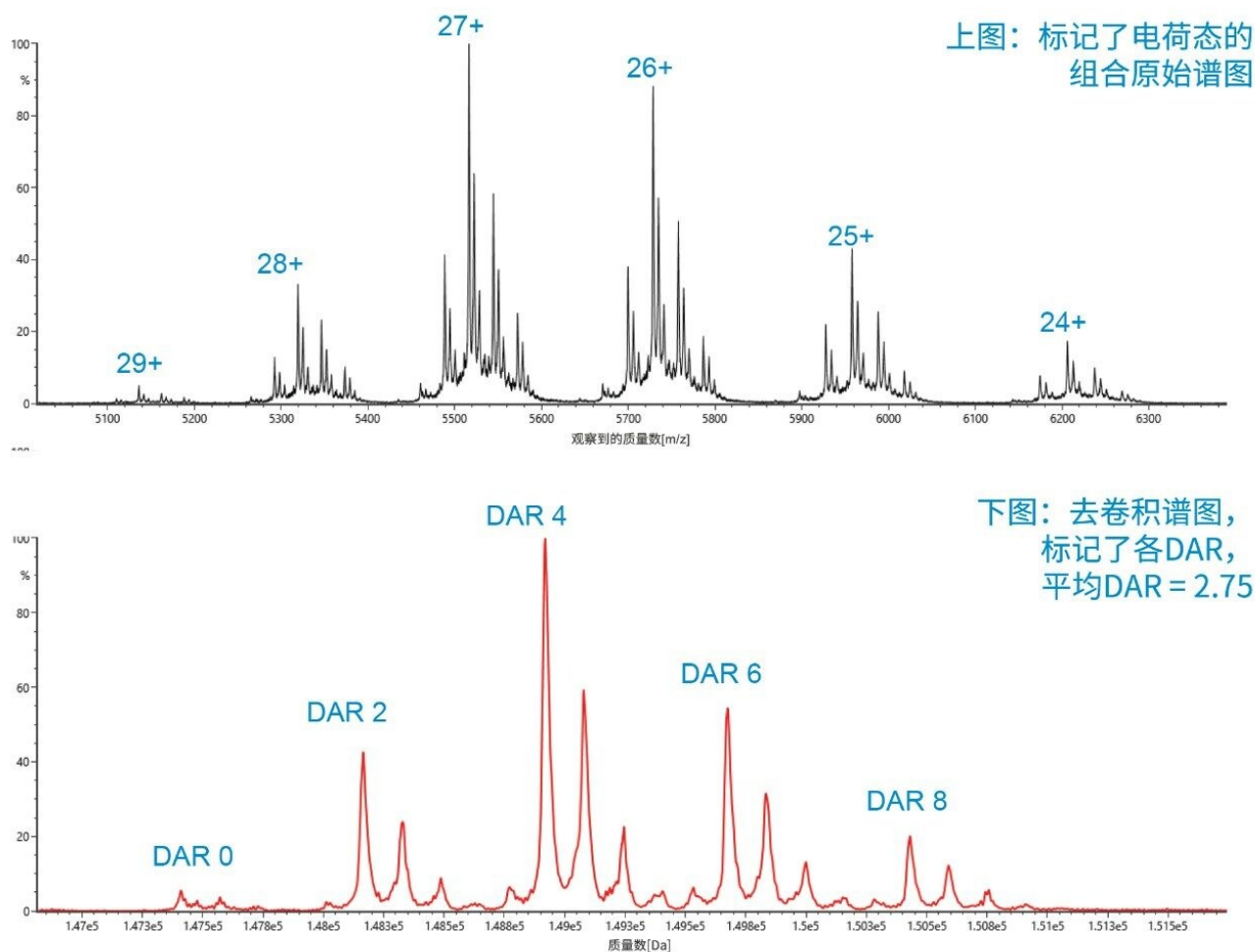


图10. 标记了电荷态的组合原始谱图（上图）和标记了各DAR和总平均DAR的MaxEnt1去卷积谱图（下图）。反相LC-MS分析会使抗体重链之间以及轻链与重链之间的非共价结合解离。仅非变性方法能够保持将ADC分子结合在一起的非共价相互作用。

## 结论

本研究使用在waters\_connect信息学平台上运行的BioAccord LC-MS系统成功开发出一套高通量完整质量数确认工作流程。分别使用反相LC-MS和非变性SEC LC-MS完整质量数确认分析展示了该工作流程，每种分析的总LC运行时间均仅有2.5分钟。样品孔采用颜色编码，能够快速、直观地显示分析结果。总体而言，对于生物制药行业中

需要进行高通量完整蛋白质质量数分析的分析机构而言，这种更快速的方法能够明显提高实验室效率。

---

## 参考资料

1. Shion, H.等人.在数据完整性环境下进行可重现的完整蛋白质质量数例行分析.沃特世应用纪要.2019. 720006472ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html>> .
2. Ranbaduge, N.等人.使用BioAccord系统进行常规肽图分析.沃特世技术简报.2019. 720006466ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/routine-peptide-mapping-analysis-using-bioaccord.html>>
3. Zhang, X.等人.使用BioAccord系统进行游离N-糖分析.沃特世技术简报.2019. 720006474ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/released-n-linked-glycan-analysis-using-bioaccord.html>>
4. Shion, H.等人.使用BioAccord系统实现单克隆抗体轻链和重链质谱分析的平台方法.沃特世技术简报.2019. 720006529ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/platform-method-molecular-mass-analysis-light-heavy-chains-monoclonal-antibodies-bioaccord-system.html>>
5. Zhang, X.等人.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.沃特世技术简报.2019. 720006545ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/increasing-productivity-and-confidence-for-n-linked-glycan-analysis-of-biosimilars-using-the-bioaccord-system.html>>
6. Shion, H.等人.利用BioAccord系统通过非变性质谱法分析抗体偶联药物(ADC).沃特世技术简报.2019. 720006570ZH. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/analysis-of-antibody-drug-conjugates-adcs-by-native-mass-spectrometry-on-the-bioaccord-system.html>>
7. Ranbaduge, N.等人.建立集成化的肽属性分析和监测工作流程以提高分析效率和结果可信度.沃特世应用纪要.2019. 720006602ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/integrated-peptide-attribute-profiling-monitoring-workflow-for-improved-productivity>>



[confidence.html](#)> .

8. Ippoliti, S.等人.使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CS-MS pH浓缩液和BioAccord系统对mAb电荷异构体进行在线IEX-MS分析.沃特世应用纪要.2019. [720006672ZH](#) <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/online-iex-ms-mab-charge-variants-bioresolve-scx-mab-column-ionhance-cx-ms-ph-concentrates-and-bioaccord-system.html>> .
9. Shion, H.等人.评估SmartMS赋能的紧凑型生物制药解决方案BioAccord LC-MS系统部署于开发后期阶段和QC环境中用于完整蛋白质量数分析的性能.沃特世应用纪要.2020. [720006722EN](#) <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/bioaccord-lc-ms-system-performance-smartms-enabled-biopharma-solution-development-qc-intact-mass-analysis.html>> .
10. Shion, H.等人. Evaluating BioAccord System performance for deployment of compact smart MS system in late stage development and QC environment – peptide mapping analysis.Waters Application Note.2020. [720006831EN](#) <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2020/evaluating-bioaccord-system-performance-in-late-stage-development-and-qc-environment-peptide-mapping-analysis.html>> .
11. Shion H, Birdsall R, Cubbedge S, and Chen W. Development of Integrated Informatics Workflows for the Automated Assessment of Comparability for Antibody Drug Conjugates (ADCs) Using LC-UV and LC-UV/MS.Waters Application Note.2015 May.[720005306EN](#) <  
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2015/routine-ms-detection-for-usp-chromatographic-methods.html>> .

## 致谢

本文作者由衷感谢Steve Cubbedge在本研究中创建了2个自定义字段。

---

## 特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

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

---

[UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

[waters\\_connect <https://www.waters.com/waters/en\\_IN/Waters-Connect-Hub/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/en_IN/Waters-Connect-Hub/nav.htm?cid=135040165)

720007027ZH, 2020年11月修订

© 2023 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](#)