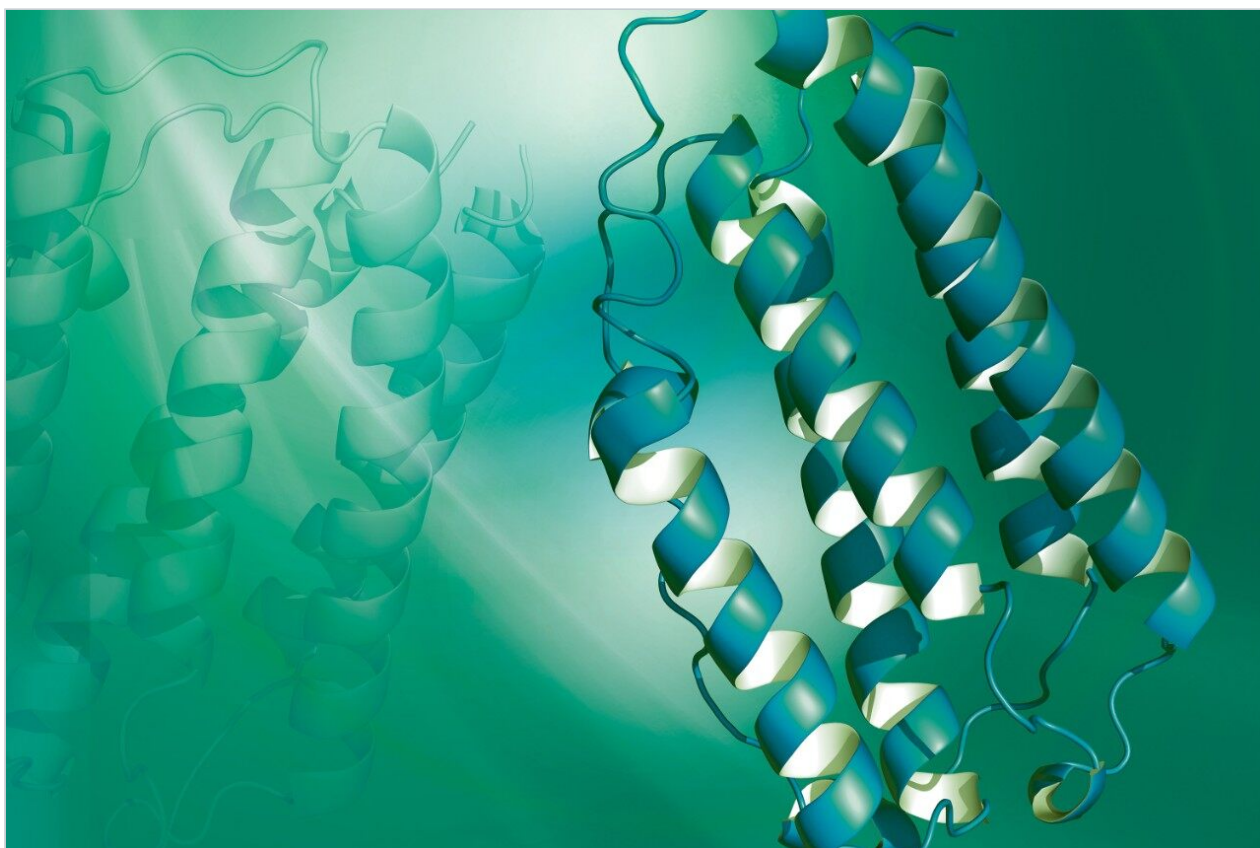


应用纪要

以精简、合规的工作流程执行肽段多属性方法(MAM)

Nilini Ranbaduge, Ying Qing Yu

Waters Corporation



摘要

本文介绍了针对肽段多属性方法(MAM)开发的终端客户分析工作流程。waters_connect信息学平台使研究人员能够在合规环境下,为单克隆抗体(mAb)标准品实现产品质量属性(PQA)的自动化数据采集、处理和报告结果。Peptide MAM工作流程应用程序可协调不同waters_connect应用程序之间的无缝转换,追踪并定量蛋白质生物生产和降解所得到的产品质量属性。在本研究中,这些产品质量属性包括氧化、脱酰胺、琥珀酰亚胺修饰、糖基化、C端和N端修饰以及异构化等修饰。Peptide MAM应用程序扩展了分析范围,支持纯度评估,还能够根据指定参比样品进行新峰检测(NPD)。

优势

- 合规的终端客户Peptide MAM工作流程,可用于产品质量属性分析
- SmartMS赋能的小体积系统,非专家水平的质谱用户也能够在常规分析中可靠地生成高质量数据
- 在通用的合规信息学平台上简化从肽图分析到MAM分析的属性转移
- 目标肽段属性跟踪和相对定量
- 使用稳定的新峰检测算法,以高灵敏度和低假阳性结果错误率检测潜在杂质

简介

在目前的药物开发中,单克隆抗体仍然是一类重要的生物治疗药物。它们在生产和储存过程中会发生各种共翻译和翻译后修饰¹。某些产品属性对于药物分子的效价、有效性和安全性至关重要,这些属性被称为关键质量属性(CQA)。在整个产品生命周期中控制和监测PQA及CQA,可确保生产出满足法规要求和目标产品质量特性要求的高质量mAb。此外,质量源于设计(QbD)理念强调,应建立不同生产过程之间的关系以实现此目标质量特性,其直接获益于MAM分析所提供的丰富信息^{2,3}。在整个生物治疗药物生产过程中建立QbD设计空间,需要使用能够有效监测大型样品组中相关质量属性的分析方法。

多属性方法(MAM)属于LC-MS方法学范畴,旨在监测多种PQA及CQA,并且能够在一次分析中检出未知杂质⁴。Peptide MAM不同于使用光学检测技术的常规色谱方法,例如离子交换色谱法(IEX)和亲水作用色谱法(HILIC),其采用的是反相色谱-质谱联用方法(RPLC-MS)。MAM充分利用质谱技术以及前沿信息学工具的优势,与采用光学检测技术的单属性分析方法相比,能够以更高的通量、灵敏度以及更宽泛的动态范围检测多种PQA。

Peptide MAM旨在通过分析蛋白类生物治疗药物的酶解物来识别和定量多种产品质量属性。具体方式为定量酶解肽及其对应的修饰肽,通常重点关注对产品安全性和有效性有明确影响或指示工艺稳定性的肽段。肽属性监测通常与纯度评估步骤一起进行,该步骤常被称作新峰检测(NPD)。处理NPD数据时,将实验样品中检出的

峰与参比对照品中检出的峰进行比较，即可识别新峰或丰度不在用户定义阈值范围内的峰。目前，许多生物制药公司正在利用多种供应商平台评估MAM。这些研究报告强调了一致性在属性定量中的重要作用，并强调必须尽量降低NPD假阳性结果错误率，从而减少用户干预，实现自动化分析工作流程。

本文介绍了在合规的waters_connect信息学平台上，使用Waters BioAccord LC-MS运行的一套精简的Peptide MAM工作流程。该BioAccord系统由ACQUITY UPLC I-Class PLUS和ACQUITY RDa TOF MS组成，旨在支持整个生物制药开发、生产和QC组织的常规LC-MS分析。

实验

样品前处理

参比样品：首先，使用变性缓冲液（6 mol/L盐酸胍、250 mmol/L Tris, pH 7.8）将10 mg/mL NISTmAb (RM 8671)样品稀释至1 mg/mL。在室温下将样品置于二硫苏糖醇(DTT, 5 mmol/L)中温育30 min，然后在避光的室温环境下用碘乙酰胺(IAM, 10 mmol/L)烷基化20 min。使用NAP-5色谱柱(GE Healthcare)将还原的烷基化样品脱盐，然后用重组猪胰蛋白酶以1:20的酶:底物比率在37 °C下酶解4 h。

mAb降解样品：使用BioRad 10K MWCO离心柱将10 mg/mL NISTmAb (RM 8671)置换到pH 8.0的缓冲液50 mmol/L Tris碱中，转移到0.5 mL Eppendorf LoBind管中，盖紧瓶盖，在40 °C下温育8天。第8天从培养箱中取出样品，按照与参比样品相同的方式酶解。

加标样品：向对照品和降解NISTmAb酶解物中添加Pierce肽保留时间校准(PRCS)标准品即可得到加标样品。每个加标样品包含的PRCS浓度为：每3 µg mAb酶解物含0.5 pmol（Pierce标准品）。

系统适应性标准品：MassPREP肽混标（部件号186002337 <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html>>）

仪器

1. BioAccord LC-MS系统

- ACQUITY RDa检测器
- ACQUITY UPLC I-Class PLUS
- ACQUITY TUV检测器

▪ 柱温箱(CH-A)模块

| | |
|--------------------|---|
| 目标匹配容差: | 10 |
| 碎裂鉴定, 碎片离子匹配容差: | 10 ppm |
| 用于确认的最小主要碎片离子: | 3 |
| 针对特定分析的设置, 氨基酸改性剂: | 固定: 脲甲基化 可变: 氧化(M, W) C端形成赖氨酸 脱酰胺(N, Q) N和O糖基化 N端形成焦谷氨酸Q |
| 酶解设置, 所选的酶解试剂: | 胰蛋白酶 |
| 漏切: | 2 |
| 最小序列长度: | 4 |

表1.肽图分析 (表征) 工作流程处理参数

液相色谱条件

| | |
|-------|---|
| 检测器: | TUV, 10 mm分析型流通池, $\lambda=214$ nm |
| 样品瓶: | 采用MaxPeak HPS的QuanRecovery (部件号186006937) |
| 色谱柱 | ACQUITY UPLC CHS C ₁₈ 肽分析专用柱, 2.1 × 100 mm, 1.7 μ m (部件号186005297) |
| 柱温 | 60 °C |
| 样品温度: | 6 °C |
| 进样体积: | 2.0-10.0 μ L |
| 流速: | 0.20 mL/min |
| 流动相A: | 水, 0.1%甲酸 |
| 流动相B: | 乙腈, 0.1%甲酸 |

表2.适用于mAb酶解物分析的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统/参数

梯度表

| 时间 | 流速 (mL/min) | % A | % B | 曲线 |
|-------|----------------|-----|-----|----|
| 初始 | 0.200 | 99 | 1 | 6 |
| 2.00 | 0.200 | 99 | 1 | 6 |
| 52.00 | 0.200 | 65 | 35 | 6 |
| 57.00 | 0.200 | 15 | 85 | 6 |
| 62.00 | 0.200 | 15 | 85 | 6 |
| 67.00 | 0.200 | 99 | 1 | 6 |
| 80.00 | 0.200 | 99 | 1 | 6 |

表3.用于mAb样品分析的液相色谱梯度

质谱条件

| | |
|---------|--------------------|
| 质谱系统: | ACQUITY RDa检测器 |
| 模式: | 碎裂模式下的全扫描 |
| 质量范围: | 50~2000 <i>m/z</i> |
| 极性: | 正 |
| 扫描速率: | 2 Hz |
| 锥孔电压: | 20 V |
| 毛细管电压: | 1.2 kV |
| 脱溶剂气温度: | 350 °C |
| 智能数据采集: | 开 |

表4.用于肽图分析的ACQUITY RDa检测器设置

数据管理

使用具备Peptide MAM应用程序（监测）的waters_connect信息学平台采集和处理数据。

结果与讨论

表征：定义待监测的产品质量属性并将其转移至科学数据库中。

执行MAM属性监测研究之前，必须先完成生物治疗药物表征分析，确定可能成为MAM分析目标的潜在属性的范围。waters_connect信息学平台支持表征和监测工作流程，还提供有简化不同应用程序之间信息传输的工具。使用waters_connect UNIFI应用程序中的肽图分析工作流程，通过肽图分析进行蛋白质表征。该工作流程的重点为：将肽序列指认为相应的峰、鉴定修饰以及填充MAM分析中所用的保留时间和电荷态信息。

本研究使用数据非依赖型采集模式（BioAccord上包括碎片的MS模式）采集肽图分析数据以鉴定PQA。也可以在QToF系统上使用LC-MS^E模式采集肽图数据，该模式交替使用低碰撞能量与高碰撞能量进行MS扫描，MS1（低碰撞能量）通道用于肽鉴定，MS2（高碰撞能量）通道用于产生碎片离子以进行序列确认。使用表1中列出的参数处理所有分析样品的肽图分析数据。在鉴定肽属性时，至少选择三种确认性碎片离子。所得数据表明，NISTmAb上存在许多肽段修饰⁵。其中一些典型的“热点”修饰有：DTLMISR肽中的蛋氨酸氧化，以及VSVLTVLHQDWLNGK胰蛋白酶解肽中的天冬酰胺脱酰胺化。该未经修饰的VSVLTVLHQDWLNGK序列也代表基峰肽（MS强度最高的峰），是新峰检测方法中的参考序列。

Peptide MAM的属性选择依据是NIST参比mAb的已有知识⁵。将代表PQA的每组未经修饰和修饰后的肽编入waters_connect科学数据库的通用NISTmAb谱库中（图1）。只需选择“send to -> Scientific Library”（发送至->科学数据库）选项，即可从肽图分析中导出目标肽属性。这些科学数据库可以在不同实验室之间共享，如果授权用户获得有关分子的更多知识，还可以进行更新。



图1.科学数据库可以管理表征和监测应用程序之间的属性肽信息。用户可以将肽图分析实验中指认的属性肽导出到谱库中，以供Peptide MAM应用程序创建用于属性监测的目标列表。

Peptide MAM工作流程

Peptide MAM工作流程虽然可以采用与肽图分析相同的方式采集LC-MS数据，但在处理这些数据方面有所不同。在Peptide MAM中，待监测的属性为特异性目标属性，定量分析需要使用特定参数，这些参数通常针对每个属性进行优化。通过Peptide MAM应用程序协调该Peptide MAM工作流程，该应用程序与其他waters_connect应用程序无缝链接（图2A），可实现简单的方法设置、数据采集和处理。该工作流程中集成的应用程序包括：Acquisition Method Editor、Sample Submission、Peptide MAM Processing和LC-MS ToolKit（图2B）。

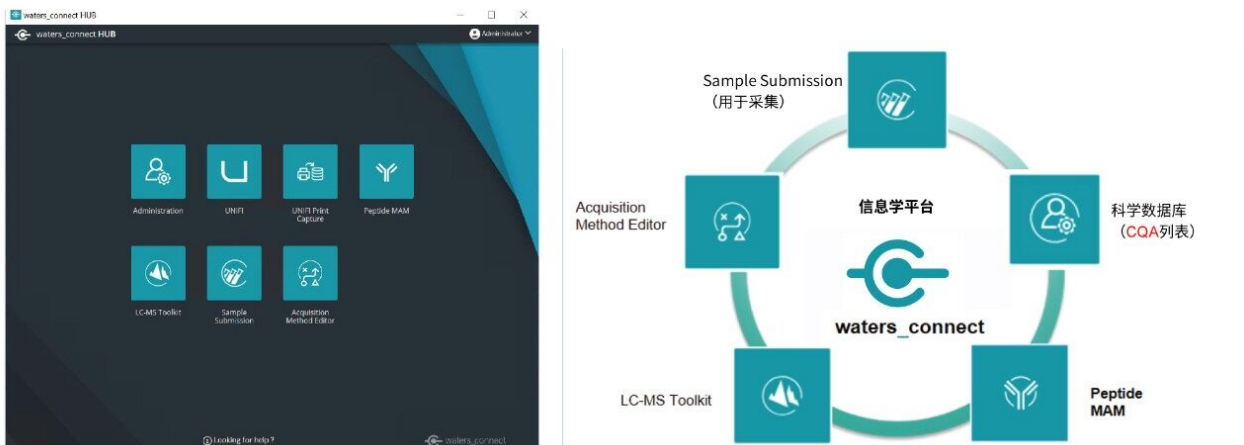


图2.waters_connect hub (A)支持在各种应用程序之间快速切换。Peptide MAM工作流程(B)包括多项集成功能：用于方法生成的Acquisition Method Editor应用程序、用于数据采集的Sample Submission应用程序、用于存储和管理属性信息的科学数据库、Peptide MAM Processing应用程序以及便于实施任何额外的手动数据审查的LC-MS ToolKit应用程序。

Acquisition Method Editor生成LC-MS方法，Sample Submission应用程序的样品列表会参考该方法进行数据采集。Peptide MAM应用程序利用这些数据和肽属性列表进行靶向定量，以报告这些属性的相对丰度，并生成相对于参比样品的潜在“新峰”列表。自动完成Peptide MAM数据处理后，LC-MS ToolKit应用程序可以协助进行后续的手动研究。这些功能将在以下各节中详细讨论。

LC-MS方法设置和数据采集

数据采集由一种方法管理，该方法包含用于靶向定量处理和新峰检测的仪器参数。Peptide MAM分析中使用的Acquisition Method Editor应用程序将包含ACQUITY UPLC I-Class PLUS模块、TUV检测器和ACQUITY RDa检测器的仪器参数。针对mAb分析Peptide MAM优化的一组通用仪器参数见表2-4。用户可以将系统设置为采集数据以供后续处理，也可以在Peptide MAM应用程序中将其设置为“Acquire and process”（采集并处理

) (图2, 左图)。

NISTmAb强制降解实验的数据采集样品队列如图3所示。该列表包括空白样、系统适应性进样、实验对照（参比mAb样品）和强制降解分析样品。图中所示系统适应性进样（样品类型：SST）在分析样品前后进行，不过其进样顺序可根据需要进行修改。选择“Unknown”（未知样）作为所有参比/对照和分析样品的样品类型（图2, 右图, 第3列）。此外, 选择“New peak detection reference”（新峰检测参比）和“Retention time alignment reference”（保留时间对齐参比）的参比样品, 以便在Peptide MAM应用程序中进行采集后数据处理。本例分别选择control mAb和spiked in stressed样品作为新峰检测和保留时间对齐参比。通常, 峰数量较多的样品可提供理想的色谱对齐参比。

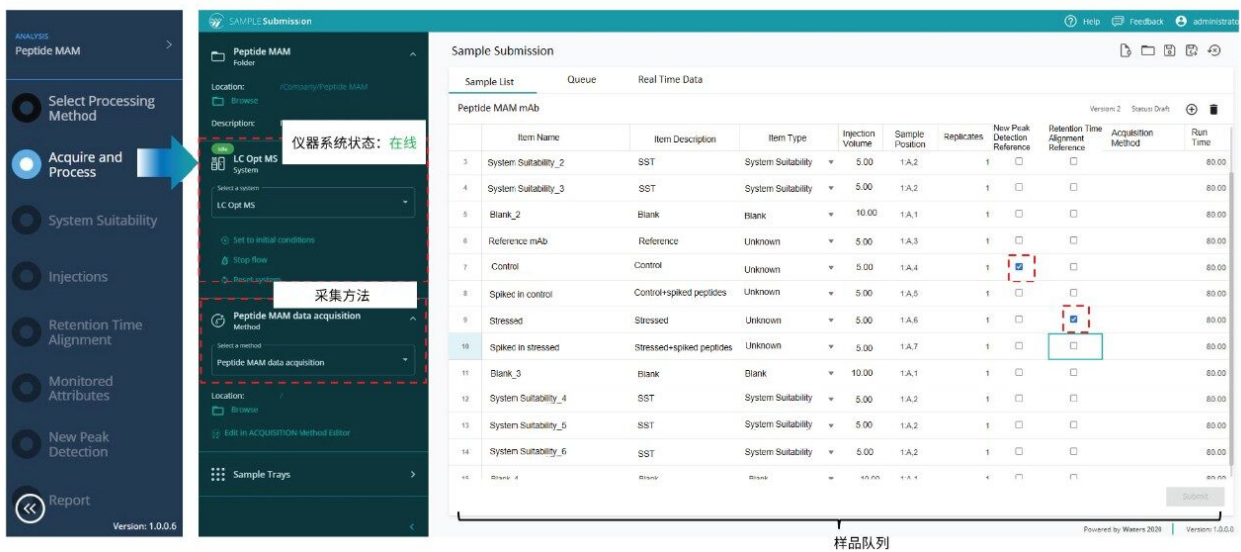


图3.创建简化的采集和处理方法用于Peptide MAM研究时, 可以利用Peptide MAM应用程序中的Sample Submission功能。中间的图中包含有关文件位置、采集系统和样品位置的信息, 而右侧的主表格则包含样品队列。用户可以在这里指定每次进样在总体分析中的作用, 以及用于NPD和峰对齐的参比样品。

Peptide MAM数据处理

Peptide MAM数据处理的最终目标是对属性进行靶向相对定量, 并检出潜在的新型样品杂质。“Process-Only”（仅处理）与“Acquire & Process”（采集并处理）分析都离不开确定系统适应性和肽属性靶向定量所用的肽段列表。新峰检测可以全自动完成, 但需要提供指定的参比样品以供比较评估。

系统适应性评估旨在确定系统的关键组件处于足以产生高质量数据的性能范围内。系统适应性测试基于处理方法中手动创建的目标肽段列表相关的处理数据。该列表中可填入用户定义的色谱峰宽(FWHM)、预期保留时间、质量精度和MS强度标准限值。根据这些参数, 系统适应性进样的通过/失败状态指示Peptide MAM分析的总系统准备状态。

从科学数据库中直接导入MAM肽属性列表仍然是较为简单、有效的模式，因为它可以通过监测分析保持表征数据的可追溯性，但是对于通过其他沃特世系统或第三方LC-MS采集的数据，也可以将这些列表以.csv格式导入软件中。MAM处理方法中的每个肽段条目都包含肽序列、一种或多种修饰、目标保留时间以及用于监测目标肽段的选定电荷态。Peptide MAM中的典型处理参数（图4）能够基于目标LC保留时间和精确质量数进行属性定量，然后进行自动保留时间对齐（图5A）和LC-MS峰的共检测。处理后的数据（图5B）显示了三种选定属性的修饰水平(%)：DTLMISR肽段氧化、VSVLTVLHQDWLNGK脱酰胺以及含Man5游离寡糖的HC糖肽。数据以条形图格式显示，便于快速进行数据比较。降解NISTmAb样品的条形图显示，DTLMISR氧化水平和VSVLTVLHQDWLNGK脱酰胺水平升高（图5B，橙色条），超出相应的警告阈值水平3%和2%。在所有样品中，低丰度糖型Man5未受影响，修饰水平保持在0.83%（相对于监测的其他糖型）。尽管检测到样品中的低丰度Man5糖肽定量结果仅为基峰强度的大约0.1%，但其%RSD报告为7.4%。

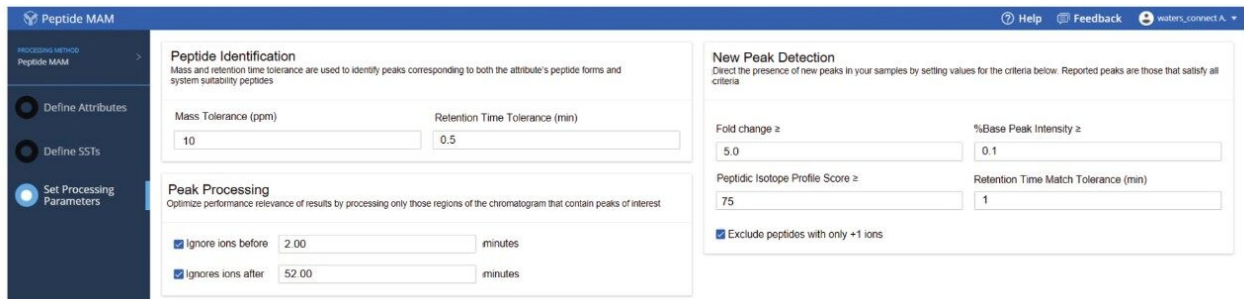


图4.用于目标属性监测和新峰检测的设定参数。Peptide MAM处理使用固定质量数和保留时间容差，并且可以限制在用户定义的保留时间范围内。新峰检测标准包括五项潜在的参数：最小倍数变化、最小基峰强度(%)、同位素谱图评分、保留时间匹配容差以及从结果中去除+1离子（化学噪音离子）的能力。



图5.保留时间对齐图(A)展示了对照品和对齐参比样品中DTLMISR肽段峰在对齐前和对齐后的叠加色谱图。显示了监测三种修饰肽（氧化、脱酰胺和糖基化）所得的属性肽结果（%丰度）。根据用户定义限值预定义的通过/失败标准决定了条形的颜色及其上方是否存在警告图标。下表显示了降解样品中DTLMISR Ox属性的目标标准和结果。

保留时间对齐

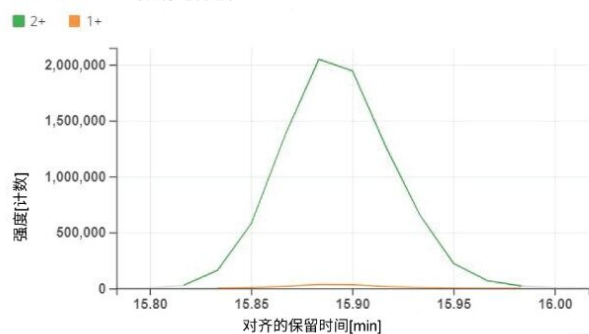
在明确的保留时间窗口（本例为0.5 min）内进行色谱峰的算法对齐，可减少峰分配不当和假阳性鉴定结果（导致整个LC-MS进样中产生差异）。在自动化峰处理过程中，保留时间对齐（图5A）使用计算出的对齐向量将色谱图与指定的对齐参比样品（由用户定义）进行比对。峰的共检测功能可创建复合谱图用于追踪肽段峰

，当比对于不同日期或不同系统上采集的数据时尤其有用。此外，“保留时间上限和保留时间下限”限制了避免处理梯度前进样干扰和梯度后色谱柱清洗段的时间，从而缩短处理时间并简化数据审查。

峰积分和定量选择一致的同位素

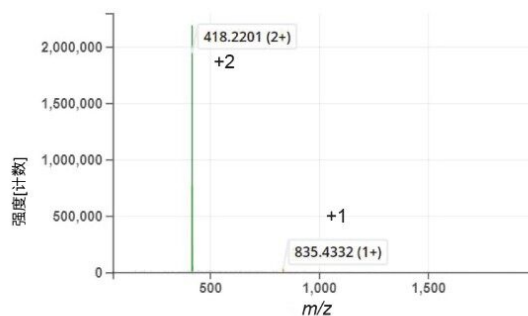
用户可以指定用于各肽段的电荷态，而用于肽组分跟踪的共检测算法可自动选择用于肽定量的各个同位素。这明显简化了MAM处理方法设置，大幅减少了峰处理差异，降低并缩小了属性修饰水平(%)的%RSD范围。图6展示了所有四个分析样品中DTLMISR氧化峰的同位素选择。mAb对照和降解样品均表明，用于DTLMISR肽段定量的两种电荷态（+2和+1）一致选择了所有可检测的同位素（选择5种同位素）。

提取离子色谱图(XIC)
15.78~16.02 min (所有电荷态)

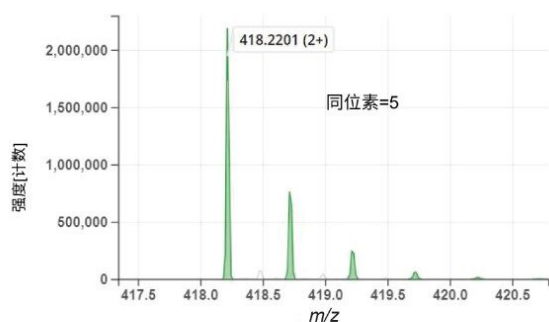


对照品

质谱图
进样保留时间(15.90 min)

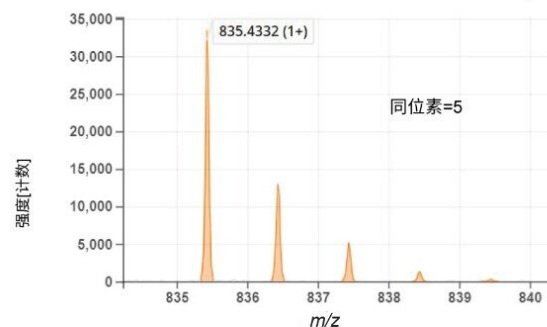


质谱图
进样保留时间(15.90 min)



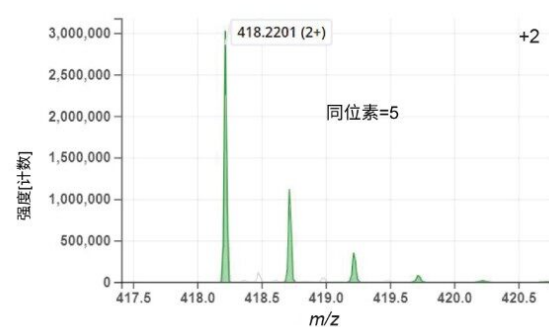
+2

质谱图
进样保留时间(15.96 min)



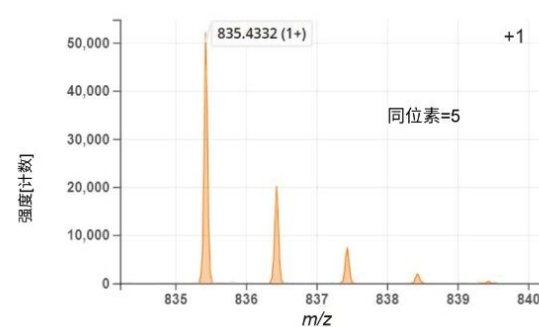
+1

质谱图
进样保留时间(15.92 min)



+2

质谱图
进样保留时间(15.92 min)



+1

降解mAb

图6.DTLMISR氧化肽的XIC (左上图) 和质谱图 (右上图) 展示了用于属性定量的带电荷离子和峰。DTLMISR 具有两种用于峰面积计算的电荷态: +2 (丰度最高的形式) 和+1 (次要形式的离子)。此处显示了XIC中使用的同位素模式以及mAb酶解物对照 (中图) 和降解 (下图) 样品的峰面积计算。这两种样品的自动化峰处理均对每种电荷态使用了五种同位素。

新峰检测(NPD)

利用Peptide MAM分析进行纯度测定时, 新峰检测是分析过程中的重要组成部分。NPD分析可得到样品中潜在杂质的保留时间和中性质量数, 这些杂质未在参比样品中检出或其强度与参比样品中的共检测峰相比发生显著变化。业界反馈NPD目前面临的挑战有: 假阴性/阳性峰的发生率高, 导致歪解样品质量并且投入大量时间进

行手动数据审查。由于每个新的伪峰都需要经过仔细验证才能满足法规标准的要求，该过程可能会延迟批次放行以调查这些异常结果。为评估NPD功能，向NISTmAb胰蛋白酶酶解物对照和降解样品中均添加15种重元素标记的标准肽，加标浓度为每3 μg酶解物含0.5 pmol（图7）。

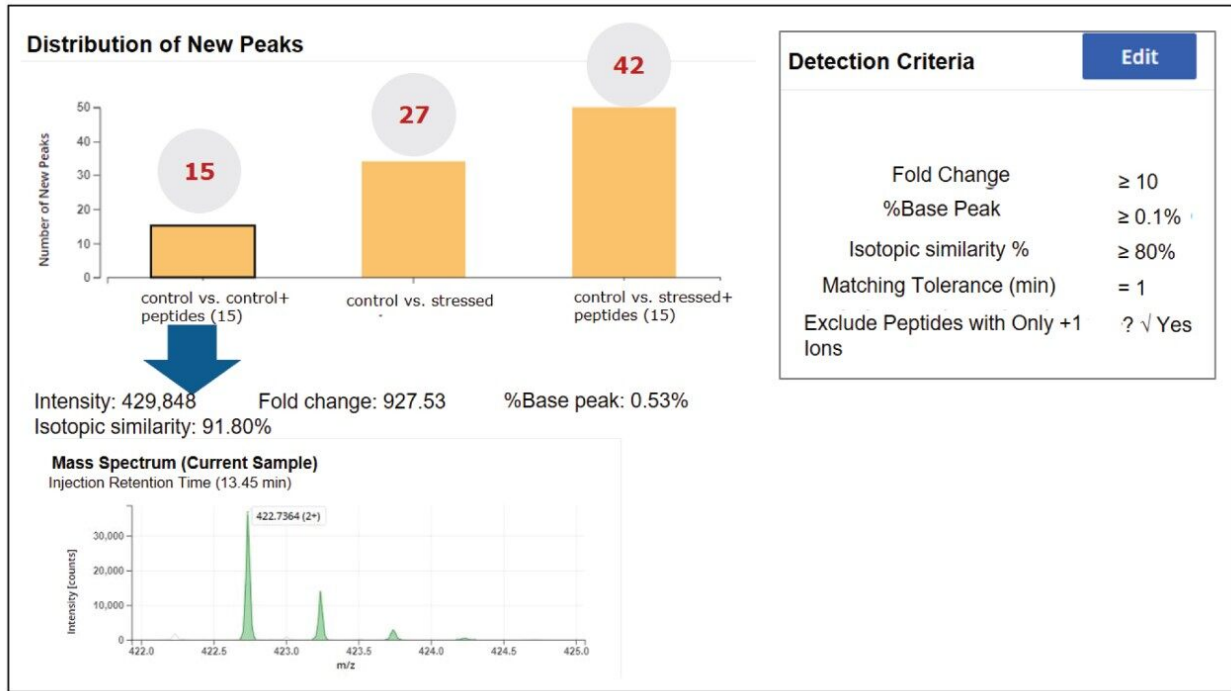


图7.使用基于倍数变化、%基峰水平、%同位素相似性和保留时间容差定义的标准进行新峰检测。显示每个通过标准的峰（右侧）以供审查。可使用质谱图进一步检查这些峰，手动验证NPD结果。

NPD筛选标准可包括倍数变化、%基峰、%同位素相似性和保留时间容差(min)。在峰处理过程中，相对于参比/对照样品中共检测峰的MS强度计算了新峰的倍数变化。峰强度在阈值范围外的任何升高或降低都将触发新峰检测的这一标准。由于倍数变化相对于参比样品计算得出，因此该过程可以使所有分析样品中杂质水平的测量标准化。在本研究中，按照行业惯例，将 ≥ 10 用作默认的倍数变化。

%基峰是NPD中使用的另一项标准，目的是避免由背景离子和化学噪音引起的假阳性鉴定结果。其相对于LC-MS色谱图中最强肽的MS响应计算得出。在强制降解研究的示例数据中（图7），软件将未经修饰的VSVLTVLHQDWLNGK肽确定为基峰。该研究使用至少在0.1%水平上的%基峰值来设置新峰检测的下限。

为进一步减少假阳性鉴定结果，将同位素相似性评分引入Peptide MAM NPD数据处理中。相对于具有相似m/z的离子的同位素分布计算%同位素相似性。对于使用智能数据采集(IDC)功能采集的BioAccord数据，此评分通常设置为75%或更高。保留时间匹配容差保持在1 min，并通过选择“Exclude peptides with only +1 ions”（排除仅含+1离子的肽）选项排除所有溶剂离子和化学噪音。

NPD结果（图7）显示，在加标对照样品中鉴定出15个新峰，其对应于加标重元素标记肽的中性质量数。降解NISTmAb样品中的新峰数量为27个。这些峰包含之前研究的NIST mAb的典型修饰，例如氧化和脱酰胺。加标的mAb降解样品应产生42个新峰（加标15个 + 降解样品中27个），与我们的观察结果相符。

如果需要，可使用“review”（审查）选项来验证每个新峰，从而显示所选新峰的质谱图。授权用户可以先接受或拒绝这些新峰，然后再确定结果。

报告

有效说明Peptide MAM结果，需要报告处理后的数据、相关质量标准及处理条件。Peptide MAM应用程序利用内置模板简化报告生成步骤，分析人员可灵活选择要包含在报告中的章节元素。报告总结了进样、系统适应性测试标准和结果、属性定量、新峰检测以及LC-MS采集方法记录。图8所示为强制降解研究生成的示例报告，其中摘录了一些予以呈现的关键部分。用户可以将报告结果导出为PDF或.csv格式，以便在其他应用程序中重复使用数据。

进样列表 监测的属性与NPD 采集记录

报告

Report Content

Select the sections to include in your report:

- Injection List
- Blanks
- System Suitability
- Monitored Attributes
- New Peak Detection
- Acquisition Record

Generate Report

Peptide MAM Report

Generated By: waters_connect Administrator
 Generated Date: 29 Sep 2020 12:46
 Processing Date: 25 Sep 2020 13:06

Analysis
 Name: Peptide MAM
 Version: 2
 Location: Company\MAM\Demo data
 Description: bundle 34

Processing Method
 Name: Peptide MAM
 Version: 2
 Location: Company\MAM\Demo data
 Description: No Description

Injection List

| # | Injection Name | Type | Acquisition Status |
|----|-------------------------------|---------|--------------------|
| 1 | Blank_1 | Blank | Complete |
| 2 | System suitability peptides_1 | SST | Complete |
| 3 | System suitability peptides_2 | SST | Complete |
| 4 | System suitability peptides_3 | SST | Complete |
| 5 | Blank_2 | Blank | Complete |
| 6 | Control | Unknown | Complete |
| 7 | Unknown sample_1 | Unknown | Complete |
| 8 | Unknown sample_2 | Unknown | Complete |
| 9 | Unknown sample_3 | Unknown | Complete |
| 10 | Blank_3 | Blank | Complete |
| 11 | System suitability peptides_4 | SST | Complete |
| 12 | System suitability peptides_5 | SST | Complete |
| 13 | System suitability peptides_6 | SST | Complete |
| 14 | Blank_4 | Blank | Complete |

Results - % Modified

| Injection Name | WSV% (Relative to Control) | WSV% (Relative to Control) | WSV% (Relative to Control) | WSV% (Relative to Control) | WSV% (Relative to Control) |
|------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Control | 1.30 | 0.91 | 0.65 | 1.47 | 41.32 |
| Unknown sample_1 | 1.18 | 1.18 | 0.68 | 4.12 | 42.29 |
| Unknown sample_2 | 1.24 | 0.90 | 0.62 | 1.30 | 42.10 |
| Unknown sample_3 | 1.35 | 1.49 | 0.66 | 4.14 | 42.44 |

New Peak Detection

| Injection Name | Relative to Control | Relative to Control | Relative to Control | Relative to Control | Relative to Control |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Control | 1.64 | 0.60 | 1.30 | | |
| Unknown sample_1 | 1.52 | 0.75 | 3.84 | | |
| Unknown sample_2 | 0.69 | 0.17 | 1.76 | | |
| Unknown sample_3 | 1.81 | 0.26 | 3.99 | | |

Processing Parameters

| Parameter | Value |
|-----------------------------|-------|
| System suitability criteria | 0.05 |
| System suitability criteria | 0.05 |

ACQUITY HDA Detector

Information
 Serial Number: 100047
 Instrument Serial Number: 2020

Instrument Setup
 Model: HDA
 Configuration: HDA-2000
 Software Version: 3.1.2
 Firmware Version: 1.7.307 (Rev. 14.03.08)
 Manufacturer: Waters Corporation
 Manufacturer Part Number: 640 p/n
 Manufacturer Part Number: 2000 p/n
 Manufacturer Part Number: 1000 p/n
 Manufacturer Part Number: 1000 p/n

Sample Manager FTM
 Software Version: 3.1.2
 Configuration: HDA-2000
 Model: FTM
 Manufacturer: Waters Corporation
 Manufacturer Part Number: 640 p/n
 Manufacturer Part Number: 2000 p/n
 Manufacturer Part Number: 1000 p/n
 Manufacturer Part Number: 1000 p/n

System suitability peptides_2

Experimental Record
 HDA Detector
 Manufacturer: Waters Corporation
 Model: HDA-2000
 Serial Number: 100047
 Instrument Serial Number: 2020
 Configuration: HDA-2000
 Software Version: 3.1.2
 Firmware Version: 1.7.307 (Rev. 14.03.08)
 Manufacturer: Waters Corporation
 Manufacturer Part Number: 640 p/n
 Manufacturer Part Number: 2000 p/n
 Manufacturer Part Number: 1000 p/n
 Manufacturer Part Number: 1000 p/n

图8.提供可选的报告模板章节（左图）以配置Peptide MAM数据报告。此报告总结了进样、系统适应性测试数据、肽属性跟踪数据、NPD和LC-MS方法标准。

Peptide MAM研究中的系统间重现性

图9显示了使用上述方法由三套BioAccord系统分析NIST mAb降解样品所生成的数据。数据显示，所监测的八种属性的RSD低于10%。本研究的关键在于纳入了Man5糖基化属性和WVSLTVLHQDWLNGK脱酰胺属性，它们代表在waters_connect下运行的所有三套BioAccord系统上较为宽泛的强度动态范围（与基峰的MS强度差异超过1000倍）。

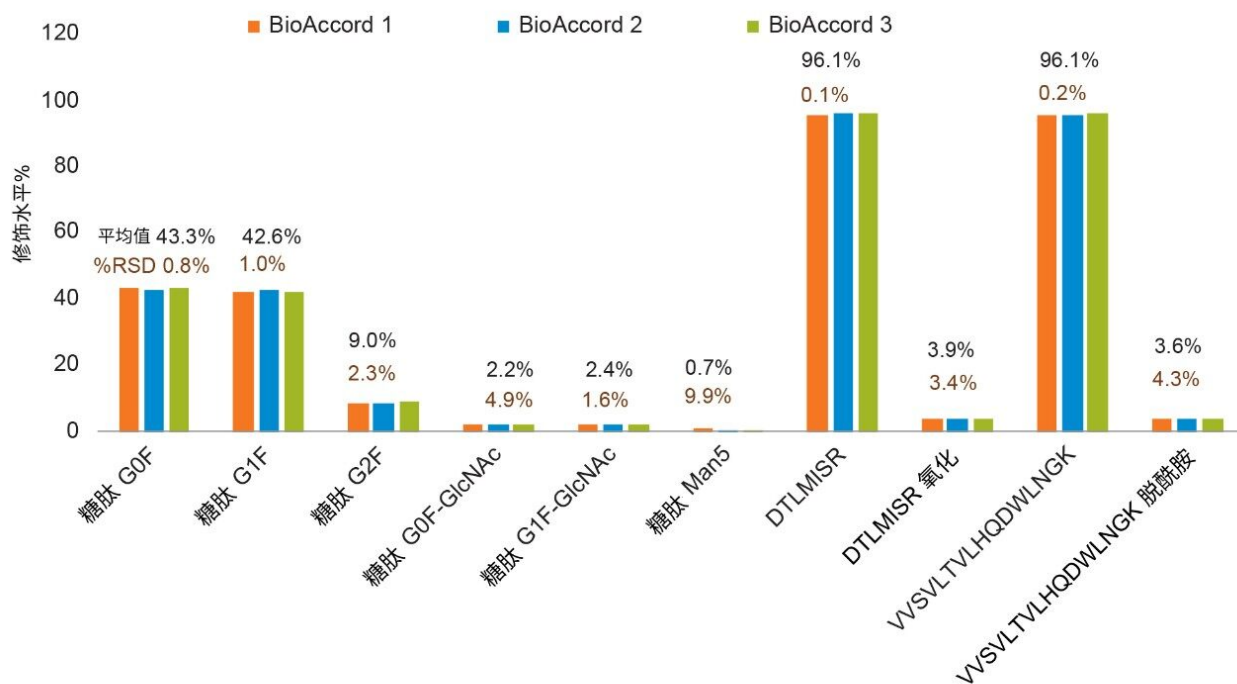


图9.在三套BioAccord系统上采集的属性监测数据表明，在通用仪器和不同仪器上实施的重复实验中，各属性测量结果的%RSD变异性较低。

结论

本文介绍了在waters_connect合规信息学平台控制下使用BioAccord LC-MS系统运行的精简版Peptide MAM工作流程。该MAM功能可实现直接、灵敏、高选择性的属性测量，补充并可能取代现有的常规色谱和电泳分析，从而支持并加快生物制药产品开发、工艺开发、生产和QC批次放行。

具体而言，与本领域中之前的分析相比，该Peptide MAM工作流程具有清晰、优异的性能：1)工作流程高度自动化且界面直观清晰，非专家水平的质谱用户也能使用；2)自动化RT对齐有助于改善不同进样、仪器和研究中的峰组分跟踪，提供一致的属性定量；3)先进的算法和筛选工具可大幅减少新峰检测的假阳性结果错误率；4)科学库功能有助于实现从表征到监测的无缝过渡，并具有数据可追溯性；5)借助BioAccord系统的SmartMS功能，无论是经验丰富的质谱专家还是新手用户，均能够在属性分析中自信地操作高分辨率质谱仪。这些功能不仅使核心生物制药开发组织能够日常采用LC-MS方法分析生物治疗药物的肽属性，还可以应用于LC-MS过程监测和QC批次放行等新兴领域。

参考资料

1. Xu, Weichen *et al.* A Quadrupole Dalton-based Multi-Attribute Method for Product Characterization, Process Development, and Quality Control of Therapeutic Proteins. *mAbs* vol. 9,7 (2017): 1186–1196. doi:10.1080/19420862.2017.1364326.
2. Alt N, Zhang TY, Motchnik P, Taticek R, Quarmby V, Schlothauer T, Beck H, Emrich T, Harris RJ. Determination of Critical Quality Attributes for Monoclonal Antibodies using Quality by Design Principles. *Biologicals*. 2016;44:291–305. doi:10.1016/j.biologicals.2016.06.005. PMID:27461239.
3. Finkler C, Krummen L. Introduction to the Application of QbD Principles for the Development of Monoclonal Antibodies. *Biologicals*. 2016;44:282-90. doi:10.1016/j.biologicals.2016.07.004. PMID:27546184.
4. Rogers, Richard S *et al.* Development of a Quantitative Mass Spectrometry Multi-Attribute Method for Characterization, Quality Control Testing and Disposition of Biologics. *mAbs* vol. 7,5 (2015): 881-90. doi:10.1080/19420862.2015.1069454.
5. Li, W, Kerwin, J. L, Schiel, J, Formolo, T, Davis, D, Mahan, A, Benchaar, S. A. State-of-the-Art and Emerging Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization Volume 2. *Biopharmaceutical Characterization: The NISTmAb Case Study*. January 1, 2015 , 119–183.

特色产品

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

[ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <https://www.waters.com/514228>](https://www.waters.com/514228)

[waters_connect HUB <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

[UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/10195515>](https://www.waters.com/10195515)

[生物制药专用BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818)

720007094ZH, 2020年12月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.