

使用BioAccord™系统加快生物治疗药物的电荷异构体分析

Robert E. Birdsall, Brooke M. Koshel, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

离子交换色谱(IEX)技术具有非常高的价值，能够在生物药物开发和生产工艺中分离产品/工艺相关的电荷异构体。但是，当单独使用光学检测时，该技术提供详细信息价值有限。本研究将沃特世高纯度IonHance™ CX-MS pH浓缩液与BioAccord液质联用(LC-MS)系统结合使用，开发出一种兼容MS的基于IEX的方法。使用BioResolve™ SCX mAb色谱柱进行分离，在BioAccord系统上采集数据，由waters_connect™信息学平台控制该系统并处理数据。本研究的结果证明，当使用IonHance CX-MS pH浓缩液分离与生物治疗药物相关的电荷异构体时，可以采集质谱数据并自动去卷积。此外，采用配备光学检测器的ACQUITY™ Premier系统进行的比较研究表明，BioResolve SCX mAb色谱柱使用pH或“盐”梯度可提供相媲美的性能，从而提高灵活性以支持与生物药物生产相关的开发和生产活动。

优势

- IonHance CX-MS浓缩液能够促进电荷异构体的MS鉴定
- BioResolve SCX mAb色谱柱的pH/盐兼容性可提高部署的灵活性
- ACQUITY Premier系统可发挥一致的性能以改善分析结果

简介

IEX技术的驱动机制是分析物与吸附剂或固定相之间的电荷相互作用。在蛋白质分析中，与氨基酸官能团及其修饰相关的表面电荷可以与表现出相反电荷的活性吸附位点协同作用，使IEX成为一项具有非常高价值的技术，能够分离与生物药物的产品/工艺相关的电荷异构体^{1,2}。IEX的分析物洗脱机制通常是由盐驱动的，即通过提高离子强度（盐）来抑制分析物与固定相活性位点的结合，从而实现分析物迁移。但是，盐驱动方法的缺点在于，由于所用的高离子强度缓冲液或非挥发性盐造成离子抑制，因此它们在很大程度上与MS不兼容。就这方面而言，盐驱动方法仅限使用光学检测，限制了所能提供的有用信息量。另一种方法是通过调节pH来洗脱分析物，使离子强度保持恒定，通过改变流动相的pH来控制蛋白质和/或结合位点的电荷。这些方法因与MS检测兼容而更具吸引力，可以更深入地了解电荷异构体。但是，要找到合适的缓冲液来提供可接受的分辨率和MS检测器响应并非易事。

沃特世在最近的产品组合扩展中，推出了专为应对生物药物分析相关挑战而设计的产品（图1A）。IonHance CX-MS和BioResolve CX pH浓缩液作为这些产品的一部分，代表着生物治疗药物分析在创新方面向前迈出的一大步。这些专门设计的缓冲液以即用型10x预配制浓缩液的形式发货。它们经过精心设计，经稀释后能够在宽范围内提供线性pH响应（图1B），适用于基于IEX的分析。本研究的重点是证明此类产品在mAb生物治疗药物相关电荷异构体分析中的价值，以及如何部署才能加快药品的开发和生产速度^{3,4}。

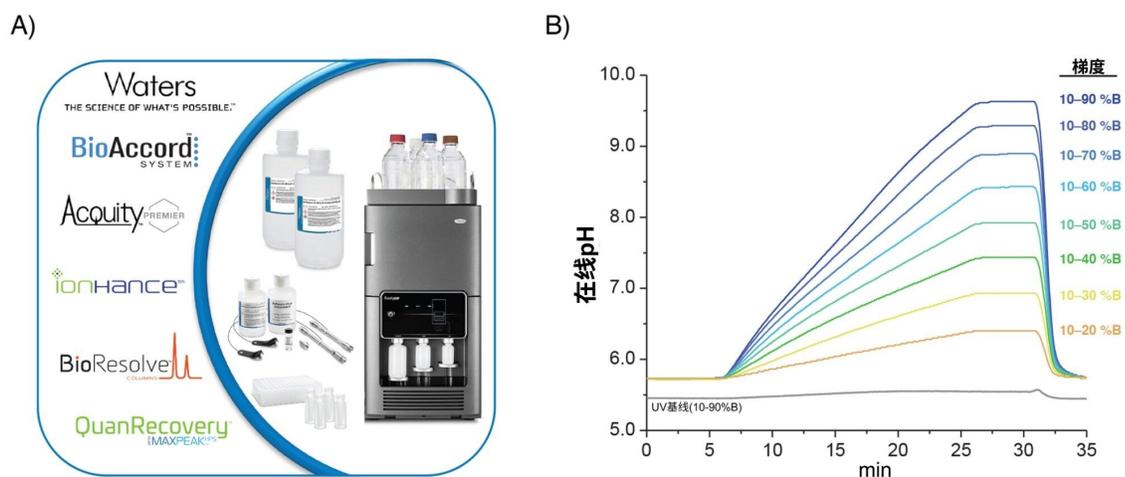


图1.加快生物药物分析

A)沃特世对生物药物分析的变革性方法带来了产品创新，包括BioAccord系统、BioResolve产品线和ACQUITY Premier技术。

B) Waters CX pH浓缩液的在线pH测量，观察到基于梯度的线性比例响应。

实验

氯化钠、MES一水合物和MES盐购自Fisher Chemical。英夫利昔单抗药品Remicade™及其获批的生物类似药Renflexis™购自Amerisource Bergen，使用无菌水按照生产商说明的剂量浓度(10 mg/mL)制备，然后直接进样。

BioAccord LC-MS系统条件

液相色谱系统：

ACQUITY Premier系统（带BSM模块）

检测条件：

ACQUITY TUV, FC=Ti 5 mm, $\lambda=280$ nm、214 nm

样品瓶:	QuanRecovery™ MaxPeak™样品瓶(P/N: 186009186)
色谱柱:	BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 μm, 2.1 mm × 100 mm (P/N: 186009056)
柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	2 μL
流速:	0.100 mL/min
流动相A:	IonHance CX-MS pH浓缩液A (P/N: 186009280)
流动相B:	IonHance CX-MS pH浓缩液B (P/N: 186009281)
RDa设置:	
电离模式:	ESI+
采集模式:	全扫描
采集范围:	高(400 – 7000 <i>m/z</i>)
扫描速率:	1 Hz
毛细管电压:	1.5 kV
锥孔电压:	125 V

脱溶剂气温度： 350 °C

智能数据捕获： 启用

色谱软件： waters_connect内的UNIFI™应用程序v2.1.2.4

梯度 (IonHance CX-MS浓缩液)

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.100	54.3	45.7	初始
45.00	0.100	40.0	60.0	6
46.00	0.100	2.0	98.0	6
49.00	0.100	2.0	98.0	6
50.00	0.100	54.3	45.7	6
70.00	0.100	54.3	45.7	6

ACQUITY Premier LC/UV条件

液相色谱系统： ACQUITY Premier系统 (带QSM模块)

检测条件： ACQUITY TUV, FC=Ti 5 mm, λ =214 nm、280 nm

样品瓶： QuanRecovery MaxPeak样品瓶(P/N: 186009186)

色谱柱： BioResolve SCX mAb色谱柱, 3 μ m, 2.1 mm \times 100 mm
(P/N: 186009056)

柱温:	40 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1 µL
流速:	0.100 mL/min
流动相A:	BioResolve CX pH浓缩液A (P/N:186009063) 或20 mM MES缓冲液, pH 6.7
流动相B:	BioResolve CX pH浓缩液B (P/N:186009064) 或20 mM MES缓冲液加200 mM NaCl, pH 6.7
流动相C:	H ₂ O
流动相D:	H ₂ O
色谱软件:	Empower™ 3, FR4

梯度 (BioResolve CX pH浓缩液)

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
初始	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	初始
45.00	0.100	61.0	39.0	0.0	0.0	6
46.00	0.100	10.0	90.0	0.0	0.0	6
49.00	0.100	10.0	90.0	0.0	0.0	6
50.00	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	6
70.00	0.100	81.5	18.5	0.0	0.0	6

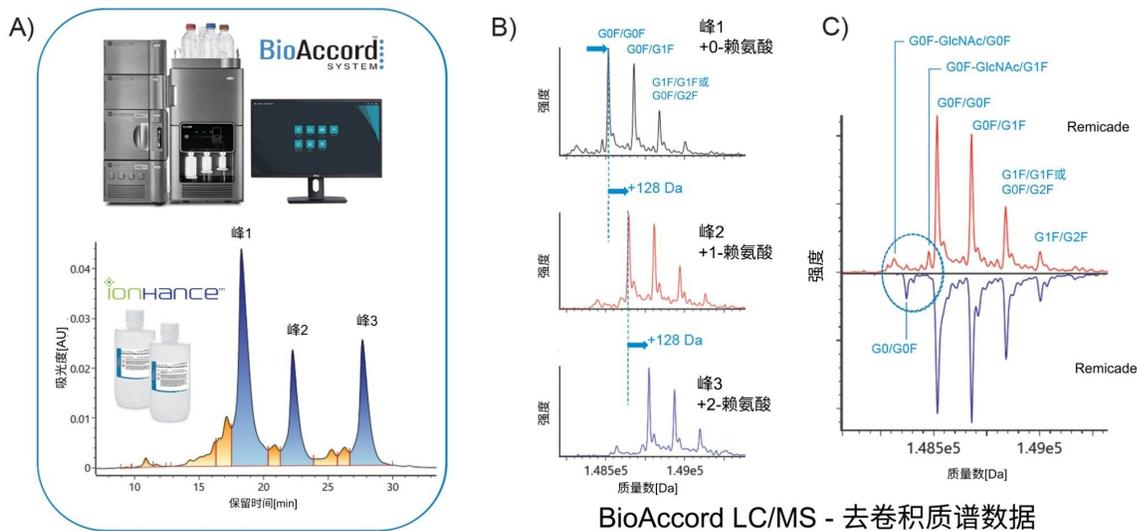
梯度 (20 mM MES缓冲液, pH 6.7)

时间	流速 (mL/min)	%A	%B	%C	%D	曲线
初始	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	初始
38.00	0.100	72.0	28.0	0.0	0.0	6
39.00	0.100	0.0	100.0	0.0	0.0	6
44.00	0.100	0.0	100.0	0.0	0.0	6
45.00	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	6
70.00	0.100	91.0	9.0	0.0	0.0	6

结果与讨论

基于UV的IEX电荷异构体分析常部署在后期开发阶段, 以协助工艺控制, 或作为生产环境中的监测分析以及稳定性和制剂研究中的筛选分析。当使用基于UV的分析时, 需要提前掌握电荷异构体的相关知识和/或熟悉经验实验, 以便从结果中做出有用的推论。图2A所示为mAb类治疗药物Remicade的UV色谱图示例, 该药品中有一个或两个C端赖氨酸残基(峰1-3)被截断。虽然赖氨酸残基所赋予的电荷使这些物质能够通过IEX色谱法分离, 但分析人员如果缺少背景知识或直接实验, 不一定清楚这两个峰所代表的截断物质。相比之下, 对该分析采用基于MS的方法将能够直接提供截断物质的质量数信息, 而无需额外的实验。

为证明这一点, 图2A所示的IEX分离在BioAccord LC-MS系统上使用IonHance CX-MS pH浓缩液进行, 在BioResolve SCX mAb色谱柱上使用0.3% B/min的梯度分离电荷异构体。通过串联使用光学(TUV)和MS (RDa)检测的方式对电荷异构体进行双重检测。三个主峰的MS谱图数据去卷积结果如图2B所示。在去卷积谱图中, 观察到各个峰的质量数漂移为+128 Da, 表明增加了赖氨酸残基。这一结果有助于按质量数直接鉴定截断物质, 其中峰1-3分别表示存在零个、一个和两个赖氨酸残基。基于MS的IEX分析不仅限于鉴定赖氨酸截断物质一项优势, 如图2C所示, 质量数信息还可用于辨别样品或药品之间的差异。本例使用UNIFI应用程序, 在相同的分离条件下对原研药Remicade及其生物类似药Renflexis进行了二元比较。如图2C所示, 去卷积谱图的比较表明存在谱图偏差(虚线圆圈)。进一步研究质谱数据的结果表明, 这些差异可归因于样品之间不同的糖基化模式。这些示例证明了MS对在工艺开发过程中快速评估电荷异构体的价值, 以及如何使用Waters IonHance CX-MS浓缩液等产品来促进此类工作流程。



BioAccord LC/MS - 去卷积质谱数据

图2. 电荷异构体的IEX-MS分析。

A) 在BioAccord系统上获得的Remicade的UV色谱图，分离过程在BioResolve SCX mAb色谱柱上使用IonHance CX-MS pH浓缩液进行，赖氨酸截断物质标记为峰1-3。

B) 在采集的峰1-3的去卷积质谱数据中观察到+128 Da的质量数漂移。

C) 原研药Remicade和生物类似药Renflexis的去卷积质谱数据的二元比较。经鉴定，质量数差异为完整mAb的糖基化水平差异。

本研究还评价了BioResolve SCX mAb色谱柱在支持下游活动方面的能力，这些下游活动可能部署使用高离子强度缓冲液的传统方法或旧方法。为完成此评价，我们使用配备光学检测器(UV)的ACQUITY Premier系统来代表在生产环境中部署的LC配置(图3A)，开展了一项比较研究。作为基于UV的方法，使用Waters BioResolve CX pH浓缩液代替IonHance MS pH浓缩液。虽然这两种浓缩液均能够提供线性pH梯度，但不同之处在于所用试剂的纯度以及它们的有效pH范围，二者分别配制用于MS (IonHance CX-MS)或UV (BioResolve CX)检测。考虑到这一点，在使用BioResolve CX pH浓缩液的IEX分离中，将梯度0.5% B/min修改后再使用。如图3B所示，BioResolve CX浓缩液可提供与IonHance MS-CX浓缩液(图2A)相同保真度的pH梯度，同样能够分离Remicade的电荷异构体。此外，结果具有高重现性(% RSD < 1.0)，表明BioResolve CX浓缩液稳定且能够提供适用于生产环境的稳定性。

最后，从BioResolve CX pH浓缩液分析中获得的2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)方法结果证明，BioResolve SCX mAb色谱柱能够支持基于盐的旧方法。如图3C所示，在使用盐梯度时，BioResolve SCX mAb色谱柱能够在电荷异构体分析谱图和重现性(%RSD < 1.0)方面取得相媲美的结果，证明该色谱柱能够在更传统的分离方法中稳定运行。这

些结果证明，BioResolve SCX mAb色谱柱与Waters IonHance CX-MS或BioResolve CX pH浓缩液相结合，提供了一个灵活的IEX平台，适合跨实验室部署，加快优化生物治疗药品的有效开发和生产方法。

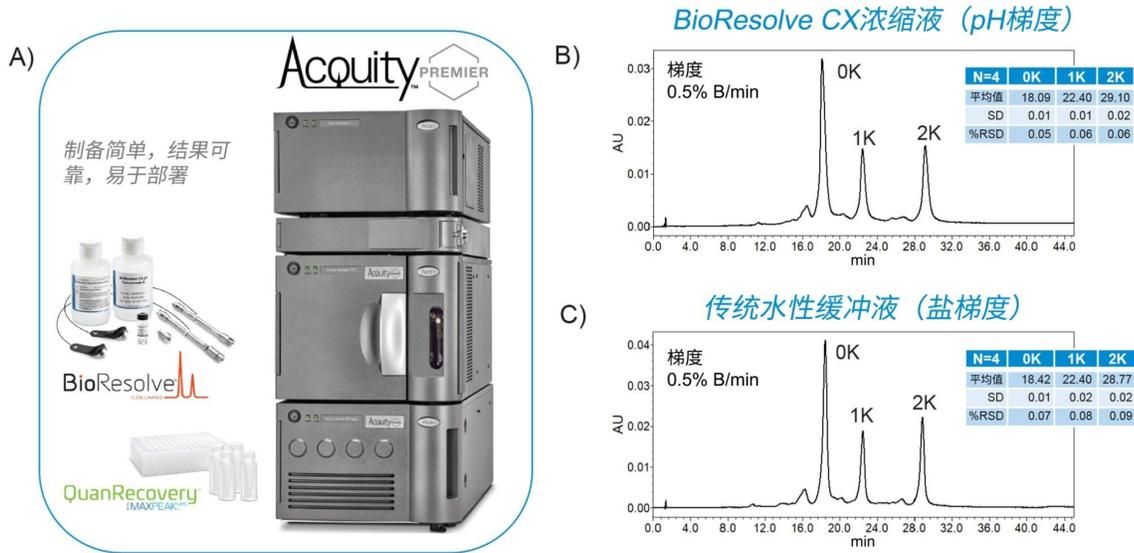


图3. IEX-UV比较研究。

A) 利用配备UV检测器的ACQUITY Premier系统采集IEX-UV数据，分离过程在BioResolve SCX mAb色谱柱上进行。

B) 使用BioResolve CX pH浓缩液所得到的IEX谱图与IEX-MS谱图（图2A）相当。

C) 当使用高离子强度梯度（MES缓冲液和200 mM NaCl）与pH梯度时，BioResolve SCX mAb色谱柱能够在分析谱图和重现性方面提供相媲美的结果。

结论

IEX技术具有非常高的价值，能够在生物药物开发和生产工艺中分离产品/工艺相关的电荷异构体。为充分发挥该技术的优势，沃特世扩展了产品组合，推出了创新的BioResolve SCX mAb色谱柱和CX pH浓缩液。本研究证明，将BioResolve SCX mAb色谱柱和IonHance CX-MS pH浓缩液搭配使用时，用户能够使用MS解析药品，以便在基于IEX的分析中直接鉴定电荷异构体。此外，BioResolve CX pH浓缩液专为基于UV的分析量身定制，使用户能够将这些方法迁移到下游，从而提高灵活性以支持与生物药物生产相关的开发和生产活动。

参考资料

1. Fekete *et al.* Ion-exchange Chromatography for the Characterization of Biopharmaceuticals. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015; 113:43–55.
2. Du *et al.* Chromatographic Analysis of the Acidic and Basic Species of Recombinant Monoclonal Antibodies. *mAbs*. 2012 Sep-Oct; 4(5):578–85.
3. Eyer B *et al.* How Similar Is Biosimilar? A Comparison of Infliximab Therapeutics in Regard to Charge Variant Profile and Antigen Binding Affinity. *Biotechnol J*. 2019 Apr; 14(4).
4. Jung *et al.* Physicochemical characterization of Remsima. *mAbs*. 2014; 6(5):1163–77.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

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

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

Empower 3方法验证管理器(MVM) <<https://www.waters.com/534328>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

720007706ZH, 2022年8月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#)

[隐私](#)

[商标](#)

[网站地图](#)

[招聘](#)

[Cookie](#)

[Cookie](#)

[设置](#)