

在产品确认和工艺监测中使用ACQUITY QDa质谱检测器通过单次分析进行多属性监测

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

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了一种使用ACQUITY QDa质谱检测器和合规色谱数据软件（如Empower）通过单次分析鉴别多项产品质量属性的概念性论证策略。

如果已经通过高分辨率MS表征分析确定了需要监测的质量属性，ACQUITY QDa质谱检测器可提供一种高效且经济的解决方案，在开发或QC环境中用于监测这些重要产品属性。本应用纪要证明，使用Empower软件的衍生通道和通道间计算功能，可通过单次采集对CDR肽、氧化肽、脱酰胺肽和糖肽进行鉴定、定量和报告。该方法要求提前确定每种抗体需要监测的属性，但可以轻松进行扩展，满足不同用户的具体需求。

优势

- 通过单次采集进行多属性监测，可应用于产品确认分析和翻译后修饰的常规筛查
- Empower软件为监测多项产品质量属性提供自动化且符合法规要求的数据采集、处理和报告工作流程

简介

在生物制药行业，使用基于单一LC-MS系统的分析方法监测多项产品质量属性(PQA)的策略应用越来越广泛。这个策略背后的理念是单一LC-MS方法可以同时评估产品的多项重要质量属性，相比之下，如果运行一组基于光学检测的色谱方法，将无法在分子水平评估产品属性。由于蛋白类治疗药物与小分子药物相比结构更加复杂，研究人员正在积极尝试将质谱(MS)技术从表征分析扩展到产品开发各个阶段，甚至包括质控分析¹。用更加精密的单一

LC-MS方法取代传统色谱方法，最终将有助于分析人员更好地掌握产品和工艺，而这是准备质量源于设计(QbD)法规申报材料的必要前提。监管机构鼓励实施QbD，因为这是一种具有主动性的系统化方案，能够提高产品质量和保障患者安全^{2,3}。

最近有研究人员使用ACQUITY QDa质谱检测器开发并验证了一种用于监测单克隆抗体(mAb)互补决定区(CDR)肽类的鉴定方法⁴。ACQUITY QDa质谱检测器是一种经济有效的解决方案，可将质谱数据引入常规分析。本研究以上述研究为基础，认为有必要使用ACQUITY QDa质谱检测器开发一种单一检测方法用于产品确认分析和监测多种经过预表征的翻译后修饰(PTM)。为了与已发表的研究结果保持一致，本研究将曲妥珠单抗样品和沃特世完整单抗标准品的结果与曲妥珠单抗参比标准品的CDR肽进行比对，根据保留时间和质量数来验证方法特异性。由于药品的关键质量属性(CQA)需要单独确定，因此本研究的目的只是进行概念性论证，旨在提出一种使用ACQUITY QDa质谱检测器和合规色谱数据软件（如Empower）通过单次分析鉴别多项质量属性的策略。

实验

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class Bio
检测器:	ACQUITY UPLC TUV ACQUITY QDa质谱检测器 (Performance版本)
吸收波长:	215 nm
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH C ₁₈ 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm x 100 mm肽分析专用柱
柱温:	65 °C
流动相A:	水 + 0.1% (v/v) 甲酸

流动相B: 乙腈 + 0.1% (v/v)甲酸

样品温度: 10 °C

进样体积: 10 µL

梯度

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	%C	%D
初始	0.2	97	3	0	0
3	0.2	97	3	0	0
120	0.2	67	33	0	0
127	0.2	20	80	0	0
130	0.2	20	80	0	0
131	0.2	97	3	0	0
150	0.2	97	3	0	0

检测器设置

采集速率: 2 Hz

质量范围: 350-1250 Da

电离模式: ESI+, 棒状图

锥孔电压：	10 V
毛细管电压：	1.5 kV
探头温度：	500 °C

数据管理

Empower 3 CDS, SR2

结果与讨论

使用提取离子流色谱图监测多项属性以确认鉴定结果

抗体的可变区含有特异性抗体独有的CDR肽，因此我们可以利用这些肽来鉴定抗体。为了评估ACQUITY QDa质谱检测器监测多项属性的能力，我们首先采集曲妥珠单抗的肽图。制备经过还原和烷基化的曲妥珠单抗胰蛋白酶酶解物，最终浓度约0.5 mg/mL，无需进一步稀释，直接进样分析。采用前文所述的肽图分析方法和ACQUITY QDa质谱检测器采集数据，检测器设置为全扫描模式，以便获取提取离子流色谱图(XIC)用于确定目标属性。图1所示为光谱图和对应的质谱图，由图可见二者之间有很强的相关性。该数据表明，ACQUITY QDa质谱检测器能够有效地将质量数测定与基于LC-UV的肽图分析相结合。

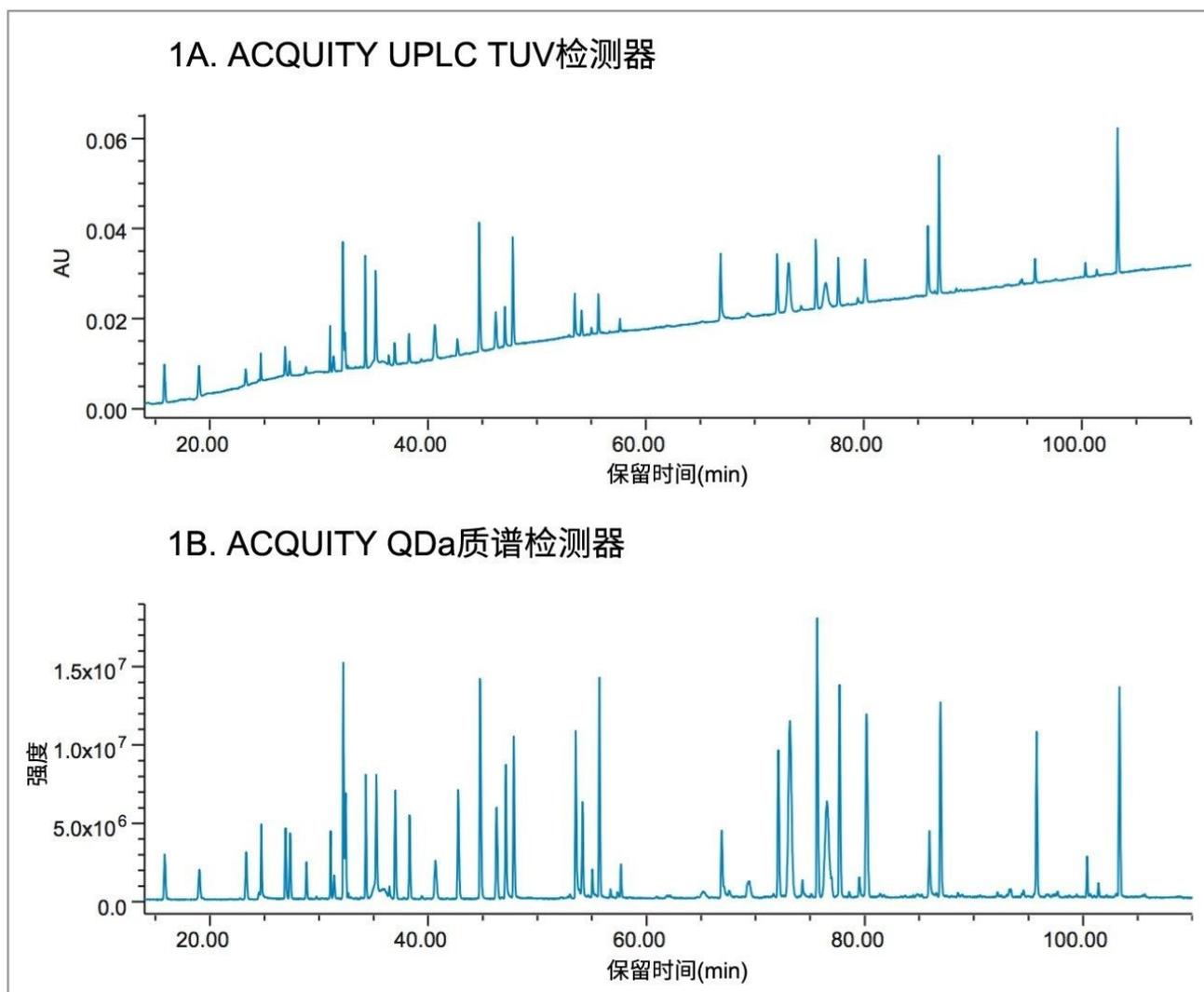
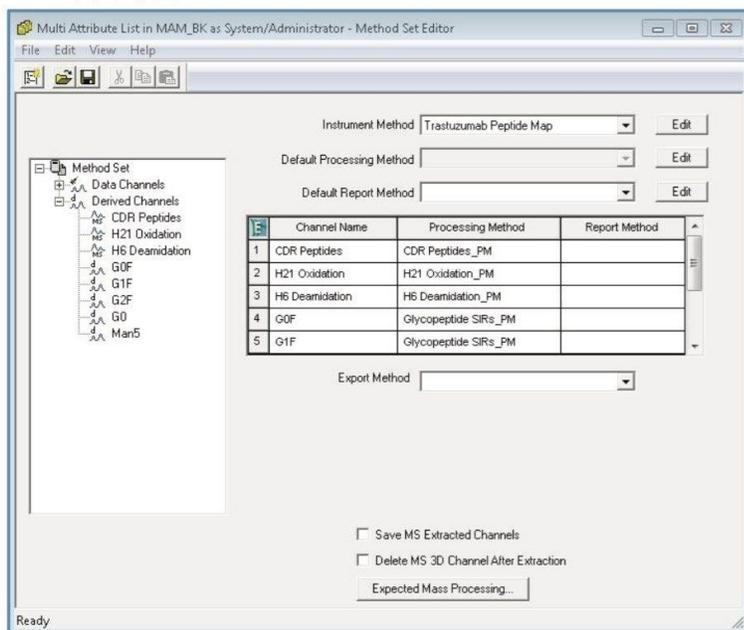


图1.肽图检测。1A)使用光学检测器得到的曲妥珠单抗胰蛋白酶酶解物谱图。1B)对应的ACQUITY QDa数据。

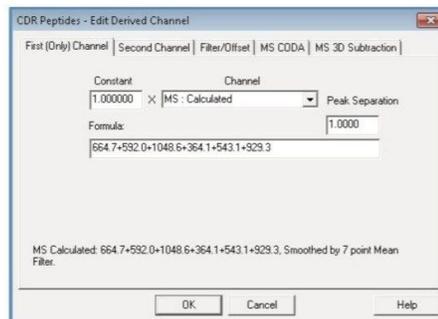
使用XIC提取每种CDR肽的 m/z ，根据CDR肽来确认给定抗体。使用衍生通道可避免对各个XIC通道进行手动积分。已有文献介绍了创建衍生通道的方法⁵。简而言之，即创建包含衍生通道的方法组，衍生通道中包含每种CDR肽的 m/z 。这样基本上能够将每种目标肽的 m/z 提取到单个通道中。将衍生通道与设置了相关保留时间和组分标签的处理方法相关联，就能得到包含每种CDR肽的单个通道，之后即可根据质量数和保留时间鉴定这些CDR肽。图2A所示为Empower屏幕截图，该图展示了如何创建包含衍生通道的方法组，用户可以为每项目标属性创建新的衍生通道。对于CDR肽，在衍生通道的Formula（公式）字段输入六种CDR肽的质量数，如图2B所示。在本例中，以单电荷态作为主电荷态用于鉴定每种CDR肽，如有必要，用户也可以加总所有其他电荷。

2A. 方法组



2B. 衍生通道

CDR肽



脱酰胺肽

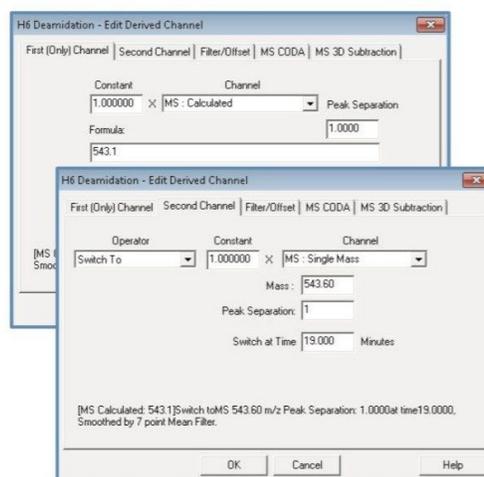


图2. Empower 屏幕截图。2A) 包含衍生通道的方法组，用于确定样品是否具有先前已表征的属性。在本例中，目标属性是 CDR 肽、一种氧化肽、一种脱酰胺肽以及糖肽。每项属性都有一个与之关联的独立处理方法。使用 XIC 进行定量的属性可以采用专为该属性设置的单个衍生通道进行监测；使用 SIR 进行定量的属性必须采用多个独立通道进行监测，并通过自定义计算进行定量。2B) 衍生通道示例。将每种肽的 m/z 输入 Formula (公式) 字段即可创建 CDR 肽的衍生通道。本例监测六种 CDR 肽。可以为脱酰胺肽输入切换时间，从而在设定时间点从当前 m/z 切换至其他 m/z ，这能避免天然肽和修饰肽因质量数差异过小而发生 XIC 信号重叠。

表1列出了每种 CDR 肽的平均质量数以及本研究使用的 m/z 计算值。此表还包含要监测的其他属性的质量信息（如下文所述）。衍生通道的色谱图如图3A所示。在该图中，六种 CDR 肽中每一种肽的 XIC 的都可以明确识别，因此我们可以成功确认样品。

使用提取离子流色谱图监测多项属性以进行工艺监测

类似方法可用于脱酰胺或氧化等化学修饰的定量分析。生产过程中的工艺改变或储存条件改变可能会影响修饰速率，进而影响抗体活性或抗原结合⁶。在本例中，我们考虑了天冬酰胺脱酰胺化和蛋氨酸氧化。同样地，我们假设这些修饰已使用高分辨率MS进行了预表征，并确定为关键质量属性。

由于氧化修饰造成的质量数差异较大，我们可通过类似于CDR肽的方式，使用衍生通道来追踪这种修饰。分析得到的XIC如图3B所示。然而，经脱酰胺修饰的肽与天然肽之间的质量数差异要小得多，因此必须采用其他方式处理数据，才能可靠地测定各种脱酰胺肽的相对丰度。在本例中，由于各峰之间实现了色谱分离，因此可以设置一个衍生通道，使其在用户设定的时间点从一个质量数计算值切换到另一质量数。具体设置过程如图2B所示。由Empower屏幕截图可看出，第19分钟时，要监测的质量数从 $m/z = 543.1$ Da（天然肽， $z = 2$ ）切换为 543.6 Da（脱酰胺肽， $z = 2$ ）。使用第二个通道可避免天然肽和脱酰胺肽的信号重叠。天然肽和脱酰胺肽的XIC如图3C所示。

肽	肽类别/修饰	平均质量数 (Da)	电荷态	计算值 (m/z)
L3	CDR	1991.17	$[M+3H]^{+3}$	664.7
L5	CDR	1773.04	$[M+3H]^{+3}$	592.0
L7	CDR	4190.48	$[M+4H]^{+4}$	1048.6
H3	CDR	1089.21	$[M+3H]^{+3}$	364.1
H6	CDR	1084.18	$[M+2H]^{+2}$	543.1
H6	脱酰胺	1085.17	$[M+2H]^{+2}$	543.6
H12	CDR	2785.01	$[M+3H]^{+3}$	929.3
H21	天然肽	834.43	$[M+2H]^{+2}$	418.2
H21	氧化	850.42	$[M+2H]^{+2}$	426.2
H25	G0F	2634.53	$[M+3H]^{+3}$	879.2
H25	G1F	2796.67	$[M+3H]^{+3}$	933.2
H25	G2F	2958.81	$[M+3H]^{+3}$	987.3
H25	G0	2488.39	$[M+3H]^{+3}$	830.5
H25	G1	2650.53	$[M+3H]^{+3}$	884.5
H25	Man5	2406.28	$[M+3H]^{+3}$	803.1

表1.分析报告的属性对应的肽信息

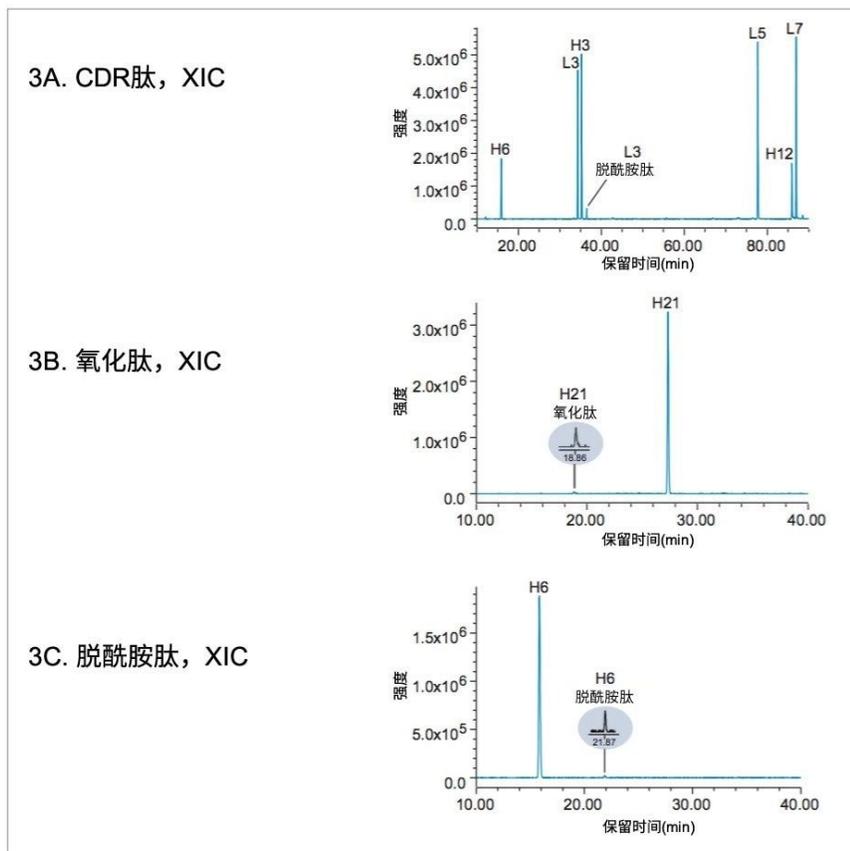


图3.用于鉴定目标属性的XIC。峰标签“H”和“L”分别指重链和轻链肽。3 A)曲妥珠单抗独有的CDR肽。3B)天然肽及其氧化肽。3C)天然肽及其脱酰胺肽。注意，天然肽H6也是CDR肽。这种肽既可用于鉴定，也可与其脱酰胺形式共同用于定量修饰百分比（与CDR通道无关）。图3B.和3C.中的插图分别为氧化肽和脱酰胺肽放大10倍之后的图。信噪比远高于可靠定量这些低浓度修饰所需的最低信噪比。

使用选择离子监测模式监测多项属性以进行工艺监测

如果需要以更高的特异性和灵敏度进行峰监测，可使用选择离子监测(SIR)模式。在SIR模式下，系统将筛选单个 m/z 离子并将其传输至检测器。之前的研究为了证明SIR的适用性，已经确定了五种最高丰度糖肽（G0F、G1F、G2F、G0和Man5）的主电荷态。图4为五个SIR通道的叠加色谱图。

糖肽监测分析需要利用SIR灵敏度更高的优势实现准确定量。由于每个SIR都单独关联了自己的通道，我们可采用自定义计算来计算每种糖肽的相对丰度。

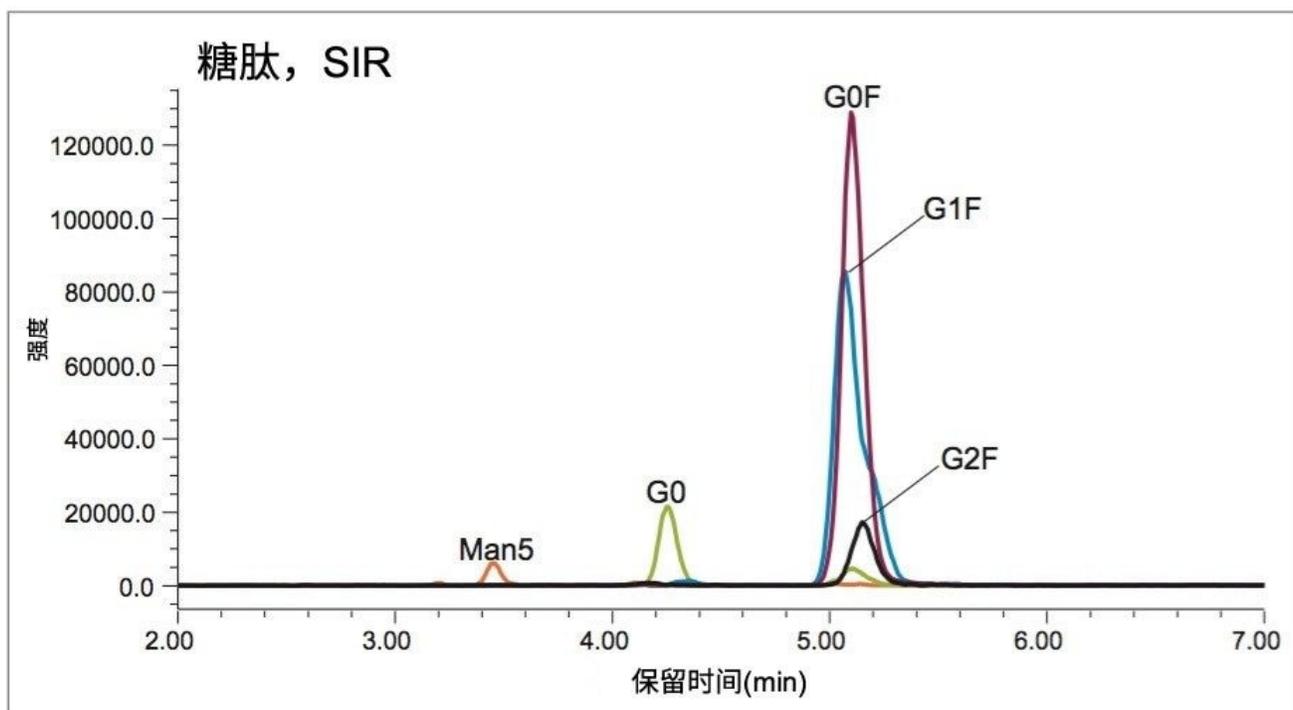
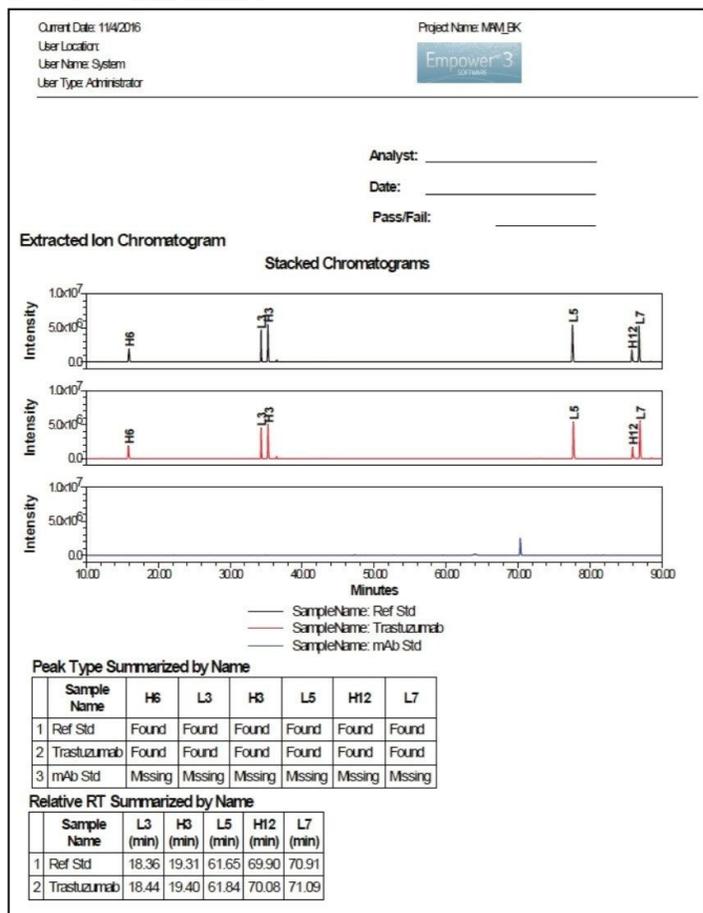


图4.五个SIR通道的叠加色谱图，使用该谱图来测定五种糖肽的相对丰度。由于每幅SIR都是由单独的通道采集的，我们可采用自定义计算来自动测定每种糖肽的相对丰度。

使用Empower软件自动报告多项属性

前文介绍了如何创建包含衍生通道的方法，通过为每项目标属性关联一个独立处理方法进行方法监测。同一方法组还可关联至每项目标属性的报告方法，帮助进一步提升监测过程的自动化程度。如果用户希望将所有结果都导入一份报告，Empower也具有该功能。图5所示为Empower报告的屏幕截图，该报告为监测前文所述各项属性生成的报告。

5A. CDR肽的报告



5B. 其他肽的报告

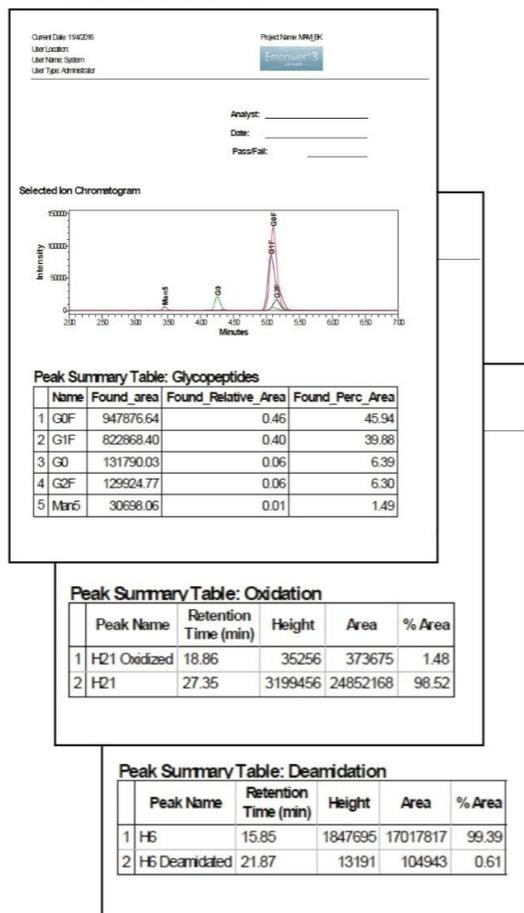


图5.Empower报告。5A)参比标准品、曲妥珠单抗样品与完整单抗标准品（阴性对照）对比。峰表汇总了是否检测到目标峰，以及每种CDR肽的相对保留时间。以H6代替内标用于计算相对保留时间。5B)曲妥珠单抗样品中其他肽的报告。报告中的各项是通过为特定属性设计处理方法和衍生通道得到的结果。报告糖肽的相对丰度时，使用Empower的自定义计算功能定义“Found_area”、“Found_Relative_Area”和“Found_Perc_Area”，创建这些字段之后，软件将计算峰与峰相互之间的相对峰面积，以这种方式报告单个通道的峰面积。

结论

如果已经通过高分辨率MS表征分析确定了需要监测的质量属性，ACQUITY QDa质谱检测器可提供一种高效且经济

的解决方案，在开发或QC环境中用于监测这些重要产品属性。本应用纪要证明，使用Empower软件的衍生通道和通道间计算功能，可通过单次采集对CDR肽、氧化肽、脱酰胺肽和糖肽进行鉴定、定量和报告。该方法要求提前确定每种抗体需要监测的属性，但可以轻松进行扩展，满足不同用户的具体需求。

参考资料

1. Arnaud, C. H. Mass Spec Weighs in on Protein Therapeutics. *C&EN*. 2016; 94(22): 30–34.
2. FDA, Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. 2015.
3. ICH, Q8-Q12. (accessed November 2016).
4. Zhang, J. et al. Development and Validation of a Peptide Mapping Method for the Characterization of Adalimumab with QDa Detector. *Chromatographia*. 2016; 79(7): 395-403.
5. Birdsall, R. E., McCarthy, S. M. Increasing Specificity and Sensitivity in Routine Peptide Analyses Using Mass Detection with the ACQUITY QDa Detector. 2015; [720005377](#).
6. Habegger, M. et al. Assessment of Chemical Modifications of Sites in the CDRs of Recombinant Antibodies: Susceptibility vs. Functionality of Critical Quality Attributes. *mAbs*. 2014; 6(2):327–339.

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

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

Empower色谱数据软件 <<https://www.waters.com/10190669>>

720005919ZH, 2016年2月

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

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

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)