

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环境中用于完整分子量分析的性能

Henry Shion, Jonathan Pugh, Jill Lord, Yun Alelyunas, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

本应用简报展示了沃特世BioAccord系统在完整mAb糖基分析中的系统间重现性。

优势

使用BioAccord系统平台进行常规mAb质量数确认的系统间与系统内比较。

简介

2017年，FDA发布了一篇文章，名为“A Retrospective Evaluation of the Use of Mass Spectrometry in FDA Biologics License Applications”（《回顾性评价质谱分析法在FDA生物制剂许可申请中的应用》）¹，文中重点指出，自2000年以来，质谱分析法在蛋白质类生物治疗药物表征中的应用越来越广泛。近年来，整个制药行业都在大力推广液相色谱-高分辨率质谱法(LC-MS)在开发后期和QC环境中的应用。然而，由于LC-MS操作复杂，只有

技能娴熟的科学家才能保证仪器生成和采集到有效的数据。此外，不同仪器采集到的LC-MS数据之间可能会有差异，要想在工艺开发阶段和QC实验室内成功开发出基于MS的分析方法（例如多属性监测方法），可谓挑战重重。因此，我们迫切需要既操作简单、稳定可靠，又适用于生物治疗药物分子常规分析的仪器系统。

BioAccord系统的推出是满足行业需求的第一步。如先前发布的应用纪要和技术简报所述²⁻⁹，BioAccord系统满足很多方面的需求。在本研究中，我们采用精心设计的实验，重点研究BioAccord系统的重现性。研究分为两部分：完整分子量分析和肽图分析/监测。本技术简报重点介绍第一部分：完整分子量分析。



结果与讨论

BioAccord系统的物理构造为配备光学检测器（TUV或FLR）的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与ACQUITY RDa检测器（紧凑型飞行时间质谱检测器）在线联用。该系统在UNIFI科学信息系统平台上运行，提供精简的工作流程解决方案，可以自动采集、处理和报告数据（包括自动计算相对丰度）。该系统专为受管制和非管制实验室进行常规生物制药分析设计。

使用RPLC-MS的完整分子量分析可以简便快速地获得mAb主要糖型的分子量和相对丰度。本研究中的所有完整分子量分析均使用源自NIST mAb参比物质（部件号：[186009152](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009125-humanized-mab-mass-check-standard.html>) 的沃特世人源mAb质量数检查标准品进行。向80 µg完整NIST mAb中加入Milli-Q水溶液(400 µL), 制成0.2 µg/µL溶液。进样0.8 µg进行分析。在80 °C下使用ACQUITY UPLC BEH C₄, 1.7 µm, 2.1 mm x 50 mm色谱柱 (部件号: [186004495 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186004495-acquity-uplc-protein-beh-c4-column-300a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186004495-acquity-uplc-protein-beh-c4-column-300a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html)))。流动相A为含0.1%甲酸的Milli-Q水溶液, 流动相B为含0.1%甲酸的乙腈溶液。1 min~3.7 min以0.4 mL/min运行从95%流动相A降至15%流动相A的线性梯度, 总运行时间为7 min。RDa检测器在正离子全扫描模式下(2 Hz)运行, 质量范围为400~7000 *m/z*。锥孔电压设置为70 V, 毛细管电压设置为1.5 KV, 脱溶剂气温度保持在550 °C。使用阈值为≤25 ppm的质量误差确认所有实验中完整单克隆抗体的糖基化形式 (表1总结了质量精度)。

结果

1. 系统间比较

图1显示了完整分子量的系统间重现性, 重点关注主要糖型的相对百分比%RSD。该实验在BioAccord系统上连续运行5.5天 (1098次进样)。五种主要糖基化形式 (G0F/G0F、G0F/G1F、G1F/G1F、G1F/G2F和G2F/G2F) 的相对丰度是在UNIFI中使用MaxEnt 1电荷去卷积的自动数据处理计算的。电荷去卷积谱图与五种糖型相对丰度的%RSD趋势图如图1所示。结果汇总表显示, 五种主要成分的%RSD约为2%, 表明BioAccord系统可以在稳定一致的离子信号下连续运行长达一周的时间, 期间无需重新校准或调谐。

Component name	Mean	% RSD (%)	Std dev	Sum	Minimum	Maximum	Count
1 NIST mAb Pyroglutamic Acid Q N-TERM (2), Glycosylation G0F N (1), Glycosylation G1F N (1)	32.7	0.81	0.3	35852.2	31.8	33.0	1098
2 NIST mAb Pyroglutamic Acid Q N-TERM (2), Glycosylation G1F N (2)	29.7	0.42	0.1	32573.4	29.3	30.1	1098
3 NIST mAb Pyroglutamic Acid Q N-TERM (2), Glycosylation G0F N (2)	18.2	0.68	0.1	19951.5	17.8	18.4	1098
4 NIST mAb Pyroglutamic Acid Q N-TERM (2), Glycosylation G1F N (1), Glycosylation G2F N (1)	14.1	1.25	0.2	15521.7	13.8	14.8	1098
5 NIST mAb Pyroglutamic Acid Q N-TERM (2), Glycosylation G2F N (2)	5.4	2.02	0.1	5901.2	5.1	5.8	1098

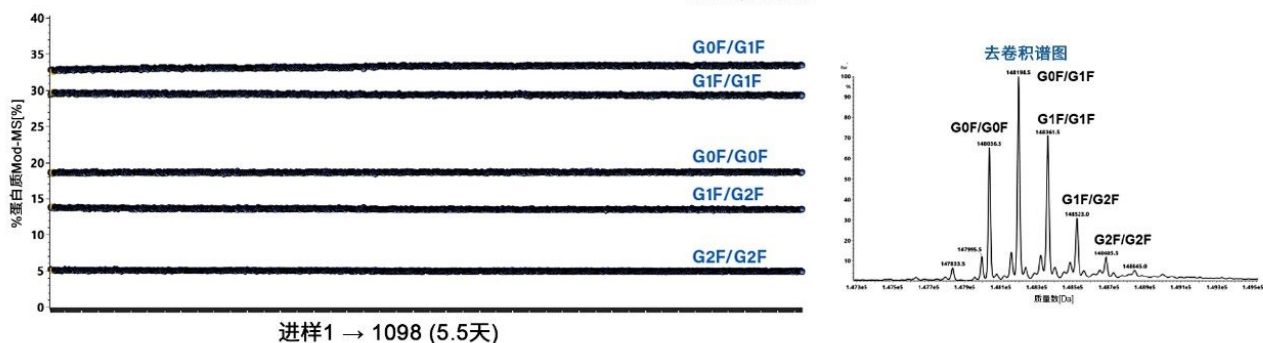


图1. 谱图质量和数据一致性是完整分子量分析成功的关键因素。此处显示了沃特世人源mAb质量数检查标准品(NIST mAb)主要糖型的相对定量结果。在1098次进样中，前五种糖型的相对百分比能够保持一致。 $\%RSD \leq 2.0\%$ ，图中以红色突出显示。

第二项实验展示了其中一套系统在三个月内执行完整分子量分析的重现性。这项研究不是在系统上连续进行实验，而是在第1、2、3、5、8、14和90天分别进行10次进样。然后在汇总趋势图中绘制出同样五种糖基化形式的相对丰度。实验结果（数据未显示）表明，五种主要糖型相对丰度的 $\%RSD$ 小于8.0%，证明BioAccord系统可以在长时间内（本例中为三个月）保持高度稳定性和耐用性。

2. 系统内完整分子量分析研究

评估完整分子量分析的系统间重现性后，我们开展了系统内重现性研究。在这项研究中，我们在六套不同的BioAccord系统上执行了相同的实验，每套系统上进行了10次进样（总共八次单独的实验）。结果如图2所示（系统1和系统6具有重复的数据集）。实验结果表明，五种主要糖型相对丰度的 $\%RSD$ 小于6.0%，在结果汇总表中以红色突出显示，证明这六套BioAccord系统对于完整分子量分析具有出色的系统内重现性。

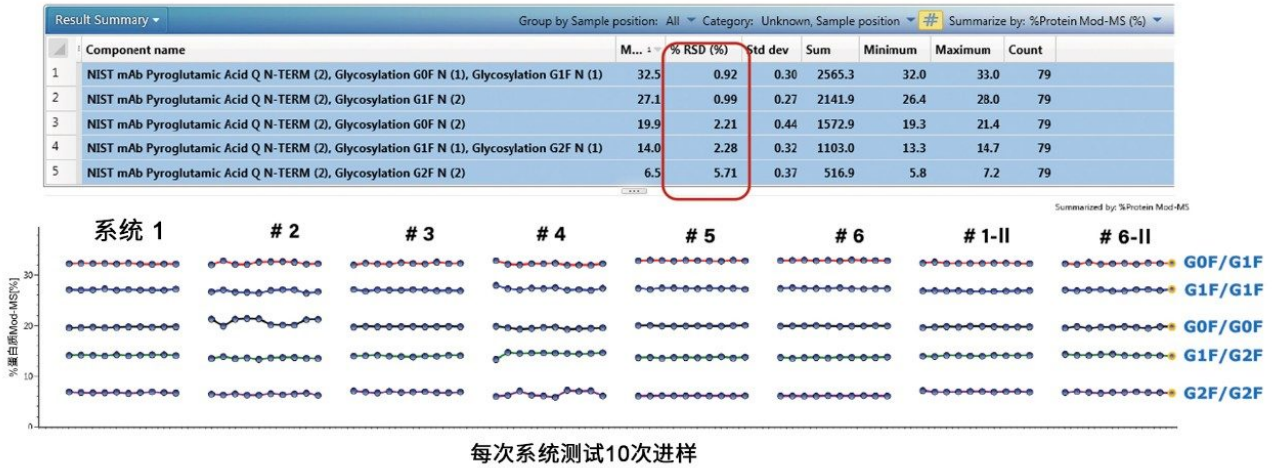


图2.六套不同的BioAccord系统上NIST mAb参比标准品五种主要糖型的相对定量结果。完整NIST mAb样品的各种糖型在六套BioAccord系统上获得一致的相对百分比。%RSD小于6.0%，在结果汇总表中以红色突出显示。

表1总结了主要糖型质量精度和相对丰度%RSD的实验结果，与本技术简报所述一致。

研究类型	质量精度	% RSD
系统间研究 (1周)	小于20 ppm	小于3.0%
系统间研究 (3个月)	小于25 ppm	小于8.0%
系统内研究 (6套系统)	小于25 ppm	小于6.0%

表1.完整分子量分析的重现性评价

结论

系统间研究表明，BioAccord系统在糖型分析方面具有良好的重现性，不仅可以连续运行5天半，还可以进行时间跨度长达90天的研究。系统内研究的实验结果表明，六套不同的BioAccord系统具有高度一致性。五种主要糖型

的相对丰度小于6.0% RSD。

BioAccord系统间和系统内优异的重现性数据增加了后期开发和QC实验室部署MS分析的信心。

参考资料

1. Rogstad, S.; *et al.* A Retrospective Evaluation of the use of Mass Spectrometry in FDA Biologics License Applications. *J Am Soc Mass Spectrometry*. May, 2007. 28 (5), 786-794. doi: 10.1007/s13361-016-1531-9.
2. Shion, H. 等人. 在数据完整性环境下进行可重现的完整分子量例行分析. 2019. 沃特世应用纪要. [720006472](#).
3. 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. [720006466](#).
4. 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. [720006474](#).
5. 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. [720006529](#).
6. 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. [720006545](#).
7. 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. [720006570](#).
8. 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. [720006602](#).
9. 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. [720006672](#).

特色产品

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

[ACQUITY RDa检测器 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027)

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

720006722ZH, 2020年1月

©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