

建立适用于开发、工艺监测和QC放行且稳定耐用的mAb亚基产品质量属性监测方法

Samantha Ippoliti, Ying Qing Yu, Nilini Ranbaduge, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了一种亚基MAM方法，用于补充生物药物开发中的肽分析MAM方法。典型的肽图分析MAM方法为属性分析提供了更具针对性的功能，但需要应对样品前处理操作繁琐、运行时间较长（通量较低）和数据分析复杂等挑战。基于亚基的MAM方法可解决上述所有挑战，同时能够监测各种生物治疗产品质量属性。

优势

- 样品前处理更快速、更简单，方法引起的干扰更少
 - LC-MS数据采集和处理时间更短
 - 与完整mAb分析相比提供了更多信息
 - 采用符合法规要求的waters_connect信息学工具，有利于精简自动化数据分析流程
-

简介

原研药和生物类似药的生物制药开发商都面临越来越大的竞争压力，他们都希望自家产品更快进入市场、成本降低并保持高品质声誉。因此需要在整个药物开发过程中表征并监测关键质量属性(CQA)，并逐渐将这些分析方法扩展至工艺监测和批次放行阶段。为此，CQA监测分析方法必须尽可能稳定耐用、灵敏且快速。

LC-MS肽图分析多属性方法(MAM)与过去仅依靠光学检测的方法相比可提供更丰富的信息，因此广受人们青睐。但是，许多使用该方法的实验室发现，样品前处理过程可能引入由方法引起的干扰，并且存在重现性不佳的问题。另外，数据采集时间通常很长，限制了样品通量，并导致数据集可能相当复杂。近年来，生物治疗药物开发商开始转向mAb亚基MAM分析，希望更快、更稳定地得到关键信息。例如，Dong等人建立了一种针对mAb自动纯化、亚基酶解和LC-MS分析的方法，用于监测细胞培养过程¹。通过该工作流程，他们能够近乎实时地监测糖基化谱图和非酶促赖氨酸糖化，并调整细胞培养过程。Sokolowska等人使用类似的方法发现Fc亚基的蛋氨酸氧化是一项关键产品属性，并通过光和化学降解研究对其进行监测²。这种符合GMP要求的Xevo QTof LC-MS方法已通过验证，适用于商业产品放行中的质量控制和稳定性研究³。

本研究展示了在另外两套基于Tof的质谱系统（BioAccord和Vion）上实施的亚基MAM方法，用于监测抗体的糖基化、糖化、氧化和序列变体。该方法证明，亚基分析是基于Tof的LC-MS平台的核心功能，当部署在符合法规要求的信息学平台（例如UNIFI/waters_connect）上时，可为生物制药企业的mAb开发、生产以及质控部门提供支持。

实验

样品描述

在37 °C下，将50 µg抗体样品与50单位的Fabricator (IdeS)酶(Genovis)置于酶解缓冲液(25 mM NaCl, 25 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)中温育1 h，最终浓度为1 mg/mL。然后加入DTT（二硫苏糖醇），使最终mAb浓度为5 mM，在37 °C下温育30 min以还原部分链间二硫键。对于去糖基化样品，进行IdeS酶解和还原步骤之前，在37 °C下将50 µg抗体样品用PNGaseF*温育，最终mAb浓度为1 mg/mL。

*对于50 µg样品，使用RapiFluor-MS试剂盒中的4 µL PNGaseF，根据需要放大⁴。临分析前将所有样品用0.1%的甲酸水溶液稀释至0.1 mg/mL。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class
检测器:	ACQUITY UPLC TUV
样品瓶:	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery 12 × 32 mm螺纹口样品瓶, 300 μL (部件号: 186009186)
色谱柱:	Waters ACQUITY BEH C ₄ 300 Å, 1.7 μm, 2.1 × 50 mm (部件号: 186004495)
柱温:	80 °C
样品温度:	6 °C
进样:	0.5 μg经IdeS酶解的mAb (0.1 mg/mL样品, 进样 5 μL)
流速:	0.25 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.25	80	20	6
10.0	0.25	60	40	6
10.3	0.25	20	80	6
11.3	0.25	20	80	6
11.6	0.25	80	20	6
15.0	0.25	80	20	6

质谱条件

质谱系统	ACQUITY RDa	Vion IMS QTof
电离模式	正	正
采集范围	400–7000 <i>m/z</i> (质量数上限)	500–4000 <i>m/z</i>
毛细管电压	1.5 kV	2.75 kV
锥孔电压	50 V	70 V
脱溶剂气温度	550 °C	600 °C
源温度	N/A	125 °C

数据管理

使用UNIFI v1.9.4完整蛋白分析工作流程采集、处理数据并生成报告。

结果与讨论

多属性方法在对候选生物药物进行直接、选择性产品属性分析方面表现出巨大的潜力。本文介绍了一种快速高效的亚基MAM方法，该方法使用IdeS酶在铰链区裂解mAb，然后还原链间二硫键以生成质量数约25 kD的游离轻链(

LC)、Fd和Fc亚基（见图1）。运行15 min的液相色谱方法，对游离亚基进行反相(RP)色谱分析，用质谱法分析所分离的峰，进行定性和相对定量分析。

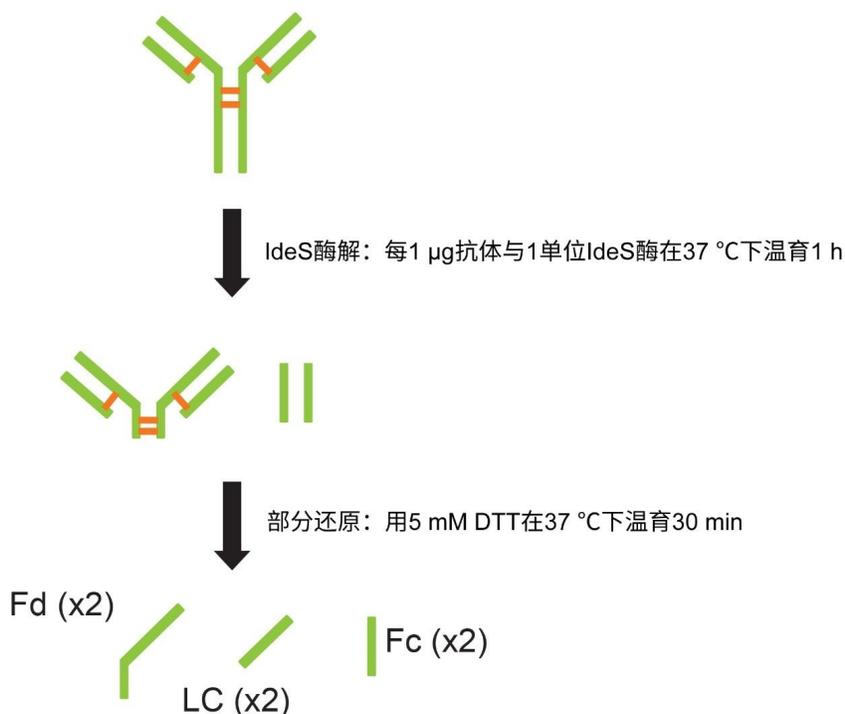


图1.mAb亚基MAM方法使用的样品前处理过程，包括IdeS酶解和部分还原

工艺监测、质量控制放行检测以及在受法规监管的实验室内实施其他研究所用的MAM方法必须稳定耐用且可重现⁵。为评估BioAccord系统用于亚基属性分析的稳定性，在两套系统上将IdeS酶解的曲妥珠单抗样品重复进样分析三次，并在每套系统上评估了三根相同的色谱柱。使用MaxEnt1自动对采集的三个亚基峰（Fd、Fc和LC）质谱图分别进行去卷积，并在自动化UNIFI数据处理过程中将所得质量数与曲妥珠单抗进行匹配（使用10 ppm的质量精度阈值）。通过去卷积质谱峰的积分MS响应计算糖基化和糖化物质的相对百分比。测得的LC和Fd糖化率分别为1.6%和1.2%，所有进样的RSD均明显低于8% (n = 18)。Fc N-糖基化物质的丰度范围为0.1%~40%（如图2所示），相对丰度超过0.5%的所有Fc糖基化物质在所有进样中的丰度变化均小于5% RSD。对于生物工艺或产品放行过程中支持CQA监测的分析而言，这些评估结果完全符合典型的预期。证明该方法的初步稳定性后，将其应用于三项案例研究，这些研究与通常用于支持可开发性、克隆选择和制剂的分析相似。

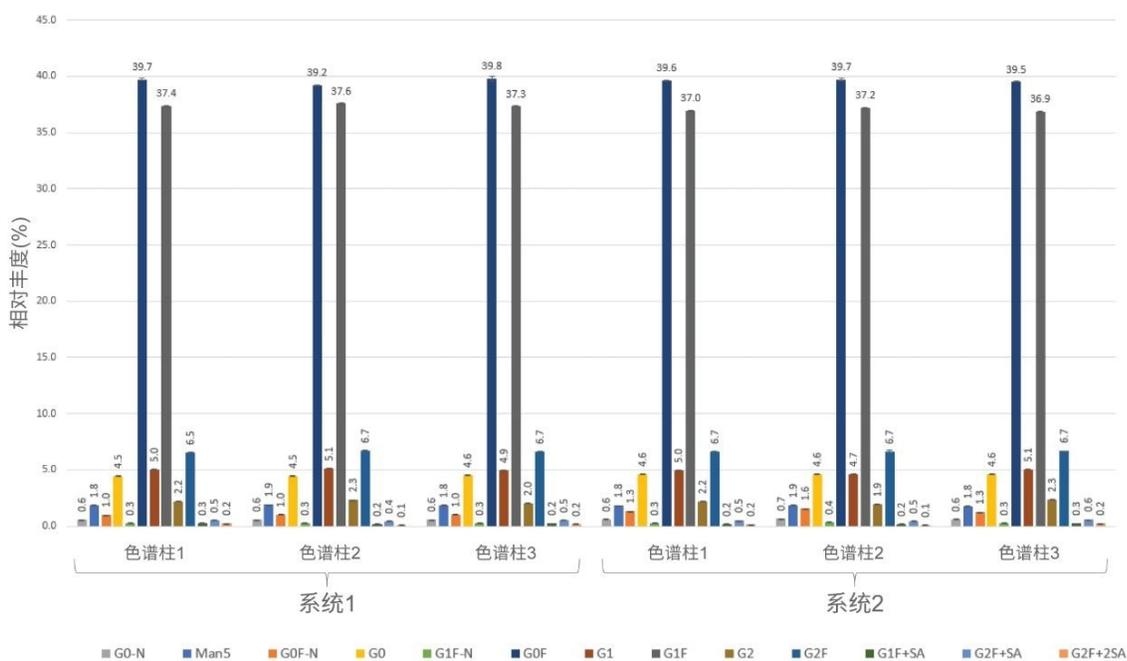


图2.在两套BioAccord系统上通过亚基MAM方法分析曲妥珠单抗Fc N-糖基化物质，每套系统配备三根色谱柱，每根色谱柱重复进样三次。对于相对丰度高于0.5%的所有物质，%RSD小于5%。

第一项研究与克隆筛选过程中可能遇到的可开发性问题与细胞培养过程监测中的典型问题密切相关。我们将该亚基方法应用于西妥昔单抗的糖基分析，这种抗体除在重链上具有典型IgG1 Fc N-糖基化位点以外，在重链的Fd区也具有N-糖基化位点（图3）。过去，N-糖分析通过分析游离寡糖进行，例如使用2AB标记的HILIC-FLR分析系统或使用RapiFluor-MS等MS增强标记的HILIC-FLR-MS⁴。如果将游离寡糖分析方法用于西妥昔单抗，所有存在的N-糖都将获得完整谱图，但无法特异性分析它们所占据的位点。这些信息非常重要，因为Fd和Fc糖基化对抗原识别、免疫原性和血清半衰期具有不同的影响⁶。将IdeS酶解的西妥昔单抗样品重复分析三次，所得Fc和Fd的结果如图4所示。与典型的Fc N-糖基化谱图（左图）相比，观察到Fd N-糖基化物质（右图）具有更复杂的支化结构。在这些分析中，所有Fc和Fd糖基化物质的相对丰度%RSD计算值均小于3%。这些观察结果与之前发表的研究结果一致，该研究对西妥昔单抗的IdeS亚基酶解物进行分离、收集馏分，并对分离出的Fc和Fd分别进行了游离N-糖分析⁷。使用亚基MAM方法无需对Fd和Fc进行分馏以定位与各结构域相关的糖型。使用该亚基MAM方法的另一项优势在于，可以在同一分析中同时监测Fc C端赖氨酸变体及其他CQA。

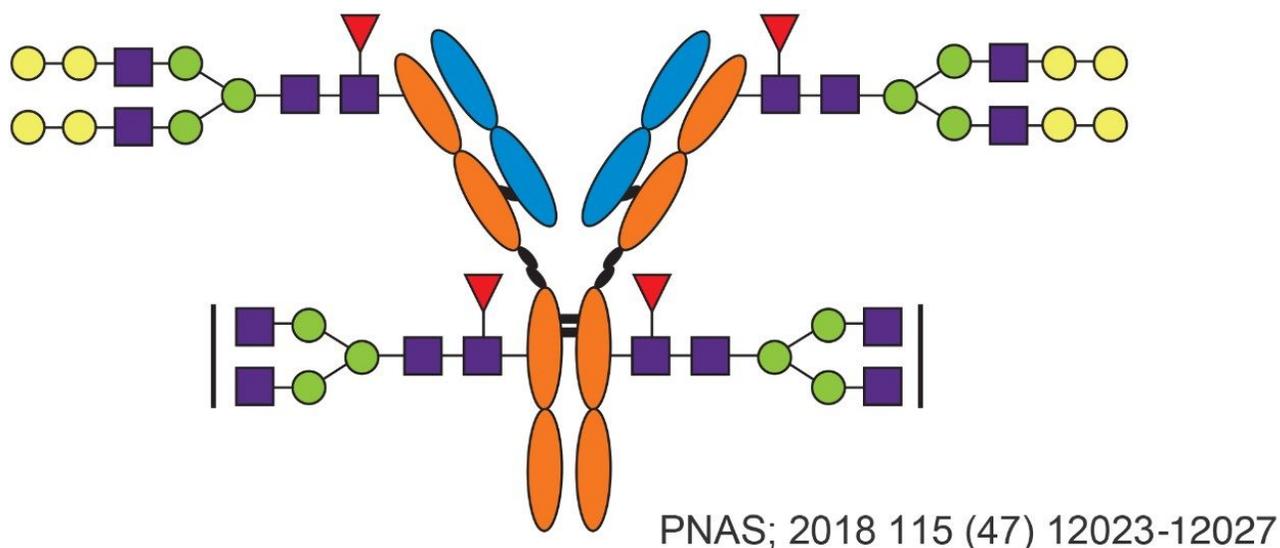


图3.西妥昔单抗图示，表明除Fc中的典型位点以外，Fd中也存在N-糖基化位点。

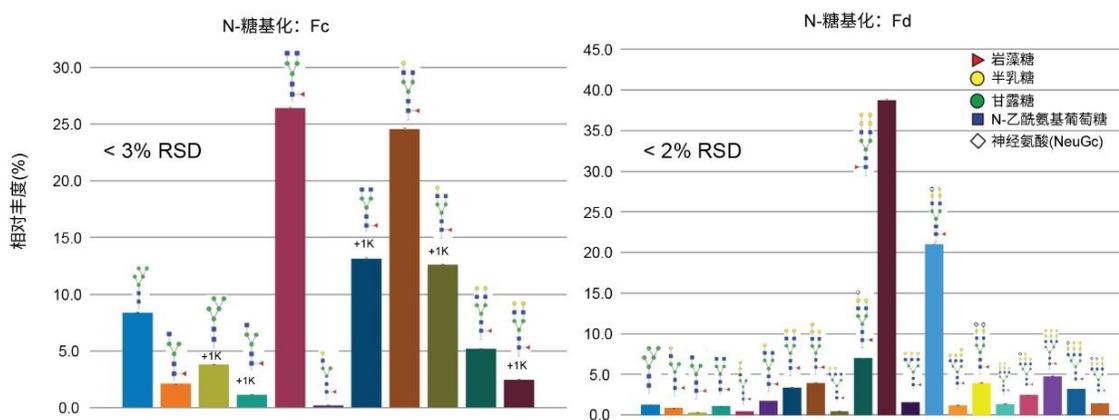


图4.西妥昔单抗Fc和Fd N-糖基化物质

第二项案例研究展示了如何将亚基MAM方法应用于克隆选择或工艺开发以监测产品序列变体。生产过程中发生的这些序列变体可能是由于序列突变或细胞培养条件不佳而导致氨基酸错配的结果⁸。为模拟典型分析过程，使用包含3个已知突变点的曲妥珠单抗样品，其中一个突变点位于轻链中(V104L)，导致+14 Da的质量数漂移；另外两个突变点位于Fc中(E359D和M361L)，一起导致-32 Da的质量数漂移。将该样品以0.5%~50%的浓度加入曲妥珠

单抗原研药中，分析定量准确度和线性。该研究在IdeS酶解之前对样品进行去糖基化处理，以简化BioAccord系统上掺入Fc序列变体后的数据分析。图5A所示为代表性组分图，其中LC、Fd和Fc亚基的质量数符合10 ppm的质量数偏差要求，预计LC和Fc的低水平序列变体将以相同的标准检出。相对百分比与预期的加标值一致，结果在1%~50%的范围内呈线性($R^2 = 0.9994$)，如图5B所示。

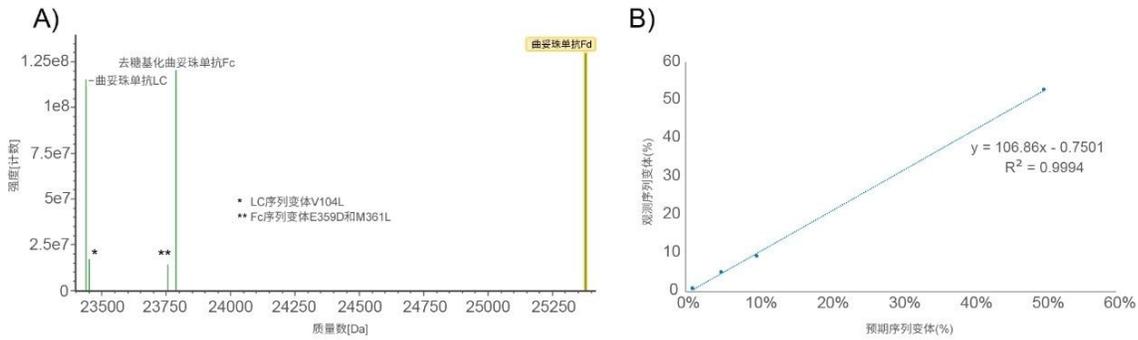


图5.曲妥珠单抗序列变体分析。

(A) 具有自动标记的LC, Fd, Fc和两种序列变体的10%序列变体加标样品的成分图。LC序列变体标记有*, Fc序列变体标记有**。(B)观测序列变体百分比与预期序列变体百分比, 在1%~50%的范围内呈线性。

最后一个案例是强制氧化实验，该实验模拟制剂和产品稳定性研究中常见的评估。成品药储存过程中发生的氧化会影响药物有效性，从而影响其保质期。在室温下将NIST参比mAb的对照样品用0.003%或0.01%过氧化氢(H_2O_2)降解24 h，然后进行IdeS酶解、还原，并在Vion IMS系统上执行亚基MAM分析。结果证明，LC和Fd亚基对降解条件具有抗性，但观察到Fc亚基的氧化显著增加（图6）。0.003%的 H_2O_2 处理水平使几乎所有Fc物质均转化为氧化（单氧化和双氧化）形式，使用0.01% H_2O_2 降解的样品则进一步转化为双氧化物质。

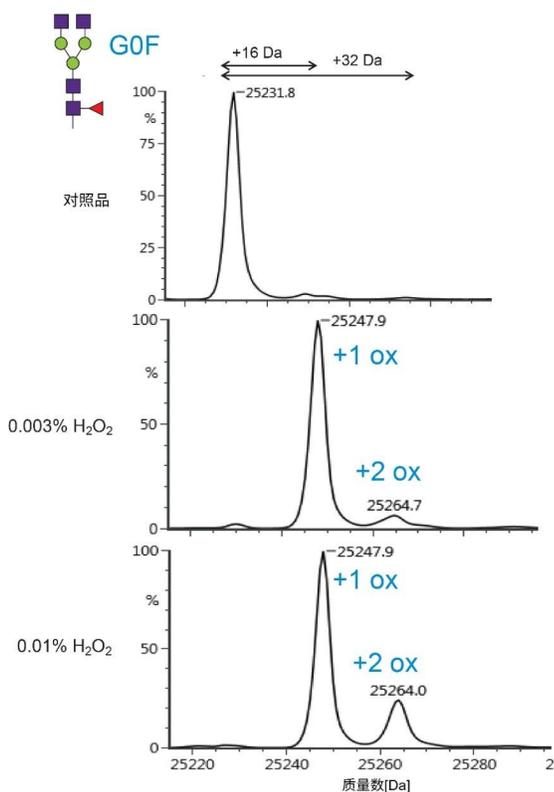


图6.NIST *mAb*强制氧化研究，Fc物质。MaxEnt1去卷积（GOF物质的放大图）结果表明，使用0.003%和0.01%的过氧化氢(H_2O_2)温育后，化合物发生了+1、+2氧化。

虽然亚基MAM方法可以提供一种可能更快速、更高效的方法来分析mAb CQA，但是需要考虑到两个实际限制因素。首先，监测的CQA必须通过蛋白质组学实现质量分离。例如，使用该方法将无法分离同量异位和接近同量异位的物质（例如异构化和脱酰胺化），相比50 kD的还原重链，更容易对25 kD IdeS亚基上较小的修饰进行定量，例如蛋氨酸氧化(+16 Da)。其次，亚基MAM只能定位LC、Fd或Fc亚基上的修饰位点，如果给定亚基上存在多个修饰，可能会干扰结果的直接解释。在这些情况下，可能需要采用位点特异性肽图分析方法。

结论

本研究展示了多个TOF平台上基于亚基的mAb质量属性监测。与肽分析MAM方法相比，亚基MAM分析更适合提高样品通量，产生的数据也更简单。在具备这些优势的同时，也存在一些限制，例如对同一亚基内存在的特定属性缺少选择性，无法监测基于脱酰胺和异构化的属性。但是，可以使用这种更简单的方法来监测常见CQA，例如糖基化谱图、糖化、氧化和产品序列变体。在符合法规要求的waters_connect/UNIFI信息学平台上运行的BioAccord和Vion系统表现出优异的重现性和重复性，与之前使用Xevo Qtof平台所获得的大量研究结果一致。

参考资料

1. Dong J, Migliore N, Mehrman S, Cunningham J, Lewis M, Hu P. High-Throughput, Automated Protein A Purification Platform with Multiattribute LC-MS Analysis for Advanced Cell Culture Process Monitoring. *Anal Chem*. 2016; 88: 8673–8679.
2. Sokolowska I, Mo J, Dong J, Lewis M, Hu P. Subunit mass analysis for monitoring antibody oxidation. *mAbs*. 2017; 9:3, 498–505.
3. Sokolowska I, Mo J, Pirkolachahi F, McVean C, Meijer L, Switzar L, Balog C, Lewis M, Hu P. Implementation of a High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method in Quality Control Laboratories for Release and Stability Testing of a Commercial Antibody Product. *Anal Chem*. 2020; 92, 2369–2373.
4. 《Glycoworks RapiFluor MS N-糖分析试剂盒维护和使用手册》. [715004903ZH <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004903.pdf>](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004903.pdf) .
5. Shion H, Yu YQ, Chen W. 在数据完整性环境下进行可重现的完整蛋白质量数例行分析. 沃特世应用纪要, [720006472ZH <https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/enabling-routine-and-reproducible-intact-mass-analysis.html) .2019.
6. Giddens J, Lomino J, DiLillo D, Ravetch J, Wang X. Site-selective Chemoenzymatic Glycoengineering of Fab and Fc Glycans of a Therapeutic Antibody. *PNAS*. 2018; 115 (47) 12023–12027.
7. Ayoub D, Jabs W, Resemann A, Evers W, Evans C, Main L, Baessmann C, Wagner-Rousett E, Suckau D, Beck A. Correct Primary Structure Assessment and Extensive Glyco-Profiling of Cetuximab by a Combination of Intact, Middle-up, Middle-down and Bottom-up ESI and MALDI Mass Spectrometry

Techniques.*mAbs*.2013; 5(5): 699–710.

8. Lin T, Beal K, Brown P, DeGruttola H, Ly M, Wang W, Chu C, Dufield R, Casperson G, Carroll J, Friese O, Figueroa Jr.B, Marzilli L, Anderson K, Rouse J. Evolution of a Comprehensive, Orthogonal Approach to Sequence Variant Analysis for Biotherapeutics.*mAbs*.2019.11:1, 1–12.

特色产品

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

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

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

Vion IMS QToF离子淌度四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134845751>>

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

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

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

720007129ZH, 2021年1月

© 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