

## 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

---

Nilini Ranbaduge, Min Du, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

---

### 摘要

由合规软件UNIFI控制的BioAccord系统经过专门设计，内置适用于常规蛋白治疗药物分析的集成化分析方法。该系统可执行常规肽表征和精确质量数筛查分析，为CQA监测提供支持。在本应用纪要中，我们以单克隆抗体(mAb)的强制降解试验作为研究案例，展示了BioAccord系统的肽图分析和监测功能。

### 优势

- 使用SmartMS™技术进行系统设置、校正和系统状态监测
  - 由自动化软件执行数据采集、处理和报告
  - 利用科学数据库可创建用户专有且能重复使用的肽属性数据库
  - 使用同一仪器-信息学平台即可完成常规的肽水平产品质量属性鉴别及监测
- 

### 简介

---

生物治疗药物在开发和生产过程中必须经过严格的表征和监测，以确保产品质量和安全性符合法规要求<sup>1,2</sup>。高性能LC-MS技术常用于在肽水平对蛋白质化学结构和翻译后修饰进行表征，如今，该技术的应用已扩展到传统领域之外，被用于产品生命周期不同阶段的质量属性监测。要对质量属性进行常规监测，需要适合预期目标的分析平台，该平台必须性能稳定、操作简单且易于在整个机构的各个实验室内部署。BioAccord系统是沃特世新推出的一款紧凑型高性能LC-MS系统，专门为满足此类要求而设计。该系统由ACQUITY UPLC I-Class PLUS、采用SmartMS技术的ACQUITY RDa检测器、符合法规要求的UNIFI软件以及专为生物制药应用量身定制的各种消耗品组成。UNIFI科学信息系统提供集成化的分析工作流程方法，可自动采集数据、处理数据和生成报告，因此无论是单个样品还是大批量样品，该系统都能轻松完成肽监测分析并妥善记录。在本应用纪要中，我们以单克隆抗体(mAb)的强制降解试验<sup>3,4</sup>作为研究案例，展示了BioAccord系统的肽图分析和监测功能。

---

## 实验

### 强制降解样品的制备

热降解：取一份NISTmAb参比物质试样（NIST RM 8671，美国盖瑟斯堡），在37 °C下加热一周。

氧化降解：取两份NISTmAb参比物质试样，分别加入0.01%和3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，在室温下温育24 h。

肽样品：分别用0.5 M DTT和碘乙酰胺溶液将完整mAb样品还原并烷基化，然后使用NAP-5体积排阻色谱柱（GE 医疗生命科学，美国匹兹堡）将缓冲液替换为0.1 M Tris (pH 7.6)。样品在37 °C下用胰蛋白酶（Promega，美国麦迪逊）酶解4 h（蛋白质与酶的比例为20:1），然后用10%甲酸酸化。

### 液相色谱条件

系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	ACQUITY TUV
样品瓶：	通过LCGC认证的透明玻璃12×32 mm螺纹颈口全回收样品瓶，配有盖子和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积1 mL（部件号：186000385C）

色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH C <sub>18</sub> , 130 Å, 1.7 μm, 1 × 100 mm (部件号: 186006937)
柱温:	60 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	5 μL
流速:	0.2 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度:	1%流动相B保持1 min, 50 min内从1%升至35%流动相B, 6 min内从35%升至85%流动相B, 85%流动相B保持4 min, 5 min内从85%降至1%流动相B, 1%流动相B保持13 min

## 质谱条件

系统:	ACQUITY RDa检测器
电离模式:	ESI+,
采集模式:	CID碎裂模式下的MS全扫描
采集范围:	m/z 50-2000
毛细管电压:	1.2 kV

碰撞能量：	60-120 V（低/高能量阶梯）
锥孔电压：	30 V
脱溶剂化能：	350 °C
智能数据捕获：	开

## 数据管理

信息学软件：	UNIFI科学信息系统1.9.4版
--------	-------------------

---

## 结果与讨论

### 从肽属性鉴别到常规监测

本应用纪要着重介绍BioAccord系统在常规肽质量属性分析和监测中的应用，这些应用包括：使用肽图分析数据鉴定肽及其修饰；使用UNIFI科学数据库功能将选定的潜在质量属性列表归档到用户自定义的安全数据库中，供后续的目标肽监测使用（图1）。进行常规肽属性监测时，精确质量数筛查方法通过检索和使用自定义数据库中的条目来监测目标CQA和进行相对定量。为了提高可用性，可以利用阈值功能（限值检查）将精确质量数筛查方法设置为一旦发现任何修饰水平异常的属性，立即通知用户。下文介绍的肽图分析方法和精确质量数筛查方法均符合法规要求，二者被集成到了具有数据库功能的同一信息学平台上，因此能够为用户提供从肽属性分析到监测的连续工作流程。本文将使用曲妥珠单抗案例研究的数据进一步详细讲解。

肽图分析方法：分析治疗性蛋白质的潜在质量属性

自定义属性库

精确质量数筛查方法：监测关键质量属性

图1.从肽属性鉴定到常规监测的工作流程方法示意图。

### 步骤1.利用肽图分析工作流程鉴别潜在的质量属性

简而言之，首先对mAb等分试样进行高温降解和化学氧化，然后进行胰蛋白酶酶解（如“实验”部分所述）。使用BioAccord系统的交替MS扫描功能进行数据采集，在数据非依赖型采集(DIA)模式下，以60-120 V的能量阶梯交替执行无碰撞能量和高碰撞能量扫描，从而生成信息量丰富的碎片离子。使用肽图分析方法处理采集到的数据，根据精确质量数确认肽及其肽修饰，并使用初级碎片离子进一步验证各归属结果，实现高可信度的肽属性分析。未修饰和修饰后的HC:T21（重链，胰蛋白酶肽编号为N-末端开始第21号）碎片谱图（带注释）如图2A所示。图2B所示的序列覆盖率图包括经验证质量精度在±10 ppm以内的所有肽序列，且每种肽至少包含3个b/y碎片离子。对照NISTmAb样品和强制降解NISTmAb样品报告的序列覆盖率超过90%。组分表（图2C）全面汇总了每个样品中所有经过验证的肽和鉴别出的肽修饰，并列出了它们各自的 $m/z$ 、保留时间、质量数容差、电荷态和初级碎片离子（b/y离子）的数量。NISTmAb的氧化强制降解条件可诱导蛋氨酸和色氨酸氧化。为了进行常规CQA监测，从组分表中选择肽列表并发送至自定义数据库。类似地，此处所述的UNIFI处理方法也可以处理沃特世的其他HRMS系统采集到的数据，协助肽图分析和PTM确认。

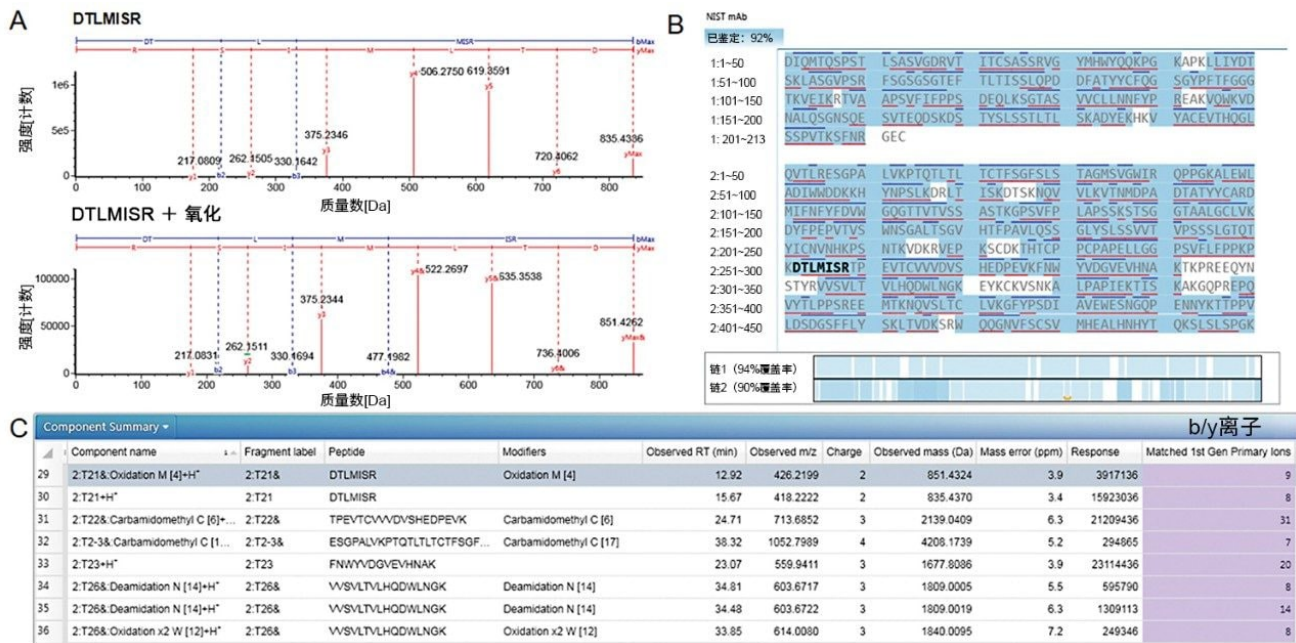


图2.UNIFI肽图分析方法的“查看”面板。(A)未修饰和修饰后的DTLMISR肽(HC:T21)的高能量谱图(带注释)。以蓝色和红色突出显示的是碰撞能量阶梯产生的b离子和y离子。(B)蛋白质序列覆盖率为92%(高可信度肽筛选标准设置为质量数容差±10 ppm或更低,并且每种肽至少包含三个碎片离子)。(C)组分汇总表,此表汇总了分析中鉴别出的所有肽及其PTM的检测结果,例如保留时间、m/z和MS强度等。

## 步骤2.根据肽图分析结果创建自定义属性库

完成肽鉴定之后,使用步骤1生成的肽图分析数据建立自定义数据库。具体操作为直接从组分表(图3A)中选择目标肽属性,然后使用UNIFI的“发送至科学库”选项创建新的自定义库(图3B)。除了肽序列、化学组成和中性质量数之外,每个肽条目还包括几个关键参数,例如保留时间、m/z、MS强度、MS和碎片离子谱图以及电荷态信息(图3C),用户可以选择性地检索这些参数,将其用于目标肽监测方法。这里所述的案例研究使用UNIFI科学数据库功能在mAb Product Quality Attributes(mAb产品质量属性)库中存储了与NISTmAb降解样品相关的28项潜在肽质量属性。机构内的其他UNIFI用户可以修改、保存和共享自定义库。

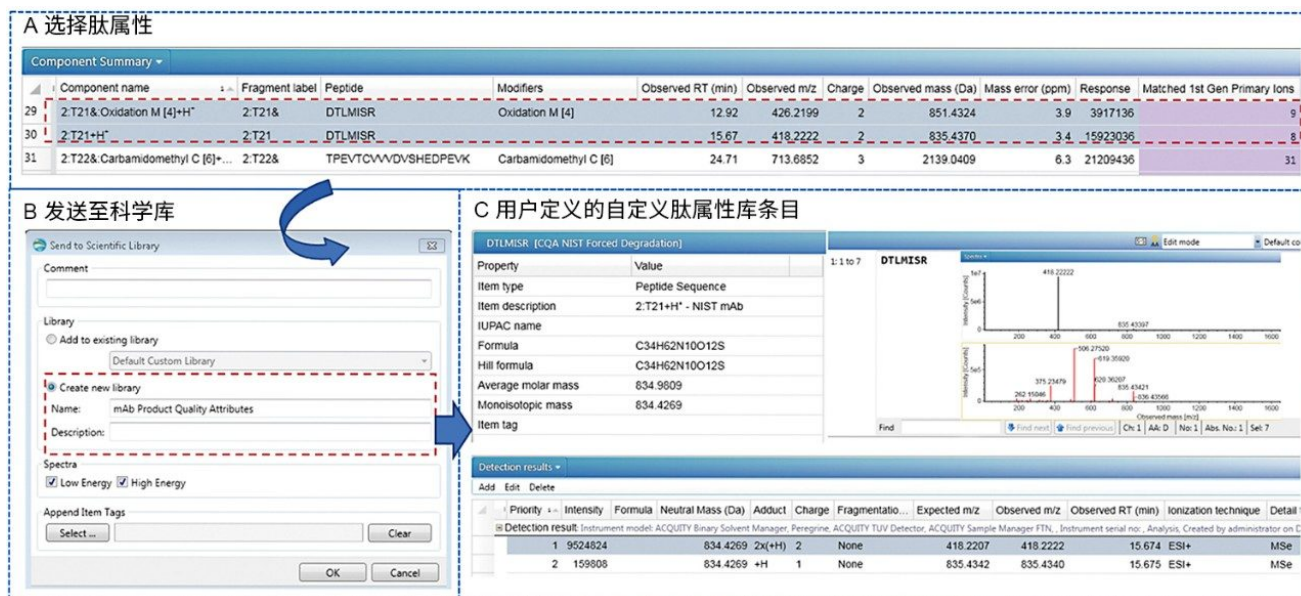


图3.通过肽图分析方法确认的PTM可以存储到自定义库中用于目标肽监测。用户可以将目标肽直接从肽图分析结果表发送至自定义库。步骤如下：(A)选出目标肽；(B)选择“发送至科学库”菜单选项以创建新库。本例展示了mAb Product Quality Attributes (mAb产品质量属性)库的创建过程。创建的库中包含(C)检测结果、MS和碎片离子谱图。也可以通过输入MW、电荷、RT和碎片离子信息手动创建库。

### 步骤3.使用精确质量数筛查方法监测潜在的CQA

本应用纪要进一步说明了如何使用UNIFI精确质量筛查数据处理方法进行常规肽监测。此筛查方法结合了通用处理参数、可进行肽属性限值检查的强度阈值功能，以及结果报告功能，能够大幅简化常规肽监测方法，从而提高稳定性和工作效率。在本案例研究中，我们从步骤2（图4A）创建的自定义CQA库中选定并导入了28项需要监测的目标肽属性。每个库条目都包含肽的中性质量数和保留时间信息，有助于实现准确的肽检测。此外，这个靶向方法还配备相对丰度测量工具，可使用单电荷或多电荷组合离子响应值（图4B）计算CQA的相对修饰百分比水平。在对氧化肽水平进行可视化时，通过自定义设置修饰百分比限值，轻松鉴别出了超出标准氧化水平的样品。图4C中的示例为了展示该功能的特性，使用任意数值作为阈值进行限值检查，得到了HC:T21 DTMLISR天然肽和氧化肽的分析结果。此处显示两种氧化强制降解条件均触发了修饰HC:T21肽的限值，并分别以黄色和红色标记（黄色表示超出预设的警告限值(10%)，红色表示超出预设的误差限值(50%)）。自动报告功能可以记录各个属性监测步骤收集到的信息，供蛋白治疗药物的工艺开发使用。

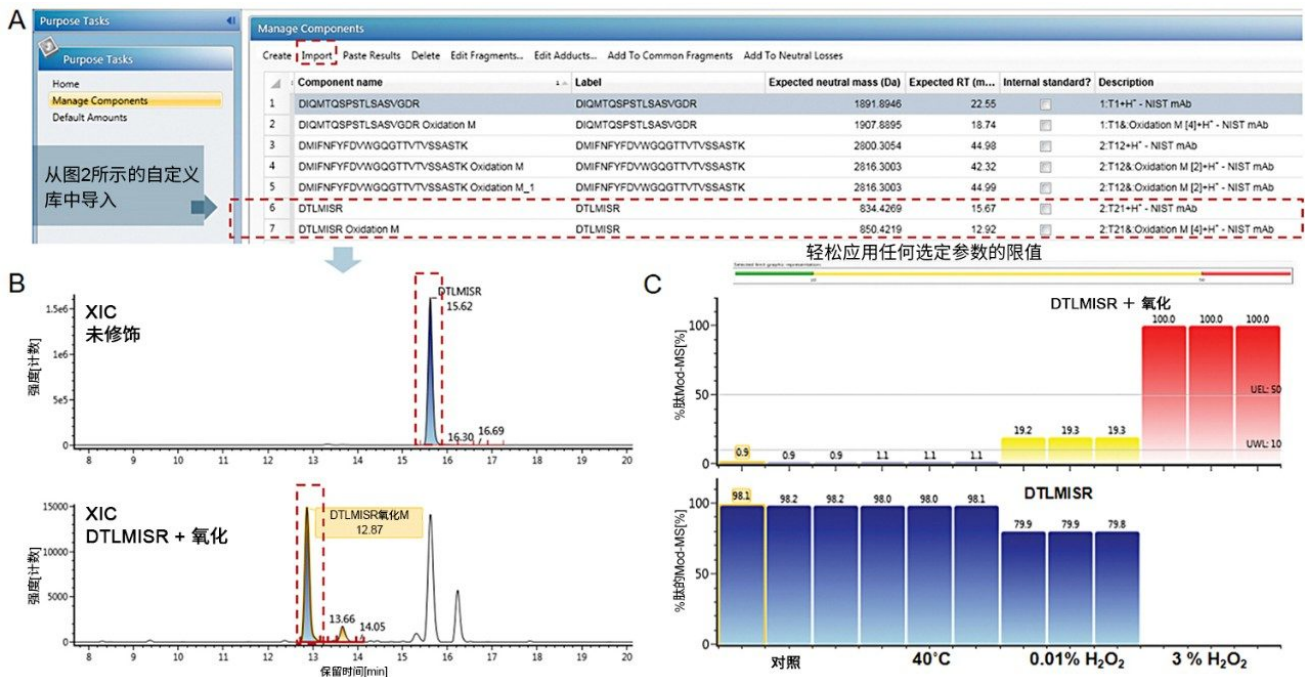


图4.(A)用户可以将目标肽库导入另一个分析方法（例如精确质量数筛查处理方法）。每个条目都包含肽序列、修饰、中性质量数和保留时间信息，可用于靶向监测。(B)筛查方法使用XIC进行相对定量。本例显示了修饰肽和未修饰肽的BPI和XIC。(C)汇总表展示了HC:T21肽的每种修饰肽（上）和天然肽（下）的相对丰度(%)。此处展示的是重复进样的数据。应用于HC:T21氧化肽的限值会将超过设定阈值的样品标记出来。

## 仅MS扫描模式与包括碎片的全扫描模式性能相当

大多数肽监测分析方法都使用仅MS采集模式来筛查样品中的一系列已知目标肽，以实现稳定的定量分析。但是，可生成碎片离子谱图DIA采集模式对于mAb样品中差异表达峰的鉴别和序列验证很有帮助。MS采集模式与包括碎片的MS采集模式能获得一致的修饰百分比测量值，是证明平台数据完整性的一个重要特性。本实验使用两种采集方法采集mAb参比样品的数据，结果表明给定肽属性的相对修饰百分比相当。因此，这两种方法都不会影响MS分析得到的修饰百分比，均可用于常规肽监测分析（图5）。



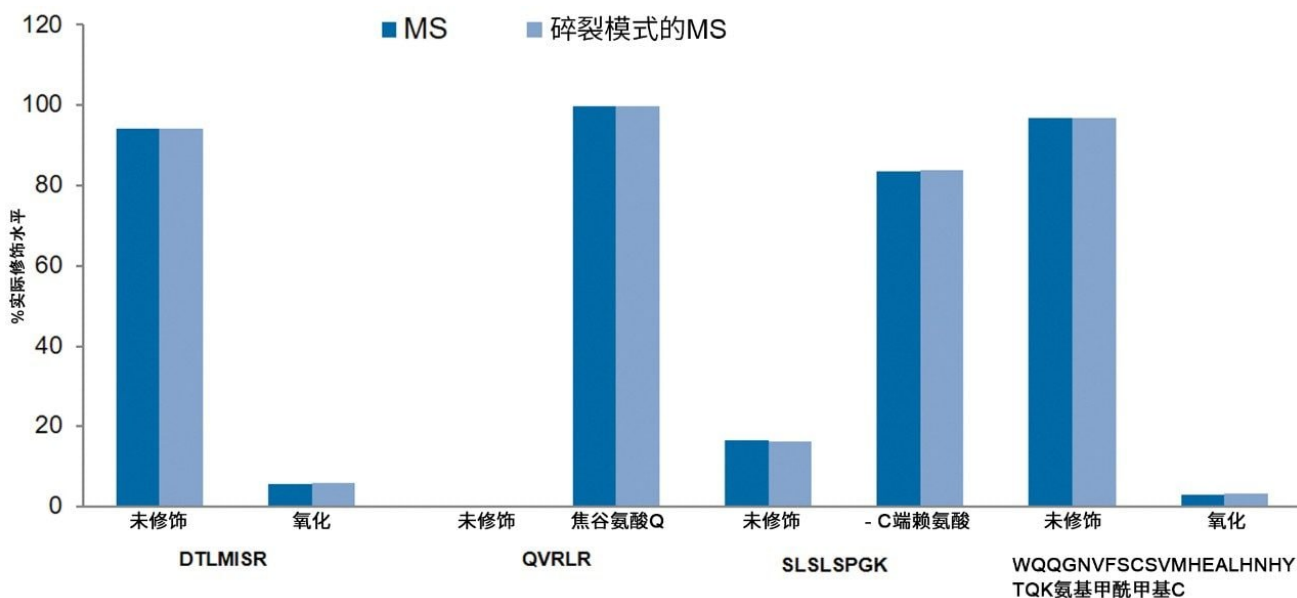


图5.在仅MS扫描模式和包括碎片的MS扫描模式下检测几种肽得到的相对丰度。数据显示两种采集模式的结果相当。

## 结论

由合规软件UNIFI控制的BioAccord系统经过专门设计，内置适用于常规蛋白治疗药物分析的集成化分析方法。该系统可执行常规肽表征和精确质量数筛查分析，为CQA监测提供支持。借助自定义库功能，两种肽分析方法可以无缝整合，进而有效地将表征分析获得的信息转换为能够轻松部署到不同分析实验室中的监测分析方法。

此外，SmartMS系统具有直观的信息学控制功能（提供优化调谐参数、自动仪器健康状态监测和校准功能），是适合任何技能水平的用户使用的稳定MS系统<sup>5</sup>。

## 参考资料

1. ICH, Pharmaceutical Development Q8(R2).International Conference on Harmonization of Technical

Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use ICH: www.ICH.org, 2009; p 28.

2. Alt, N.; Zhang, T. Y.; Motchnik, P.; Taticek, R.; Quarmby, V.; Schlothauer, T.; Beck, H.; Emrich, T.; Harris, R. J. Determination of Critical Quality Attributes for Monoclonal Antibodies Using Quality by Design Principles. *Biologicals*. 2016, 44 (5), 291–305.
3. Nowak, C.; Cheung, J. K.; M. Dellatore, S. M.; Katiyar, A.; Bhat, R.; Sun, J.; Ponniah, G.; Neill, A.; Mason, B.; Beck, A.; Liu, H. Forced Degradation of Recombinant Monoclonal Antibodies: A Practical Guide. *mAbs*. 2017, 9 (8), 1217-1230.
4. Blessy, M.; Patel, R. D.; Prajapati, P. N.; Agrawal, Y. K. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs – A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014, 4 (3), 159-165.
5. Ranbaduge, N.; Shion, H.; Yu, Y.Q., 使用BioAccord系统进行常规肽图分析. 720006466ZH. 应用纪要. 沃特世公司. 2019年1月.

---

## 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>>

720006602ZH, 2019年6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