

利用快速胰蛋白酶酶解和BioAccord™ LC-MS系统进行简单高效的Peptide MAM分析

Samantha Ippoliti, Kellen DeLaney, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

随着多属性方法(MAM)工作流程在生物制药行业中的日益普及，业界对提高通量和减轻数据分析负担的需求也日益迫切。成功的MAM分析在很大程度上依赖于一致且可重现的蛋白质酶解，尽可能减少样品前处理引起的修饰，因为修饰会增加分析的复杂性并增加数据审查工作。RapiZyme™胰蛋白酶是一款市售新型高活性抗自切酶，可在30分钟内快速、干净、完整地酶解mAb。酶解时间越短，在LC-MS分析之前的样品前处理过程中发生人为修饰的可能性就越低。这是非常理想的情况，因为MAM分析通常侧重于追踪翻译后修饰(PTM)的水平，例如脱酰胺和氧化，在较长的样品制备温育过程中表现出较高的干扰发生率。此外，30分钟的酶解时间缩短了结果的周转时间，给予分析人员更灵活实验室时间。本研究评估了在MAM工作流程中RapiZyme胰蛋白酶对热降解英夫利昔单抗原研药和三种获批生物类似药的应用。

优势

- RapiZyme胰蛋白酶具有抗自切的特性，支持使用高E:P比率酶解，从而缩短样品前处理时间并减少由样品制备引起的修饰
- 可重现的酶解结果，助力长期方法的成功
- BioAccord LC-MS系统可简化系统设置和数据采集
- waters_connect™信息学平台内的Peptide MAM应用程序工作流程符合法规要求

简介

使用LC-MS肽图分析工作流程的多属性方法(MAM)在生物制药行业中越来越普遍,适用于产品质量属性(PQA)分析、cGMP稳定性测试和QC放行。这些分析能够为生物制药产品变异提供丰富的位点特异性信息,为药物开发和稳定性评估提供支持。MAM分析在mAb生物类似药的开发中也非常有用,因为重要和关键的PQA已知,并且要求生物类似药“与FDA批准的参比药品不存在具有临床意义的差异”¹。MAM研究可以提供有关原研药和生物类似药产品的比较信息,并确认降解或储存期间类似的降解途径。

蛋白质酶解的质量、重现性和速度对于MAM工作流程的成功至关重要。RapiZyme胰蛋白酶(沃特世公司)是一种新型均一甲基化猪胰蛋白酶,具有高活性和抗自切性,尤其是在高比例的酶:蛋白质(E:P)下,可实现快速、干净、完整且可重现的酶解。使用RapiZyme胰蛋白酶与还原、烷基化和脱盐的mAb样品按1:5(w/w)的比例混合时,仅需30分钟即可完成完全的胰蛋白酶酶解,同时样品前处理几乎不会引入干扰。而使用其他出色的MS测序级胰蛋白酶,在相同条件下通常会生成明显含有胰蛋白酶自切肽、漏切以及其他未知物质的酶解物(图1),与之前的报道的结论一致²。因此,RapiZyme胰蛋白酶对于当前的肽图分析分析工作流程而言是一种极具吸引力的改进功能,能够在不牺牲数据质量的前提下缩短样品前处理时间。

重现性是MAM实验最重要的因素之一。MAM分析的主要目的是监测通过参比物质研究确定的PQA和关键质量属性(CQA)水平。为了简化分析,使用经过修饰和未经修饰的肽的质量数和保留时间信息对属性进行靶向定量(监测)。这就需要方法在色谱分离以及蛋白质酶解两方面都具有重现性。首先,为确保色谱的重现性,本研究采用了搭载MaxPeak™高性能表面(HPS)技术的ACQUITY™ Premier CSH™ C18肽分析专用柱³⁻⁴。其次,该工作流程的成功在很大程度上依赖于在每个样品中产生一致的酶解肽形式。许多成功的MAM工作流程都是使用业内出色的市售MS测序级胰蛋白酶建立的⁴⁻¹¹。在推出具有更快、更干净酶解能力的RapiZyme胰蛋白酶之后,我们评估了它在MAM工作流程中的适用性。

实验

样品前处理 - 降解研究

我们将Remicade™、Inflectra™、Avsola™和Renflexis™(英夫利昔单抗原研药和三种已获批的生物类似药)样品置于降解条件下,进行MAM研究。样品在37 °C下进行热降解,并在第1周和第2周的时间点上取样冷冻保存,以备后续酶解和MAM分析。

样品前处理 - 肽图分析

将参比样品(T0)、1周样品(T1)和2周样品(T2) (各150 µg) 用含3 mM二巯基苏糖醇(DTT)的5.2 M盐酸胍稀释至1 µg/µL, 在室温下放置30分钟, 进行变性和还原。然后加入碘乙酰胺(IAM)至最终浓度7 mM, 并在室温下孵育20分钟。使用7K MWCO凝胶过滤装置将所有样品交换至100 mM Tris HCl, 10 mM CaCl₂, pH 7.5 (P/N: 186010111 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010111-quick-prep-tris-cacl2-buffer-salts-ph-75-4-pk.html>>) 缓冲液中进行酶解。

将RapiZyme胰蛋白酶 (P/N: 186010108 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186010108-rapizyme-trypsin-ms-grade-4-pk.html>>) 以1:5 (w/w)的酶:蛋白质(E:P)比例加入每份样品中。在37 °C下进行30分钟的蛋白质酶解。随后用10%乙酸灭活胰蛋白酶 (最终浓度0.1%) , 酶解后的样品用流动相A进一步稀释 (至0.2 µg/µL) , 用于LC-MS分析。向每个样品中加入游离甲硫氨酸 (最终浓度为3 mM) , 目的是在LC-MS分析的样品自动进样器中排队等待期间抑制可能的人为氧化。使用MassPREP™肽混合物 (P/N: 186002337 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html>>) 作为Peptide MAM应用程序处理的系统适应性测试(SST)样品, 按照维护和使用手册中的说明进行前处理, 用于分析的进样量为5 µL¹²。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC™ I-Class PLUS
检测 (光学) :	ACQUITY TUV (214 nm)
样品板:	带裙边的96孔PCR板 (Thermo Scientific, P/N: AB0800)
色谱柱:	ACQUITY Premier CSH C ₁₈ , 130 Å, 1.7 µm, 2.1×100 mm肽分析专用柱 (P/N: 186009488)
柱温:	60 °C
样品温度:	6 °C
进样体积:	10 µL (柱上进样量2 µg)

流速:	0.2 mL/min
流动相A:	0.1% (v/v)甲酸的水溶液
流动相B:	0.1% (v/v)甲酸的乙腈溶液
梯度:	梯度开始时保持1% B 1 min, 在50分钟内从1% B升至35% B, 在6分钟内从35% B升至85% B, 85% B保持4分钟, 在6分钟内从85% B降至1% B, 1% B保持13分钟

MS条件

MS系统:	BioAccord系统(ACQUITY RDa™)
电离模式:	ESI+, 包括碎片离子的全扫描MS
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
脱溶剂气温度:	350 °C
智能数据捕获:	开

数据管理

LC-MS采集:	在waters_connect v1.6.2下运行的UNIFI™
----------	----------------------------------

v2.1.2.14

数据处理:

在waters_connect v2.2.0下运行的Peptide MAM
v1.5.0.13

结果与讨论

MAM结果

按照1:5 (w/w)的E:P比例进行30分钟的温育，可以实现接近完全的酶解，如Remicade参比物质用出色的MS级胰蛋白酶和RapiZyme胰蛋白酶酶解得到的代表性TIC色谱图所示（图1）。蓝色峰表示发生预期胰蛋白酶切割的肽。白色峰表示漏切或非特异性切割的肽。其余峰（以黄色显示）由未知物质组成，包括胰蛋白酶自切肽。图中显示了业内出色的MS测序级胰蛋白酶的主要自切物质（上图），用红色框或星号标记。在使用RapiZyme胰蛋白酶进行酶解时，观察到自切物质减少了98%，漏切物质减少了78%（下图）。这些杂质会增加数据的复杂性，并可能干扰数据分析，尤其是当它们与目标峰共洗脱时。

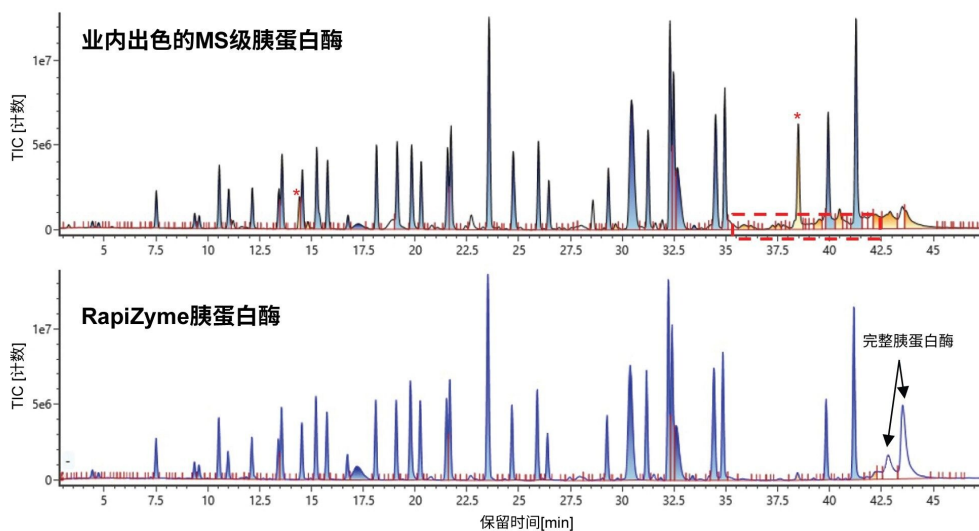


图1.使用另一种出色的MS级胰蛋白酶（上图）和RapiZyme胰蛋白酶（下图），以1:5 (w/w)酶:蛋白质比例对Remicade T0进行酶解得到的代表性色谱图(TIC)。红色星号(*)和框内突出显示了重要的胰蛋白酶自切物质。蓝色显示的峰表示具有预期胰蛋白酶切割的已鉴定的肽。白色显示的峰代表漏切或非特异性切割的肽，黄色显示的峰代表未匹配的物质。

总体而言，观察到原研药和生物类似药酶解的序列覆盖率为90%~92%（图2A）。（序列覆盖率基于筛选的数据，以实现可靠的完全胰蛋白酶解肽匹配。为实现可靠的肽匹配，母离子质量数的质量精度必须在10 ppm以内，并且必须分配至少3个b/y碎片离子。）图2B显示了RapiZyme胰蛋白酶酶解的英夫利昔单抗样品的代表性序列覆盖图。序列覆盖率出现的细微变化是由于小分子肽有时未达到b/y离子检测的阈值。所有进样均通过waters_connect信息学平台中的Peptide MAM应用程序按照之前所述的方式处理⁴。

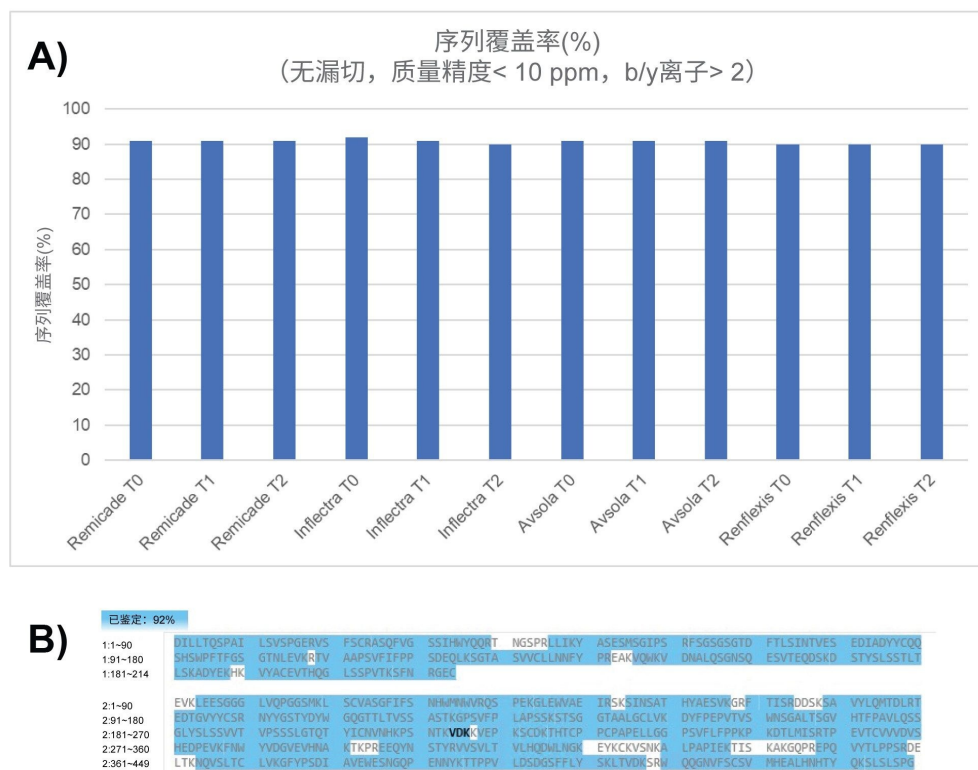


图2.A) 使用RapiZyme胰蛋白酶酶解各种英夫利昔单抗生物类似药样品得到的序列覆盖率(%)汇总。B) 英夫利昔单抗酶解物的覆盖率图示例。序列覆盖率基于筛选后的肽段(质量精度 < 10 ppm, > 2 b/y碎片离子阳性匹配), 同时排除了漏切、非特异性切割和源内碎裂/加合物。

研究中监测了包括N-糖基化修饰、蛋氨酸氧化、脱酰胺和未加工的C端赖氨酸等14种属性。图3展示了降解条件下英夫利昔单抗生物类似药监测PQA的子集。样品1-3(蓝色)分别代表Remicade(英夫利昔单抗)T0、T1和T2, 样品4-6(橙色)分别代表Inflectra(英夫利昔单抗)T0、T1和T2, 样品7-9(黄色)分别代表Avsola(英夫利昔单抗)T0、T1和T2, 样品10-12(绿色)分别代表Renflexis(英夫利昔单抗)T0、T1和T2。和预期一致, C端赖氨酸变体水平在整个热降解过程中保持恒定, 但英夫利昔单抗生物类似药之间存在显著差异。在本研究中, 呈明显上升趋势的PQA是重链肽T7、T37和T38(HT07、HT37、HT38)的脱酰胺。对于所有生物类似药, 在低浓度(0.4%~0.5%)下, 重链肽T11(HT11)氧化保持低水平稳定, 并且在各个时间点保持稳定。重链肽T2(HT02)的氧化水平相对较低, 但随着时间的推移, 每种生物类似药都呈现出缓慢增加的趋势。

使用RapiZyme胰蛋白酶酶降解条件下的生物类似药获得的MAM结果

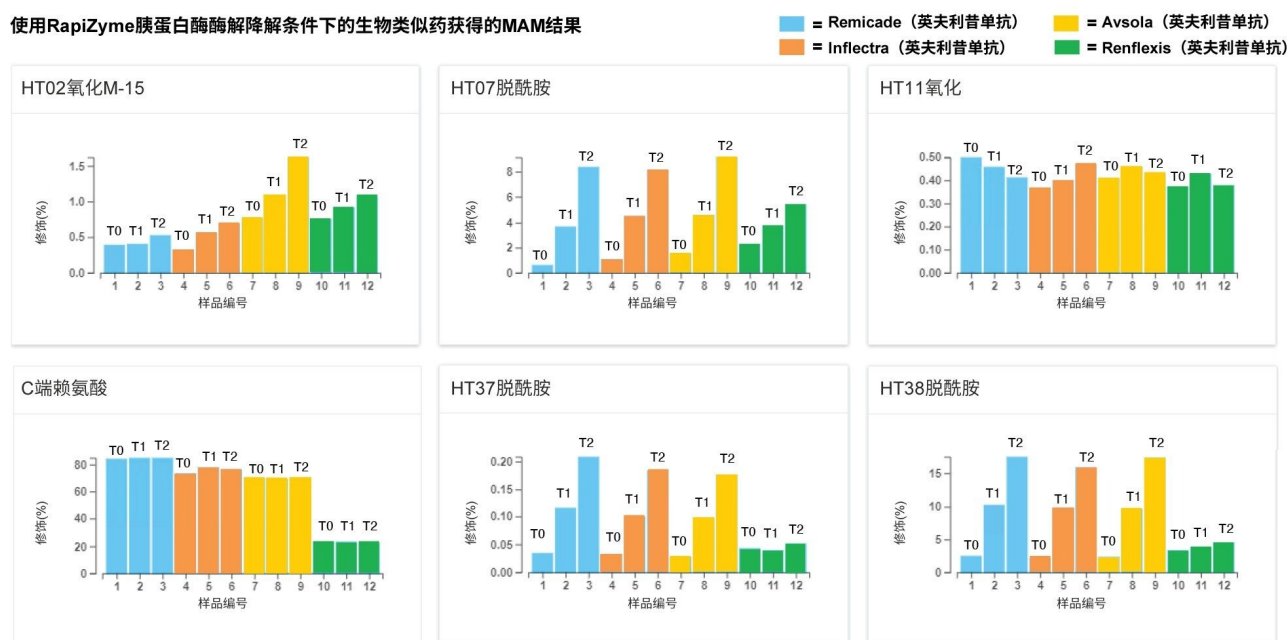


图3. Remicade (英夫利昔单抗) 和三种生物类似药在热降解条件下 (均使用RapiZyme胰蛋白酶酶解) T0、T1 (1周) 和T2 (2周) 的选定产品质量属性。进样1-3 = Remicade (英夫利昔单抗), 4-6 = Inflectra (英夫利昔单抗), 7-9 = Avsola (英夫利昔单抗), 10-12 = Renflexis (英夫利昔单抗)。

新峰检测(NPD)

Peptide MAM应用程序包含新峰检测(NPD)功能, 因此MAM分析能够监测产品纯度及目标属性。每个时间点的样品 (T1和T2) 均使用各自相应的英夫利昔单抗T0作为参比样品进行NPD处理。例如, Remicade T1和T2使用 Remicade T0作为参比进样进行处理。类似地, 使用Inflectra T0作为参比进样, 对Inflectra T1和T2样品进行 NPD处理。每种生物类似药的处理方式相同。使用该组NPD筛选标准, 仅检测到五个新峰 (图4)。其分类如下: 可能的剪切物质以蓝色显示, 小分子肽 (在参比mAb分析中未被RPLC保留) 以紫色显示, 错切产生的肽以黄色显示。这再次凸显了稳定、高重现性酶解的重要性。如果样品之间的漏切水平存在显著差异, 则即使漏切的肽也可以被标记为新峰。RapiZyme胰蛋白酶的酶解完成重复性和批次间比较已经过全面测试, 可提供始终如一的可重现结果¹。如图所示, 这样可以减少新峰的生成, 降低由于酶解不一致而产生假阳性结果的风险, 简化了数据审查过程, 并降低了在受监管环境中使用MAM LCMS分析的风险。

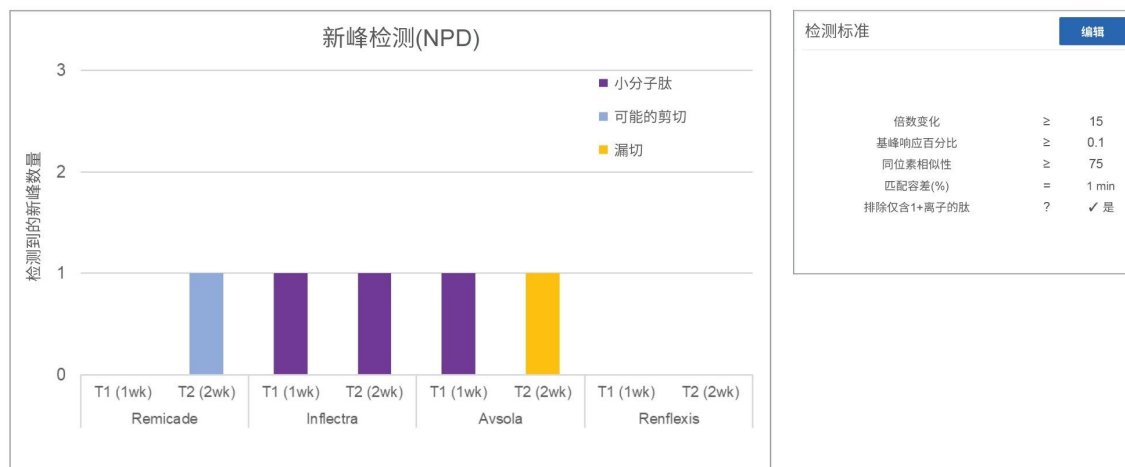


图4.降解条件下英夫利昔单抗原研药和生物类似药中检测到的新峰汇总和分类。（注：每个降解样品都与其相应的T0样品进行了比较。）检测到的新峰数量较少。

结论

在蛋白质生物制药的开发和商业化过程中，基于LC-MS的肽MAM分析正在成为一种关键分析方法。因此，这种分析方法的样品前处理必须稳定且可重现。在某些应用中（例如，在制剂和稳定性应用中），这些结果必须能够通过高通量样品处理工作流程来实现。在本次降解英夫利昔单抗生物类似药的MAM研究中，使用高E:P比例的RapiZyme胰蛋白酶能够提供快速、完全且高重现性的酶解，同时不会牺牲数据质量，在监测PQA方面取得了成功。此外，在Peptide MAM应用程序中进行NPD处理时发现的新峰数量很少，表明使用RapiZyme胰蛋白酶进行酶解不会由于酶解杂质而产生假阳性新峰的背景。因此，使用RapiZyme胰蛋白酶能够更快速地为生物制药产品中基于肽MAM的LCMS分析提供更干净的样品。

参考资料

1. Biological Drug Product Definitions.FDA website.访问于2023年6月19日.<
<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Biological-Product-Definitions.pdf><

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Biological-Product-Definitions.pdf> >.

2. Ippoliti S, Zampa N, Yu YQ, Lauber MA.使用RapiZyme胰蛋白酶进行生物制药表征的通用快速酶解方案.沃特世应用纪要.720007840ZH.2023年3月.
3. Birdsall RE, Kellett J, Ippoliti S, Ranbaduge N, Shion H, Yu YQ.采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier可提高RPLC-MS方法分析酸性肽的色谱性能.沃特世应用纪要.720007003ZH.2020年9月.
4. DeLaney K, Ippoliti S, Reid L, Cornwell O, Yu YQ, Harry E, Towers M; 在Xevo™ G3 QToF平台上应用肽图分析和多属性方法(MAM)工作流程执行mAb药品的生物类似药比较.沃特世应用纪要.720007632ZH.2022年5月.
5. Butré CI, D' Atri V, Diemer H, Colas O, Wagner E, Beck A, Cianferani S, Guillarme D, Delobel A. Interlaboratory Evaluation of a User-Friendly Benchtop Mass Spectrometer for Multi-Attribute Monitoring Studies of a Monoclonal Antibody.*Molecules*.2023; 28 (6): 2855.
6. Ranbaduge R, Yu YQ.以精简、合规的工作流程执行肽段多属性方法(MAM).沃特世应用纪要, 720007094ZH .2020年12月.
7. Mouchahoir T, Schiel JE.Development of an LC-MS/MS Peptide Mapping Protocol for the NIST mAb. *Anal and Bioanal Chem*.2018; 410: 2111–2126.
8. Millian-Martin S, Jakes C, Carillo S, Buchanan T, Guender M, Kristensen DB, Sloth TM, Oregaard M, Cook K, Bones J. Inter-laboratory Study of an Optimized Peptide Mapping Workflow Using Automated Trypsin Digestion for Monitoring Monoclonal Antibody Product Quality Attributes.*Anal and Bioanal Chem*.2020; 412: 6833-6848.
9. Evans AR, Hebert AS, Mulholland J, Lewis MJ, Hu P. ID-MAM: A Validated Identity and Multi-Attribute Monitoring Method for Commercial Release and Stability Testing of a Bispecific Antibody.*Anal Chem* .2021; 93 (26): 9166–9173.
10. Song YE, Dubois H, Hoffman M, Eri SD, Fromentin Y, Wiesner J, Pfenninger A, Clavier S, Pieper A, Duhau L, Roth U. Automated Mass Spectrometry Multi-attribute Method Analyses for Process Development and Characterization of mAbs.*J Chrom B*.2021; 1166: 122540.
11. Hao z, Moore B, Ren C, Sadek M, Macchi F, Yang L, Harris J, Yee L, Liu E, Tran V, Ninonuevo M, Chen Y, Yu C. Multi-Attribute Method Performance Profile for Quality Control of Monoclonal Antibody Therapeutics.*J Pharm Biomed Analysis*.2021; 205: 114330.

12. MassPREP肽混合物.沃特世维护和使用手册.715001703 <

<https://www.waters.com/waters/support.htm?lid=10067988&lcid=10067987&type=USRM>> .2014年8月

特色产品

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

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

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

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

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>>

720008051ZH, 2023年9月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号