

评估BioAccord系统部署于开发后期和QC环境中用于肽图分析的性能

Henry Shion, Nilini Ranbaduge, Jonathan Pugh, Robert Lewis, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用简报证明BioAccord系统在遵守传统验证要求的受管制工作流程中进行肽图分析时能够发挥出色的重现性。

优势

使用BioAccord系统进行肽图分析所用工作流程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，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)在表征以外方面的应用，特别是开发后期和QC环境中的属性监测分析。但存在以下问题：需要具备较高技术水平的研究人员来生成和采集数据，并且要求LC-MS平台的稳健性和差异性能够满足在工艺开发和QC实验室中开发MS分析方法的要求。沃特世推出的BioAccord系统是首款目的驱动导向的商用平台，为行业提供了耐用、合规且易部署的高性能生物制药分析LC-MS系统。如大量应用纪要和技术概要所述¹⁻⁹，BioAccord系统能够满足甚至超过上述领域的运行要求。最近的研究着重考察了BioAccord系统在肽图分析工

作流程中所能发挥的重现性，进一步证明了早前进行的完整蛋白质质量数分析所得结果（沃特世应用纪要，720006722）。

结果与讨论

BioAccord系统的构造为配备光学检测器（TUV或FLR）的ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统与ACQUITY RDa质谱检测器（一种紧凑型高性能oa-TOF质谱检测器）在线联用。该系统在waters_connect平台下运行，并由UNIFI科学信息系统提供简化工作流程，可为肽图分析、完整蛋白质质量数分析、游离寡糖分析以及寡聚核苷酸分析实现自动化数据采集、处理和报告。该系统专为常规生物制药分析设计，受管制和非管制实验室均可部署。

肽图分析是确认治疗性蛋白质一级序列并确定特征性模式以及确定产品修饰变体含量的常规方法。能否对低丰度变体进行可靠分析在极大程度上依赖于样品处理和LC-MS仪器性能。因此，耐用、易用且重现性高的LC-MS系统和方法是肽图分析方法开发的关键，该方法可满足监管环境的验证要求。

在本研究中，所有肽图分析实验均采用沃特世单克隆抗体胰蛋白酶酶解物标准品（部件号：[186009126 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion-standard.html)）进行，在样品瓶（装有40 µg经过胰蛋白酶酶解的NISTmAb）中加入200 µL水得到最终浓度为0.2 µg/µL的溶液。将5微升(5 µL)溶液进样到BioAccord系统中进行分析（柱上进样量1 µg）。将Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm X 100 mm色谱柱（部件号：[186002352 < https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002352-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186002352-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html)）加热至65 °C进行肽分离。流动相A和流动相B分别为0.1%甲酸的Milli-Q水溶液和0.1%甲酸的乙腈溶液。在流速0.2 mL/min的条件下，建立流动相A在60 min内从99%降至60%的线性梯度。该分析的总运行时间为75 min（含色谱柱平衡时间）。RDa检测器在包含碎裂功能的ESI正离子全扫描模式下运行（频率2 Hz），数据采集的质量范围为50~2000 *m/z*。锥孔电压为30 V（碎裂锥孔电压从60 V增加至130 V），毛细管电压设定值为1.5 V，脱溶剂气温度保持在500 °C。启用智能数据采集功能，将肽段匹配的质量数偏差设为10 ppm，并将确认性碎片离子的最小数量设为大于3，以此作为附加筛查条件，最大限度减少错误匹配结果。利用UNIFI应用程序中的waters_connect “quantify assay Tof 2D chromatographic” 分析类型对修饰肽的相对丰度进行定量。

图1所示为使用BioAccord系统进行18次肽类物质进样得到的总离子流色谱图(TIC)叠加图，运行时间大约为22 h。18次肽图分析色谱图的叠加图显示了出色的重现性，所有受监测肽的保留时间标准偏差未超过0.09 min，如表1所示。

叠加图, N=18

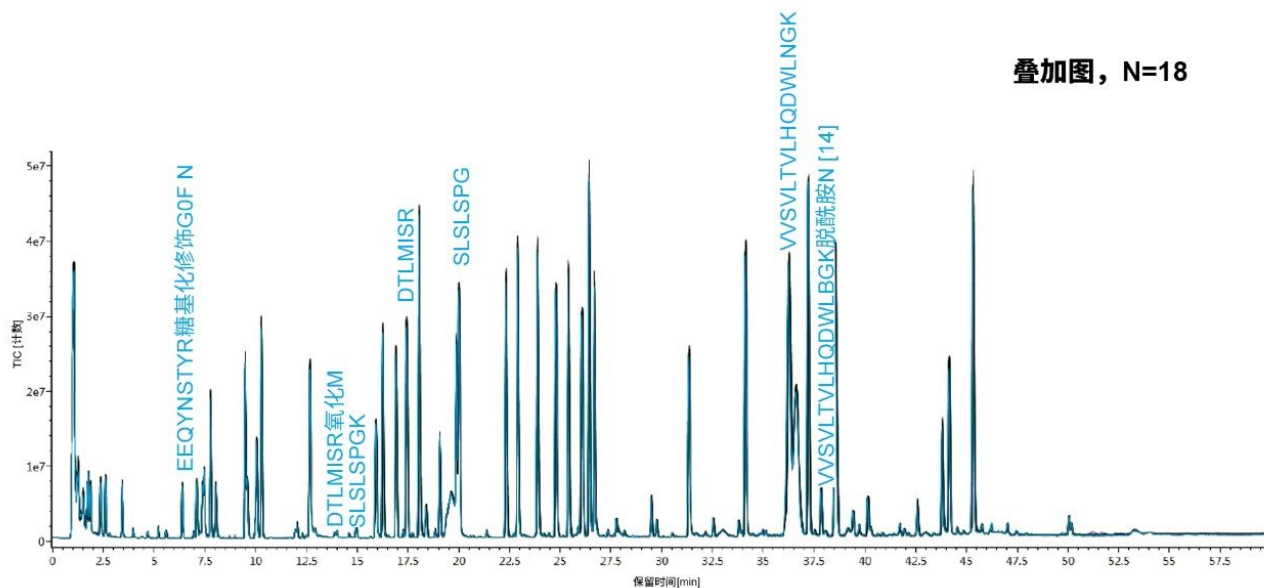


图1.18次进样沃特世单克隆抗体胰蛋白酶酶解物标准品 (NISTmAb胰蛋白酶酶解物) 得到的总离子流色谱图(TIC) 叠加图表明, 前端配备ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统的BioAccord系统在采用缓梯度方法时为肽类物质实现了可重现的色谱分离效果, 图中标示了部分肽及其对应的PTM产物。

研究类型	保留时间标准偏差	相对丰度% RSD
保留时间	未超过0.09 min	-
受监测肽相对丰度	-	未超过8.12%

表1.利用3个BioAccord系统所得数据测得的肽保留时间和相对修饰水平(%)的实验结果

。

为证明BioAccord系统在可靠检测肽修饰水平方面的性能, 分析时以一组内源性肽及其对应的修饰肽为目标进行了相对定量。

上述肽包括糖肽EEQYNSTYR (含G0F、G1F和G2F)、DTLMISR (M氧化) 和VWSVLTVLHQDWLNGK (N脱酰胺)

)，如图1所标示。

另外2个BioAccord系统上也进行相同的LC-MS分析（18次进样），3个系统的肽保留时间结果相当。结果表明，3个系统间所有受监测肽的保留时间标准偏差小于等于0.09 min (5.4 s)。

利用3个系统生成的数据集对同一组肽绘制相对丰度图（图2），结果表明部分糖肽的相对丰度存在一些小幅的系统间波动。但在MS响应存在明显差异的肽类物质中，所有受监测肽的%RSD计算结果均未超过8.12%。

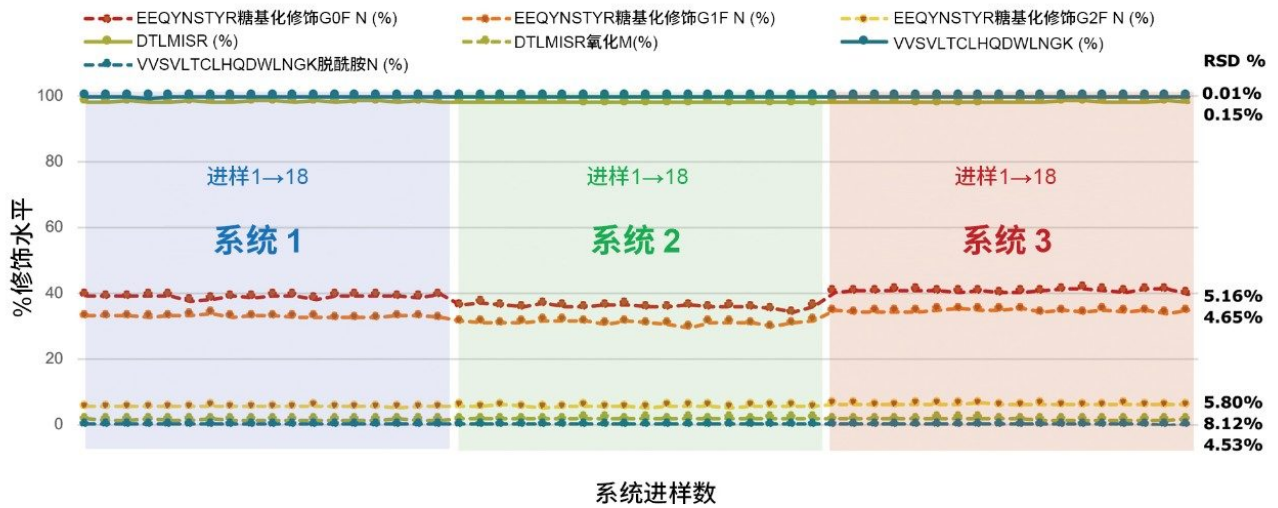


图2.利用3个BioAccord系统生成的数据绘制肽类物质（内源性肽和修饰肽）相对丰度图。平均%RSD的计算结果未超过8.12%，表明LC保留时间的重现性满足自动分析要求，且不同平台间肽修饰水平的MS响应测定结果相当。

结论

系统间和系统内研究表明，BioAccord系统适用于监管环境下的肽图分析（依据在3个系统上各进行18次进样所生成的数据）。所有受监测肽的保留时间标准偏差均小于0.09 min，在信号强度不同的肽中，所有受监测修饰肽的相对丰度的平均%RSD均未超过8.12%。

与我们之前进行的系统间和系统内完整蛋白质质量数分析性能研究所得的结果一致⁹，BioAccord系统生成的肽图分析数据足以支撑在后期开发阶段和QC机构中部署可靠的MS分析方法。

参考文献

1. Shion, H.等人, *Enabling Routine and Reproducible Intact Mass Analysis When Data Integrity Matters* (《在数据完整性环境下进行可重现的完整蛋白质质量数例行分析》), 沃特世应用纪要, [720006472](#), 2019.
2. Ranbaduge, N.等人, *Routine Peptide Mapping Analysis using the BioAccord System* (《使用BioAccord系统进行常规肽图分析》), 沃特世技术简报, [720006466](#), 2019.
3. Zhang, X.等人, *Released N-linked Glycan Analysis Using the BioAccord System* (《使用BioAccord系统进行游离N-糖分析》), 沃特世技术简报, [720006474](#), 2019.
4. Shion, H.等人, *A Platform Method for the Molecular Mass Analysis of the Light Chains and Heavy Chains of Monoclonal Antibodies using the BioAccord System* (《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, [720006529](#), 2019.
5. Zhang, X.等人, *Increasing Productivity and Confidence for N-linked Glycan Analysis of Biosimilars Using the BioAccord System* (《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, [720006545](#), 2019.
6. Shion, H.等人, *Analysis of Antibody Drug Conjugates (ADCs) by Native Mass Spectrometry on the BioAccord System* (《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, [720006570](#), 2019.
7. Ranbaduge, N.等人, *Establishing an Integrated Peptide Attribute Profiling and Monitoring Workflow for Improved Productivity and Confidence* (《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, [720006602](#), 2019.
8. Ippoliti, S.等人, *Online IEX-MS of mAb Charge Variants Using a BioResolve SCX mAb Column, IonHance CX-MS pH Concentrates, and BioAccord System* (《使用BioResolve SCX色谱柱、IonHance CX-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, [720006672](#), 2019.
9. Shion, H.等人, *Evaluating BioAccord LC-MS System Performance for Deployment of a Compact, SmartMS-Enabled Biopharma Solution in Late Stage Development and QC Environment - Intact Mass Analysis* (《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环境中用于完整蛋白质质量数分析的性能》), 沃特世技术简报, [720006722](#), 2020.

特色产品

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

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

[专为生物制药应用打造的BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135005818)

720006831ZH, 2020年4月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私声明](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)