

借助ACQUITY Premier LC平台增强各生物制药实验室的一致性

Robert E. Birdsall, Jacob Kellett, Ximo Zhang, Ying Qing Yu

Waters Corporation

这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

药品生命周期管理经常会涉及到新技术的评估。评估过程通常需要开展研究以确保新技术的性能和结果与传统方法相当，从而确保数据连续性。搭载MaxPeak高性能表面的ACQUITY Premier LC系统最近作为一种灵活的液相色谱平台推出以支持开发和生产活动。本研究使用传统HILIC方法评估了ACQUITY Premier系统在不同LC平台上的重现性。游离寡糖分析结果表明，当在两套ACQUITY Premier LC系统之间迁移以及与旧数据相比时，分析结果均相当。研究观察到峰面积%相当，不同LC平台之间糖基物质的相对峰面积差异小于0.5%，与waters_connect内科学数据库中的旧数据相比，计算出的葡萄糖单位(GU)值相差不超过0.1个单位。不同LC平台之间以及与传统方法相当的结果表明，ACQUITY Premier LC系统非常适合支持生物制药开发和生产中的分析需求，并且兼容传统方法。

优势

搭载MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier具有以下优势：

- 可在不同平台上获得相当结果
- 兼容传统方法以及科学数据库

- 灵活适用上游和下游实验室活动

简介

随着候选药物的开发和生产从早期阶段进展到后期阶段，生物制药行业经常在不同LC平台之间迁移方法。这一现象的部分原因在于设计，实验室的仪器需求因组织而异。在候选药物研发流程的各个阶段，我们都需要确定并监控关键质量属性(CQA)，以确保生产过程的一致性以及药品的安全性和有效性。因此，要求分析方法必须能够在不同的实验室提供一致且准确的结果，因为可接受标准一经验证就不能轻易更改。

沃特世近期推出了搭载MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier LC系统，这是一种灵活的液相色谱平台，可以轻松地跨实验室部署以支持开发和生产活动，并且对金属敏感分析物具有更高的色谱性能。这一优势通过引入创新的MaxPeak HPS技术来实现，该技术旨在大幅减少液相色谱流路中金属敏感分析物的分析物/表面相互作用¹⁻³。本研究的目的是证明ACQUITY Premier LC技术稳定耐用，可跨LC平台提供一致的结果，非常适合支持同一组织内各实验室的分析需求。评估过程在两个ACQUITY Premier LC平台之间比较了HILIC方法，以此代表方法在支持实验室之间的转移。

结果与讨论

生物治疗药物的糖基化会影响药物的安全性、有效性和稳定性，因此，随着方法在产品流程中迁移，通常使用指定为CQA的特定糖基种类来监测糖谱⁴。糖基化评估通常采用亲水作用色谱(HILIC)结合荧光(FLR)和/或质谱检测分析游离N-糖和荧光标记N-糖的方式进行，以提供全面信息，包括糖基物质的鉴定和相对丰度^{5,6}。

这些方法部分依赖于科学数据库或在线数据库进行糖基鉴别。因此，不同LC平台的结果需要保持一致，才能有助于对比并确保与传统方法的数据连续性。鉴于此要求，我们将采用基于既有Waters GU数据库的HILIC方法，评估ACQUITY Premier LC系统在不同LC平台上提供一致结果的能力。

简而言之，使用ACQUITY Premier BEH Amide糖基分析柱, 1.7 μm , 130 Å, 2.1 x 150 mm (部件号186009524 < <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009524-acquity-premier-glycan-beh-amide-130a-17--m-21-x-150-mm-column-1.html>>)，梯度设置为每分钟增加0.6%流动相B持续35分钟，在两种不同的ACQUITY Premier LC系统上分离RapiFluor-MS糖基性能测试标准品 (部件号186007983 <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186007983-rapifluor-ms-glycan-performance-test-standard.html>)。使用配备ACQUITY Premier LC的BioAccord系统作为开发游离寡糖分析方法的LC平台。采用waters_connect信息学平台控制BioAccord系统，该平台内集成了游离寡糖分析工作流程和数据库，能够轻松鉴别各糖基物质（实验详情参见应用纪要720007261ZH）。我们在Empower 3控制的ACQUITY Premier LC系统上实施了相同的分析方法，以此代表方法转移后的支持实验室中的系统。该系统在荧光检测器后方在线配置了ACQUITY QDa质谱检测器，用作正交检测技术采集补充质谱数据。我们使用糖基化谱图、相对丰度、RT和GU值作为评估系统之间可比性的指标。

如图1所示，糖基化谱图的定性评估表明，两个平台在峰强度、保留时间和检出的物质方面表现出高度可比性。经过仔细检查，观察到两个LC平台之间的峰面积保持良好，计算发现，相同糖基物质在不同平台之间的峰面积百分比差异<0.5%（图2）。在两个平台上观察到高度相似的峰面积表明，对于给定的分析方法，ACQUITY Premier LC系统能够在不同LC平台上得到一致的结果，这对受法规监管的实验室而言是非常重要的品质，这些实验室对方法的稳定性和准确度要求较高，并且经常需要将分析方法部署到不同的实验室。进一步检查数据后发现，在Empower/ACQUITY QDa系统上执行相同方法时，如平台之间的保留时间对比图中的y截距偏移所示（图3），系统保留偏移仅0.08分钟，可忽略不计。该偏移可能归因于系统延迟体积的微小变化和/或流动相组成等方法差异。这些差异虽小，但也可以使用参比标准品来纠正，以归一化响应并促进跨平台和/或历史数据的直接比较。

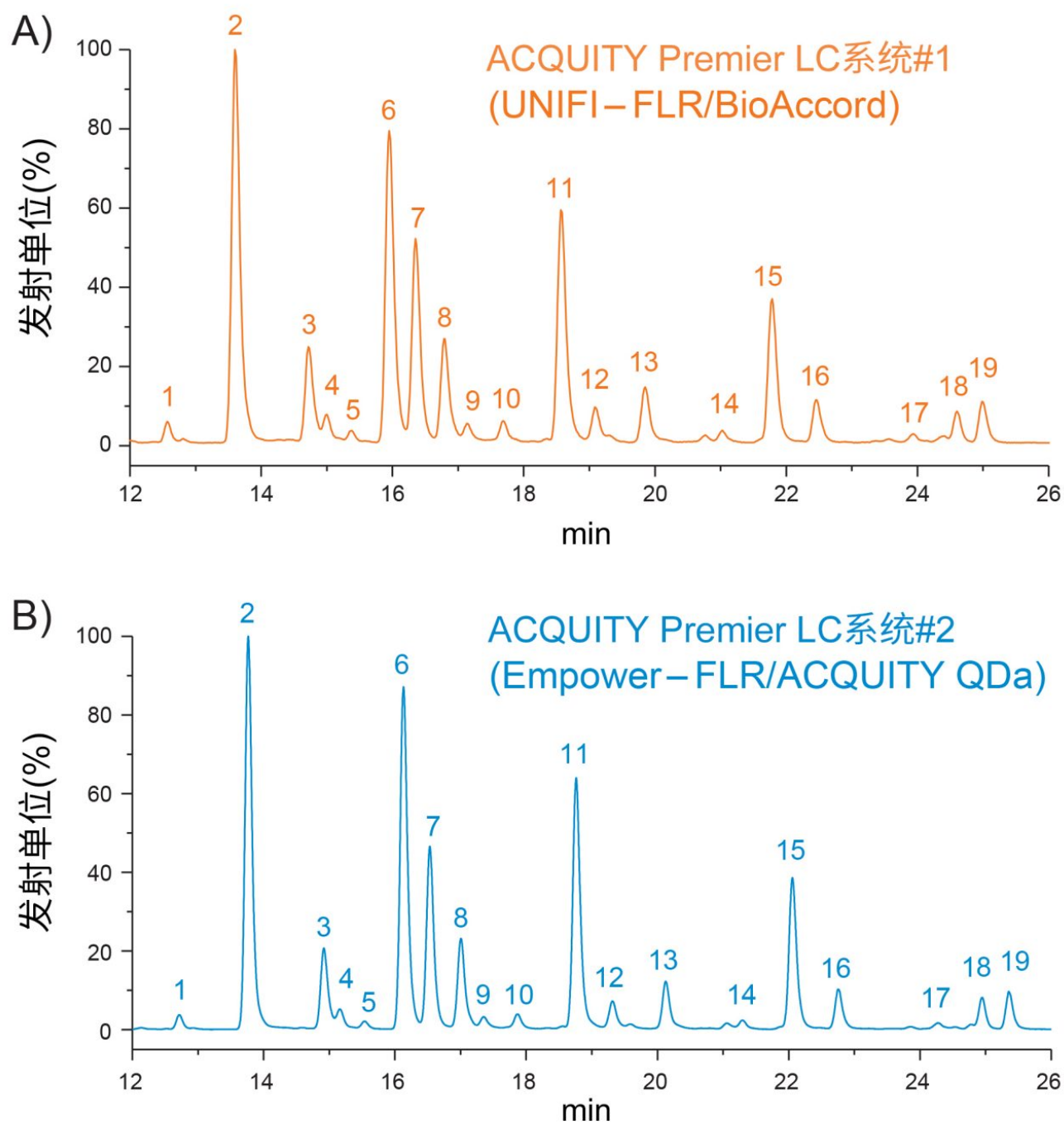


图1.比较在两套不同的ACQUITY Premier LC系统上获得的RFMS糖基性能测试标准品FLR色谱图，两套系统分别配备A)运行waters_connect信息学平台的BioAccord系统或B)ACQUITY QDa质谱检测器和Empower 3 CDS。

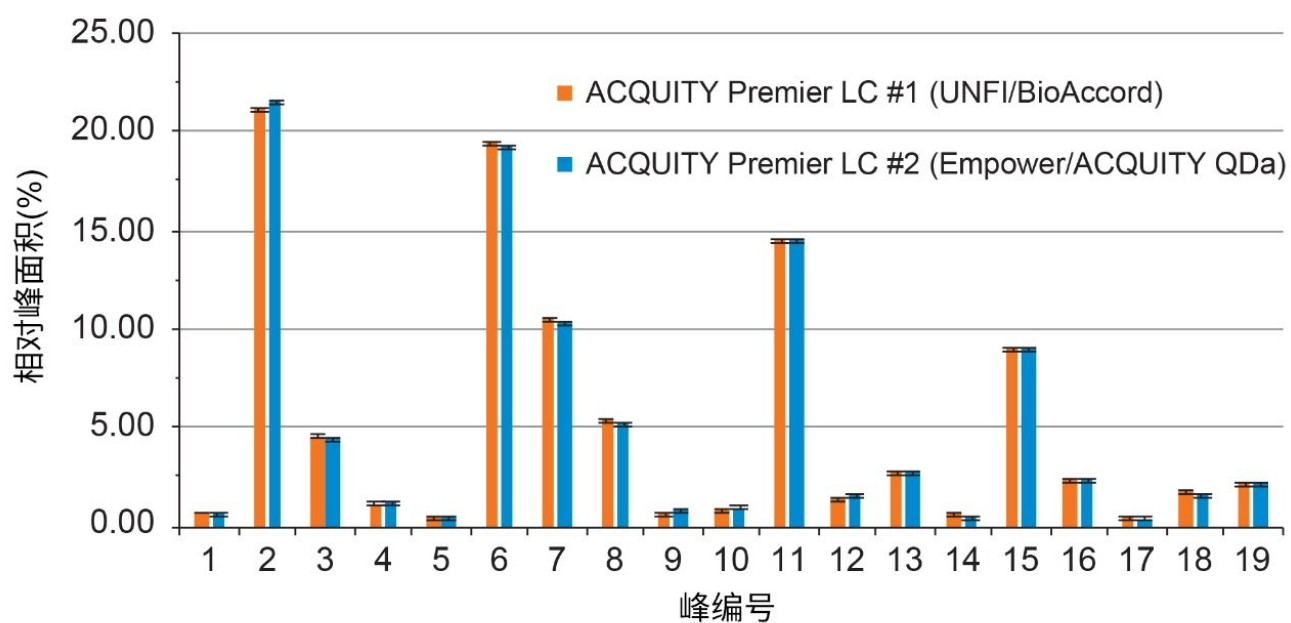


图2.比较配备BioAccord LC-MS的ACQUITY Premier系统（橙色）与配备ACQUITY QDa的ACQUITY Premier系统（蓝色）之间的RFMS糖基标准品相对峰面积百分比。两套系统之间的峰面积百分比差异<0.5%。

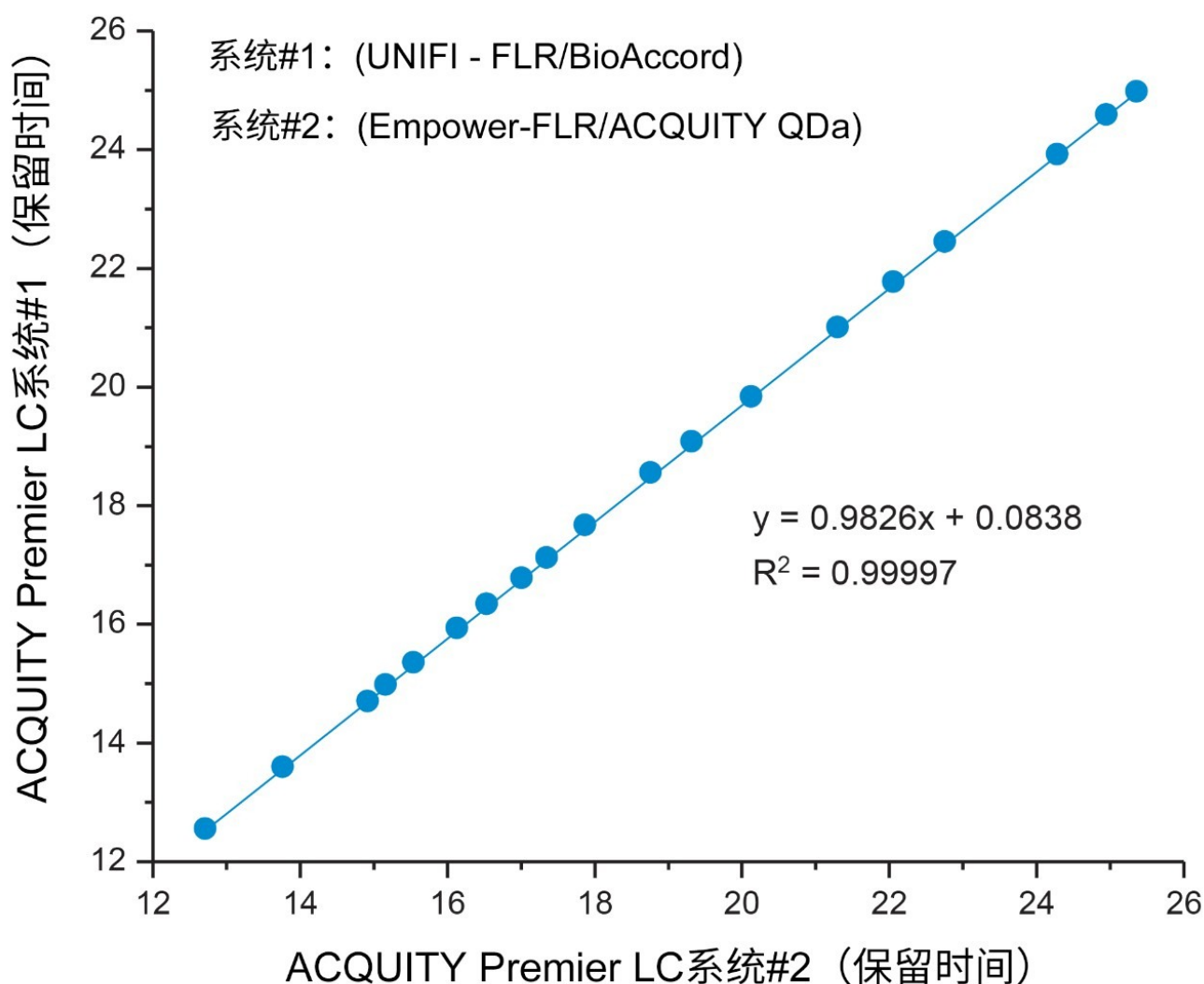


图3.RFMS糖基性能测试标准品19个峰的保留时间比较

为了证明这一原理，我们采用葡聚糖校准曲线标准品，通过Waters GU数据库方法根据保留时间（数据未显示）生成葡萄糖单位(GU)值。如表1所示，两个平台生成的GU值表现出高度可比性，不同系统之间以及与Waters GU数据库预期值之间的差异小于0.1。GU值是Waters GU数据库的一个组成部分，旨在结合质量数信息促进糖基峰的鉴别⁷。例如峰11 (GU=7.44)，在ACQUITY QDa质谱检测器采集的质谱图中观察到它的电荷态为1051 m/z （图4插图）。参考表1可知，该值与Waters GU数据库的质量数信息高度吻合，对应于FA2G2糖基物质（平均质量数 = 2100 Da）的 $[M]^{+2H}$ 电荷态，进一步说明ACQUITY Premier LC技术可以提供与传统方法相当的结果，确保产品生命周期内的数据连续性。总体而言，这些结果证明ACQUITY Premier LC技术性能稳定，能够在不同的LC平

台上提供一致结果，以支持实验室的开发和生产活动。

峰	糖基	分子式 (带RFMS标记)	平均分子量 (带RFMS标记)	预期 GU	Empower GU	BioAccord GU	Δ (GU)	Empower (%峰面积)	BioAccord (%峰面积)	Δ (%峰面积)
1	A2	C ₆₇ H ₁₀₅ N ₉ O ₃₇	1628.6	5.46	5.51	5.50	-0.01	0.74	0.76	-0.02
2	FA2	C ₇₃ H ₁₁₅ N ₉ O ₄₁	1775.7	5.79	5.83	5.81	-0.02	21.51	21.17	0.34
3	FA2B	C ₈₁ H ₁₂₈ N ₁₀ O ₄₆	990.0	6.12	6.19	6.16	-0.03	4.51	4.57	-0.05
4	A2G1	C ₇₃ H ₁₁₅ N ₉ O ₄₂	1791.7	6.25	6.26	6.25	-0.01	1.18	1.14	0.03
5	A2G1	C ₇₃ H ₁₁₅ N ₉ O ₄₂	1791.7	6.29	6.38	6.37	-0.01	0.43	0.42	0.01
6	FA2G1	C ₇₉ H ₁₂₅ N ₉ O ₄₆	1937.9	6.53	6.57	6.55	-0.02	19.26	19.48	-0.22
7	FA2G1	C ₇₉ H ₁₂₅ N ₉ O ₄₆	1937.9	6.66	6.70	6.68	-0.02	10.40	10.47	-0.07
8	FA2BG1	C ₈₇ H ₁₃₈ N ₁₀ O ₅₁	2141.1	6.80	6.85	6.83	-0.02	5.28	5.37	-0.09
9	FA2BG1	C ₈₇ H ₁₃₈ N ₁₀ O ₅₁	2141.1	6.91	6.97	6.94	-0.03	0.81	0.76	0.05
10	A2G2	C ₇₉ H ₁₂₅ N ₉ O ₄₇	1953.9	7.10	7.14	7.13	-0.01	0.94	0.91	0.03
11	FA2G2	C ₈₅ H ₁₃₅ N ₉ O ₅₁	2100.0	7.43	7.44	7.43	-0.01	14.46	14.48	-0.02
12	FA2BG2	C ₉₃ H ₁₄₈ N ₁₀ O ₅₆	2303.2	7.61	7.64	7.61	-0.03	1.65	1.43	0.22
13	FA2G1S1	C ₉₀ H ₁₄₂ N ₁₀ O ₅₄	2391.3	7.84	7.93	7.88	-0.05	2.79	2.73	0.06
14	A2G2S1	C ₈₉ H ₁₄₃ N ₁₀ O ₅₅	2244.1	8.40	8.36	8.32	-0.04	0.54	0.59	-0.05
15	FA2G2S1	C ₉₆ H ₁₅₂ N ₁₀ O ₅₉	2391.3	8.55	8.65	8.60	-0.05	8.97	9.02	-0.05
16	FA2BG2S1	C ₁₀₄ H ₁₆₅ N ₁₁ O ₆₄	2594.5	8.82	8.92	8.87	-0.05	2.32	2.31	0.01
17	A2G2S2	C ₁₀₀ H ₁₆₀ N ₁₁ O ₆₃	2535.4	9.42	9.54	9.47	-0.07	0.39	0.41	-0.02
18	FA2G2S2	C ₁₀₇ H ₁₆₉ N ₁₁ O ₆₇	2682.5	9.69	9.82	9.75	-0.07	1.71	1.76	-0.06
19	FA2BG2S2	C ₁₁₅ H ₁₈₂ N ₁₂ O ₇₂	2884.7	9.86	10.00	9.92	-0.08	2.11	2.20	-0.09

表1.比较糖基物质的预期GU值（*UNIFI*科学数据库）以及在配备*ACQUITY Premier LC*并运行 *waters_connect*的*BioAccord*系统或配备*ACQUITY QDa*并运行*Empower 3*的*ACQUITY Premier*系统上采集的相对峰面积的汇总表。经计算，两套系统之间的GU值差异<0.1。峰面积百分比差异<0.34%，表明系统间可比性高。

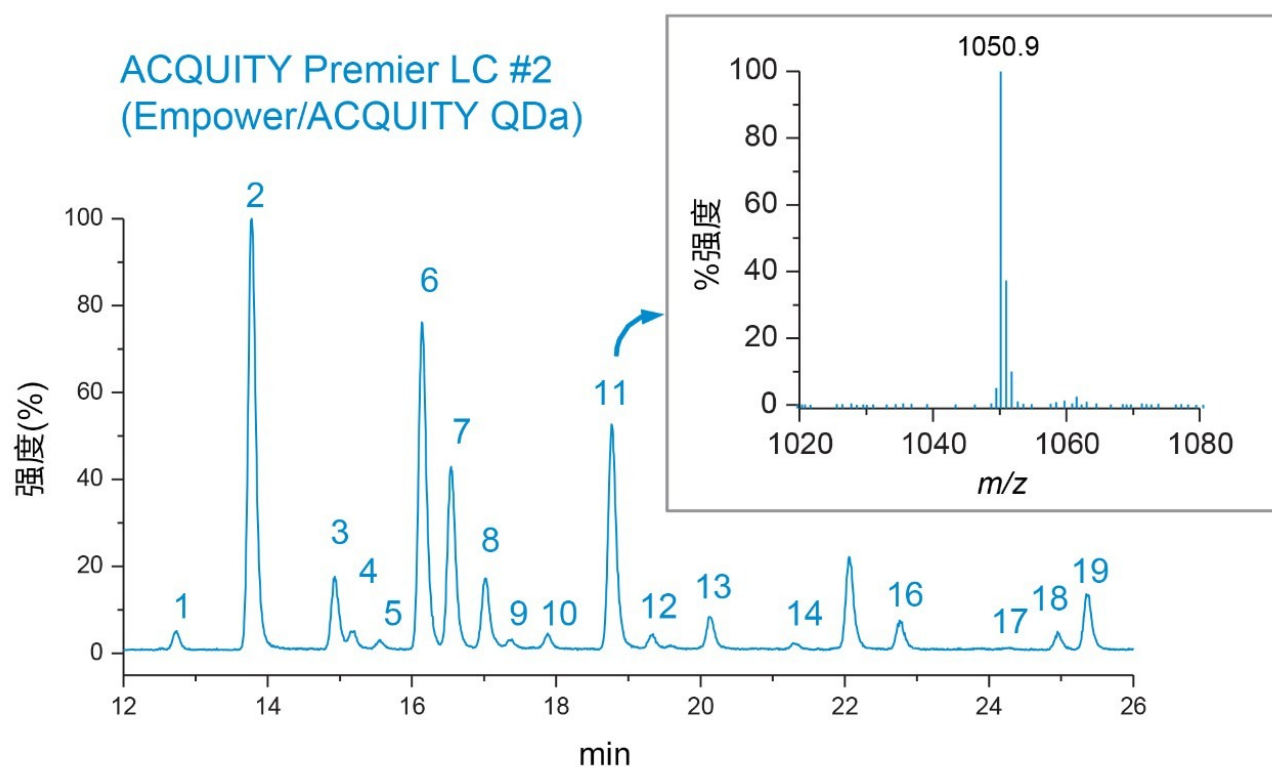


图4.使用ACQUITY QDa质谱检测器采集的补充质谱数据为峰鉴定提供了正交确认。峰11的电荷态1051 m/z 与FA2G2糖基物质的 $[M]+2H$ 电荷态高度吻合。ACQUITY QDa数据通过正离子模式TIC扫描在350–1250 m/z 范围内收集。探头温度：400 °C；毛细管电压：1.5 kV；锥孔电压：15 V；数据采集速率：2 Hz。

结论

生物制药行业中的液相色谱仪器组合通常涵盖性能和规格各不相同的多种配置。在方法生命周期管理过程中有必要评估仪器在不同LC平台上提供一致和相当结果的能力。本研究表明，ACQUITY Premier LC系统能够在两种不同的ACQUITY Premier LC系统之间重现HILIC分析的结果，同时可提供与传统方法相当的性能。在峰面积百分比、保留时间和GU计算值方面观察到的高度一致性证明，ACQUITY Premier系统非常适用于生物制药的开发和生产活动。

参考资料

1. Delano, *et al.* Using Hybrid Organic-Inorganic Surface Technology to Mitigate Analyte Interactions with Metal Surfaces in UHPLC. *Anal. Chem.* 2021, 93, 14, 5773–5781.
2. Birdsall *et al.* Reducing Metal-Ion Mediated Adsorption of Acidic Peptides in RPLC-Based Assays using Hybrid Silica Chromatographic Surfaces. *Journal of Chromatography B.* 2021; 1179.
3. Liu X., Lauber M. MaxPeak高性能表面技术改善游离N-糖的HILIC分析. 沃特世应用纪要, 2021. [720007263ZH](#)。
4. Higel F, *et al.* N-glycans of Complex Glycosylated Biopharmaceuticals and Their Impact on Protein Clearance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2019; 139, 123–131.
5. Yu, Y. 将新型游离寡糖标记试剂RapiFluor-MS与集成式UPLC-FLR/QToF MS系统相结合用于分析低丰度N-糖. 沃特世应用纪要, 2015. [720005383ZH](#).
6. Zhang X, Reed C, Shion H, Alley W, Birdsall R, Yu Y. 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. 沃特世应用纪要, 2019. [720006545ZH](#).
7. Zhang X, Kellett J, Birdsall R, Yu Y. 使用配备MaxPeak高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier解决方案改善生物治疗药物开发中的游离N-糖分析. 沃特世应用纪要, 2021. [720007261ZH](#).

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

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

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

720007415ZH, 2021年11月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.