

利用Empower™软件简化和自动检测生物制药肽图中的样品间差异

Kellen DeLaney, Robert E. Birdsall, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

高效的数据分析对于高通量生物制药工作流程至关重要，可尽可能缩短分析时间，同时为用户提供相关信息。

Waters Empower色谱数据系统(CDS)支持从数据采集到报告生成的工作流程中的所有步骤。它还提供了强大的、可定制的功能，能够满足从工艺开发到质量控制的各类分析需求。本研究展示了Empower软件如何用于整个生物制药工作流程。以英夫利昔单抗为例，采用肽图分析数据和自定义字段的二元比较来促进工艺控制参数的快速评估。目标属性基于峰比率以及它们与参比样品分析相比是否存在来选择。一旦鉴别出产品质量属性(PQA)，则将其转移至Empower软件的集成式杂质监测工作流程中，以便使用靶向高通量液相色谱(LC)方法进行快速监测和报告。该比较方法为用户提供了一种能够以无缝且合规的方式部署的工作流程，以支持药物开发和生产活动。

优势

- 配备QDa™质谱检测器的ACQUITY™ Premier LC系统能够为肽图分析工作流程提供灵敏且可重现的结果
- Empower软件提高了数据分析效率，可快速鉴别并监测目标属性
- 比较工作流程可快速适应下游活动，促进高效的技术转移

简介

在生物制药工作流程中，易于部署和评估的方法对于及时提供结果至关重要。在该过程中，一个经常被忽视的瓶颈是数据分析。传统上，数据分析一直很繁琐，并且通常涉及采用多个软件平台以获得有意义的结果。在蛋白质类生物治疗药物的表征、开发和生产中通常所依赖的肽图分析中，尤其如此。这些分析通常需要用户干预才能完成数据分析，这会减慢审查流程，降低结果的一致性，并增加报告结果出错的风险。基于这些原因，非常需要能够在整个组织中广泛部署并以自动化方式执行的软件平台。

Waters Empower CDS是一款强大的合规软件平台，可轻松用于受法规管制和不受管制的制药环境中。这款单一平台简化了从数据采集到报告生成的流程，使用户可以轻松地调整、转移和执行从开发到生产的工作流程，提高效率，实现对质量属性的快速评估和监测。

本文展示了Empower信息学工具如何简化数据分析并自动执行在肽图分析中凸显样品间差异的任务。以英夫利昔单抗为例，展示了如何鉴别目标属性并将其迁移至QC或生产环境中，以在Empower软件中监测特定属性。这些结果展示了Empower软件如何能够轻松用于生物制药工作流程中，从而缩短分析时间、提高结果准确度并实现更高效的分析。

实验

将Remicade®（英夫利昔单抗）样品在37 °C下温育0周（无降解）、1周或2周。然后将样品还原、烷基化、脱盐、胰蛋白酶酶解并用0.1%甲酸酸化。基于肽分析测得的最终浓度为0.16 µg/µL。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY Premier UPLC™ BSM、配有色谱柱管理器的FTN样品管理器
检测：	ACQUITY Premier TUV；10 mm分析型流通池 ； 波长 = 214 nm

样品瓶：	采用MaxPeak™ HPS的QuanRecovery™样品瓶 (部件号：186009186)
色谱柱：	ACQUITY™ Premier CSH™ C ₁₈ 1.7 μm, 2.1 × 100 mm
柱温：	60 °C
样品温度：	8 °C
进样体积：	10 μL
流速：	0.200 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸水溶液 (LCMS级)
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液 (LCMS级)

降解研究的梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.200	95.0	5.0	初始
6.25	0.200	95.0	5.0	6
41.25	0.200	60.0	40.0	6
47.50	0.200	35.0	65.0	6
56.25	0.200	35.0	65.0	6
62.50	0.200	95.0	5.0	6
80.00	0.200	95.0	5.0	6

靶向LC方法的梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.200	92.0	8.0	初始
2.00	0.200	92.0	8.0	6
6.50	0.200	88.5	11.5	6
8.50	0.200	85.0	15.0	6
10.25	0.200	35.0	65.0	6
12.00	0.200	35.0	65.0	6
13.75	0.200	95.0	5.0	6
15.50	0.200	95.0	5.0	6

SIR值

肽	<i>m/z</i>
HC:T22	418.2
HC:T22 [氧化]	426.2
HC:T42	561.4
HC:T42 [氧化]	564.6
HC:T38	849.2

HC:T38 [脱酰胺]	849.6
HC:T07	469.6
HC:T07 [脱酰胺]	469.9

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY QDa
电离模式：	正扫描
采集范围：	350-1250 <i>m/z</i>
毛细管电压：	1.5 kV
锥孔电压：	15 V

数据管理

软件：	Empower 3 FR4
-----	---------------

结果与讨论

强制降解常用于制药行业，以支持用于工艺控制、杂质分析、稳定性和质量放行分析的分析方法的开发¹。通常，降解因素（热、化学或机械）比产品预期遇到的条件更极端，以加速降解过程并提高杂质水平，从而更轻松地进行检测和表征。对于生物药物，这些研究同时以自上而下（完整/亚基）和自下而上（肽）的方式进行，以对可能影响有效性和安全性的产品质量属性(PQA)提供补充见解。在药品从开发到生产流程的各个阶段，关键质量属性(CQA)是对产品安全性和有效性至关重要的PQA，在下游质量控制(QC)工作流程中得到鉴别和积极监测。鉴于这些

分析在生物药物的开发和生产中发挥关键作用，我们进行了压力测试实验，以展示Empower软件工具如何支持和自动完成这些类型的工作流程中的数据分析。

需要能够适应高通量分析的仪器，以尽可能提高生物制药实验室的工作效率。分析灵敏度对于确保在方法向下游迁移时能够观察并准确监测所有目标属性也很重要。最后，分析重现性至关重要，因为需要一致的结果以支持分析验证并避免不合格事件。之前的研究已经表明，ACQUITY Premier系统（BSM配置）能够在同时适合工艺开发（分离度更高的长时间梯度）和生产环境（通量更高的短时间梯度）的条件下为肽图分析应用提供高重现性结果²。同一研究还证明，ACQUITY QDa质谱检测器非常适合检测低丰度物质，且动态范围涵盖多个数量级。基于这些原因，将Premier UPLC BSM平台与紫外(UV)和质谱(MS)检测器两者配合使用以生成数据，展示基于Empower的方法如何适用于基于UV或MS的工作流程。

使用该LC-UV/MS平台所获得的性能如图1所示，该图显示了英夫利昔单抗酶解物重复进样三次所得到的叠加色谱图。色谱图显示峰对齐，而无需使用保留时间对齐等预处理步骤。与先前报道的结果相似，大多数肽的保留时间标准偏差小于1 s，平均标准偏差为0.45 s，或相对标准偏差为0.06%。此外，ACQUITY QDa质谱检测器在这种联用配置中提供了更高的灵敏度和更宽的动态范围，能够对载样量为10 pg或更低的肽进行可重现的定量（图2A），其特别适用于监测通常以比天然肽低几个数量级的强度存在的低丰度修饰或杂质。经过修饰的肽通常仅以其天然形式的丰度的1%至5%存在，这使得它们难以用紫外检测器进行检测。因此，一旦鉴别出目标属性，即可通过全MS扫描或选择离子记录(SIR)扫描根据其质量数（ m/z 值）进行追踪，提高灵敏度和选择性（噪音干扰极小），如图2B所示³。使用本文提出的系统配置观察到了可重现的性能，这使得ACQUITY Premier系统成为灵活的UPLC平台的理想选择，该平台可部署在上游（基于MS）和下游（基于UV）实验室中，以开展比较研究和实验室间方法迁移。

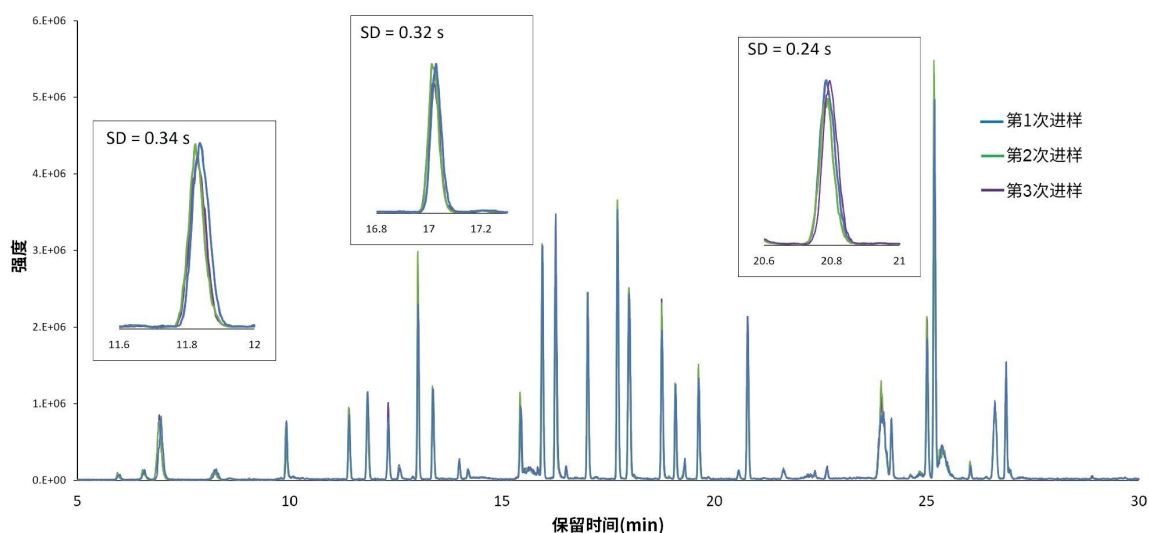


图1.在ACQUITY Premier BSM上运行3次英夫利昔单抗重复进样得到的叠加图。显示了3次肽进样的保留时间标准偏差。

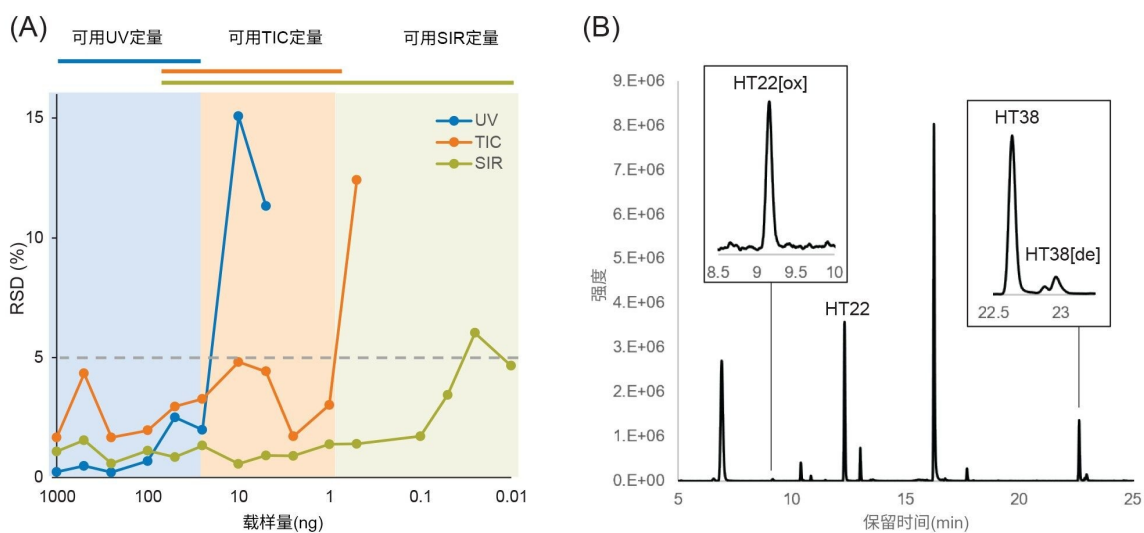


图2.使用MS检测所提高的灵敏度证明，包括(A)各检测器的定量灵敏度，基于合成T22标准品在各种载样量下重复进样5次的结果，图表上方的线条表示各检测器的线性定量动态范围，(B)选定肽属性的SIR-MS色谱图，其中插图展示了对低丰度属性的高灵敏度检测的示例。[ox]表示氧化；[de]表示脱酰胺。

虽然肽图分析研究提供了有关影响生物治疗药物安全性和有效性的属性的关键见解，但处理mAb胰蛋白酶酶解物图谱中检测到的数百种或更多组分的大量数据可能非常耗时，并且需要人工干预，由此降低了工作效率。用户可以使用Empower软件生成自定义字段，简化并自动完成数据分析。在强制降解研究中，需要比较对照样品与降解样品之间肽丰度的变化。传统上，此类分析可能涉及将每次进样的数据导出到外部软件（例如电子表格），这会破坏合规性并且需要用户干预来处理数据。

但是，在Empower软件中，可以设置自定义字段来自动计算降解样品与对照样品之间的峰面积比并报告该值。图3A显示了这一简单的自定义字段的设置方法。然后可以使用第二个枚举自定义字段将这些信息提炼为一个简单的“注释”，其指示肽与参比色谱图相比是增加、减少、新增还是缺失（图3B）。为进一步简化比较，本文提出的方法应用筛选器以仅显示有关独特和/或超过用户定义强度比阈值的肽的信息。由此无需手动筛选大体相似的数据表，并降低了在大型或复杂数据集中忽略结果的风险。使用该比较工作流程所得到的结果示例如图4所示。

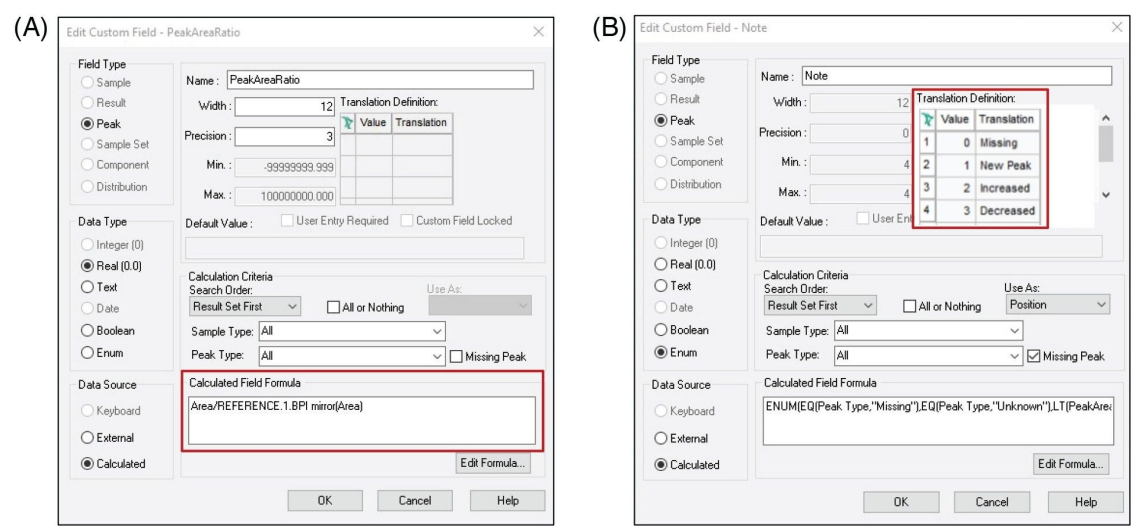


图3.用于计算(A)样品与参比品之间的峰面积比以及(B)评估是否超过阈值的注释的自定义字段。有关如何输入自定义字段的公式的指南，请联系当地的沃特世代表。

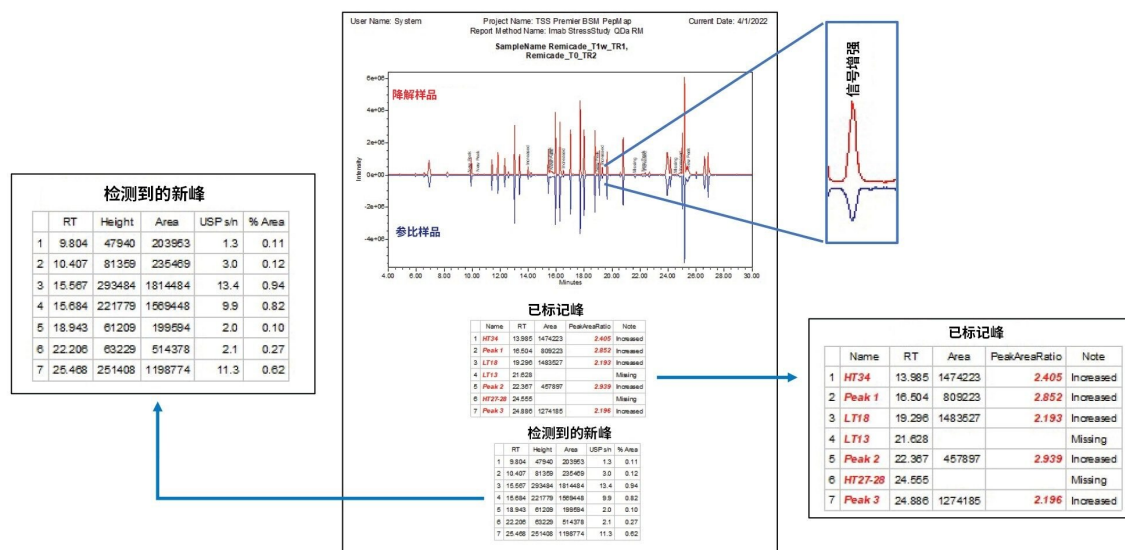


图4.在英夫利昔单抗降解研究中生成的自定义Empower报告，显示了1周降解样品与0周降解参比样品的比较。

如图4所示，通过生成二元比较图，在色谱图中显示了降解样品与参比样品之间的差异。沿水平轴反映参比样品，创建每个峰的并排比较，其中目标峰标记有“注释”自定义字段，以便轻松查看样品差异。色谱图下方的表格数据列出了基于用户自定义标准的标记峰及其相关信息。生成一个额外的表来记录在降解样品中检测到的新峰，这些峰不存在于参比样品中，因此用户可以根据这些峰鉴别潜在的杂质或新的降解产物。在本例中，如图所示，经鉴别，监测的41个峰中有7个峰缺失或超出变化阈值（与参比样品的差异小于0.5倍或大于2倍），并且检测到参比中不存在的7个新峰。通过视图和表格数据的并排显示，用户可以快速查看结果并确定目标数据点。总而言之，该策略以能够根据分析需求进行定制的方式加快了样品处理，并且可以轻松适应需要更具针对性的分析的下游活动。

将强制降解方法迁移至稳定性或工艺开发类型的工作流程，其中需要快速分析大量样品并快速评估关键属性和杂质。在本例中，如图5A所示，将80 min强制降解方法浓缩为15.5 min聚焦梯度，以监测两种肽及其相关的氧化形式，代表需要监测的CQA。LC方法能够使这些肽获得基线分离，从而支持使用更适合QC的UV检测器。保留时间的标准偏差为0.16 s，且峰面积的相对标准偏差为1%，表明该靶向方法用于这些目的时具有足够高的重现性。设置自定义字段以将肽与参比样品进行比较，并以与强制降解研究中类似的方式鉴别新峰。已启用Empower使用“杂质”选项卡汇总杂质结果的功能，如图5B所示。这支持根据监管指南设置杂质阈值，从而简化数据分析和报告，而无需对其他自定义字段进行编程^{4,5}。

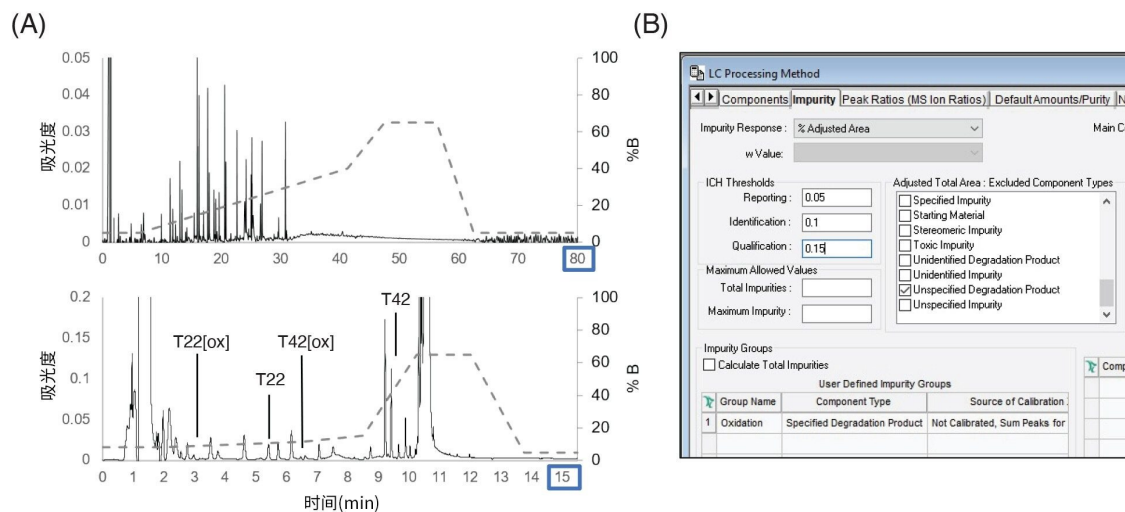


图5.用于快速监测低丰度属性的靶向LC梯度。(A) (上图) 用于降解研究的原始80 min梯度和 (下图) 用于监测2种肽 (T22和T42) 的氧化水平的15.5 min靶向梯度的色谱图。(B) Empower软件中的“杂质”选项卡，能够监测已知杂质。

此类工作流程的报告如图6所示，其中“未知”样品和参比样品均为英夫利昔单抗样品，添加的修饰肽浓度不同。如图所示，该方法对于MS和UV检测器均适用。“已标记肽”和“检测到的新峰”表基于与强制降解研究相同的字段，突出显示了与参比样品的偏差。杂质汇总部分详细介绍了各种修饰肽的杂质响应（此处定义为每种杂质的经百分比调整的面积），包括氧化T22以及氧化T42的两种异构体，以及反映肽是否超出ICH报告阈值的标记。借助此类自动化报告，用户可以快速评估样品并确定其是否符合质量标准或者是否需要调查。还可以生成综合报告，列出所有进样的杂质响应，从而轻松快速地评估更大批量的进样（数据未显示）。通过在Empower软件中定制数据处理和报告方法，以自动显示对每项分析至关重要的确切结果，可大幅提高实验室效率和工作效率，并尽可能降低合规风险，从而节省时间和资源，以更快速地将安全有效的药物提供给患者。

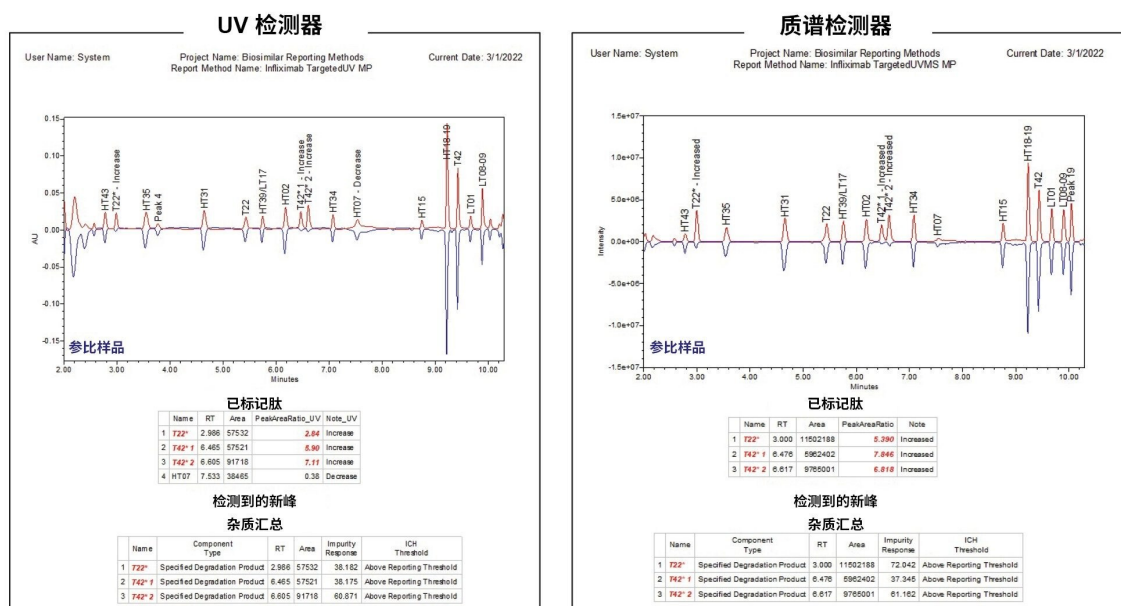


图6.生成的自定义Empower报告，用于监测超过定义的比率阈值的目标肽水平，其适用于（左图）UV和（右图）MS检测器。

结论

在生物药物开发中，精简且自动化的软件解决方案对于确保高效的工作流程和消除手动数据分析所造成的瓶颈和错误至关重要。本研究展示了Empower软件支持生物药物开发和商业化的能力，该软件能够根据每项分析对关键分析测量的特定需求定制数据报告。使用二元方法的自定义字段能够快速比较样品与参比品。这种比较方法易于部署在开发环境中，并且可以快速调整以支持下游活动。通过与配备光学和/或常规质谱检测器的ACQUITY Premier LC系统所能够实现的高质量结果相结合，Empower软件可提供简化的解决方案，大幅提高属性表征和靶向属性监测生物制药工作流程的效率。

参考资料

1. Haw A, Wiggernhorn M, van de Weert M, Garbe JHO, Mahler H, Jiskoot W. Forced Degradation of Therapeutic Proteins. J Pharm Sci. 2012 March, 101(3), 895–913.
2. DeLaney K, Birdsall RE, Yu YQ. 通过ACQUITY Premier UPLC系统(BSM)的可重现性能来改进肽图分析研究并减少检测失败. 沃特世应用纪要. 2022 Apr; [720007593](#).
3. Birdsall RE, McCarthy SM. 利用ACQUITY QDa质谱检测器的质谱检测功能改善常规肽分析的专属性和灵敏度. 沃特世应用纪要. 2015年4月; [720005377ZH](#).
4. Koshel BM, Birdsall RE, Yu YQ. LC-UV-Based Synthetic Peptide Impurity Tracking and Reporting with Compliant-Ready Empower 3 Software. Waters Application Note. 2017 Apr; [720005968](#).
5. Koshel BM, Birdsall RE, Yu YQ. 使用Empower 3软件配合ACQUITY QDa质谱检测器监测合成肽杂质监测以提高分析可信度. 沃特世应用纪要. 2017年4月; [720005967ZH](#).

特色产品

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

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

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

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

720007610ZH, 2022年4月

© 2022 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](#)