

使用High-Resolution Accurate Mass Multi-Attribute Method (HR-MAM) 对NIST单抗的关键质量属性进行监控

张晓夕, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

1. 前言

随着治疗性生物产品在全球药物市场所占份额的不断提高, 各国监管机构通过发布质量源于设计 (Quality by Design, QbD) 原则等手段, 对生物药的质量控制提出了更高的要求。对于生物制药企业而言, 在生产及批次放行过程中对关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 和杂质等进行鉴定、定量和监控就显得尤为重要。传统的质控手段包括多种分离手段, 如反相色谱 (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC)、体积排阻色谱 (size-exclusion chromatography, SEC)、离子交换色谱 (ion-exchange chromatography, IEX) 和毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 等。

2015年, Rogers等基于Orbitrap高分辨质谱平台发展了Multi-Attribute Method (MAM), 用于在一针进样中同时对CQA进行鉴定、定量和实时监控^[1]。自从MAM发布以来, 获得了业界的极大关注, 在近期的学术会议中屡屡成为热点议题^[2]。

在本文中, 我们使用Thermo Scientific™ Q Exactive™ Plus Orbitrap™ 高分辨质谱平台, 串联Thermo Scientific™ Vanquish™ Flex UHPLC系统, 使用Thermo Scientific™ Chromeleon™ 7.2.9 Chromatography Data System (CDS) 与Thermo Scientific™ BioPharma Finder™ 3.2 软件进行数据采集和处理(Figure 1)。

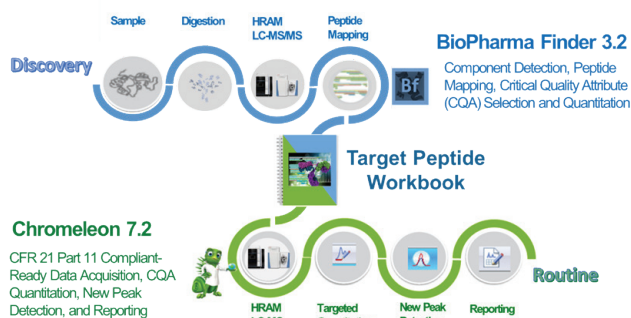


Figure 1. Thermo Scientific HR MAM 工作流程图. 使用BioPharma Finder 软件对肽图分析的数据进行分析, 与发现阶段进行对比以鉴定CQAs; 随后将BioPharma Finder生成的CQA列表导出至变色龙CDS中进行常规GMP阶段符合合规要求的目标组分检测。

2. 实验方法

a. 仪器及试剂

- Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer
- Vanquish Flex UHPLC system
- Thermo Scientific™ Accucore™ Vanquish™ C18+ UHPLC column, 1.5 μ m, 2.1 \times 150 mm
- Thermo Scientific™ Acetonitrile, UHPLC-MS grade
- Thermo Scientific™ Pierce™ Trypsin Protease MS grade
- Thermo Scientific™ Pierce™ Formic Acid, LC-MS grade
- Invitrogen™ UltraPure™ 1 M Tris-HCl Buffer, pH 7.5
- 8.0 M Guanidine Hydrochloride Solution
- Bio-Spin P-6 Gel Columns, Tris Buffer
- Thermo Scientific™ Zeba Spin Desalting Columns, 0.5mL
- Sodium Iodoacetate (IAC) BioUltra >98% purity
- DL-Dithiothreitol (DTT) BioXtra \geq 99% purity

b. 实验样品

NISTmAb Humanized IgG1 κ Monoclonal Antibody (NIST, RM 8671)。

c. 样品前处理步骤

- 商业化NIST mAb标准品以溶液形式提供, 溶于 12.5 mM L-histidine + 12.5 mM L-histidine HCl (pH 6.0)体系中, 浓度为 10.004 ± 0.08 mg/mL。取两份10 μ L NIST mAb标准品, 分别标记为RA2和RA3, 各加入90 μ L Solution I(7 M Guanidine

HCl, 100 mM Tris, pH 8.3), 将其浓度调整为1mg/mL。

- 还原: 向上述样品中分别加入2.0 µL Solution II (500 mM DTT), 使DTT终浓度为10 mM, 随后室温孵育30分钟。
- 烷基化: 还原结束后, 向上述样品中分别加入4.0 µL of Solution III(500 mM IAC)并用移液器充分混合, 使IAC终浓度为20 mM, 避光室温孵育20分钟。
- 溶液置换: 烷基化结束后, 向上述样品中分别加入4.0 µL Solution IV (50 mM DTT)用于中和过量的IAC。随后分别取BioSpin-6 column和Thermo Scientific™ Zeba Spin Desalting Columns, 0.5mL各一支, 按照其说明书分别将其溶液体系置换为50 mM Tris (pH 7.9)。弃去下层溶液并更换新的1.5mL外管, 随后向BioSpin-6 column中加入经还原烷基化之后的RA2样品, 向Zeba Spin Desalting Column中加入经还原烷基化之后的RA3样品, 1000xg转速离心四分钟后分别收集下层溶液准备酶解。
- 酶解: 使用双蒸水将Pierce Trypsin复溶为1mg/mL,温和涡旋混匀。按照酶: 蛋白=1:10 (w:w) 的比例将胰酶溶液分别添加至前述两份NIST mAb样品中, 37 °C孵育30分钟, 加入甲酸(终浓度为10%) 终止酶解反应, 随后将两份样品分别转移至样品瓶中并置于液相自动进样器里, 待后续分析。

d. 实验方法设置

- 液相色谱: Vanquish Flex UHPLC system
- 色谱柱: Accucore Vanquish C18+ UHPLC column (1.5 µm, 2.1 × 150 mm)
- 柱温: 50 °C (column oven Mode set to Still Air)
- 自动进样器温度: 5°C
- 上样量: 每个样品4 µL(约4µg酶解肽段)
- 流动相: 0.1% formic acid in water (A1) / 0.1% formic acid in acetonitrile (B1)
- 流速: 0.250 mL/min.

液相梯度如表1所示。

Time (min)	B%	Time (min)	B%	Time (min)	B%
0	1	77	90	93	90
5	1	79	1	99	90
6	10	81	1	101	1
70	35	83.5	10	115	1
72	90	91.5	45		

Table 1. 液相梯度.

质谱条件如表2所示。其中用于肽图分析的数据使用Top5 ddMS2 方法采集, BioPharma Finder 处理; CQA定量的数据使用Full Scan MS only 方法采集, 变色龙软件处理。

MS source setting	Value
Sheath gas	35 arb
Aux gas	10 arb
Sweep gas	0 arb
Spray voltage	3.5 kV
S-lens RF level	50
Aux gas temp.	250 °C
Capillary temp.	250 °C
Properties of Full MS - SIM	
General	
Runtime	0 to 72 min
Polarity	Positive
Full MS - SIM	
Resolution	140,000
AGC target	3e6
Maximum IT	200 ms
Scan range	300 to 1800 m/z
Properties of Full MS/dd-	
MS2 (Top5)	
General	
Runtime	0 to 72 min
Polarity	Positive
Default charge state	2
Inclusion	-
Exclusion	-
Tags	-
Full MS	
Resolution	140,000
AGC target	3e6
Maximum IT	200 ms
Scan range	300 to 1800 m/z
dd-MS2 / dd-SIM	
Resolution	17,500
AGC target	1e5
Maximum IT	250 ms
Loop count	5
TopN 5	TopN 5
Isolation window	1.2 m/z
Fixed first mass	-
(N)CE / stepped (N)CE nce	27
dd Settings	
Minimum AGC target	2.00e3
Intensity threshold	8.0e3
Apex trigger	-
Charge exclusion	Unassigned, 1, >8
Peptide match	Preferred
Exclude isotopes	On
Dynamic exclusion	8.0 s

Table 2. 质谱条件.

e. 数据处理软件

使用Thermo Scientific BioPharma Finder 3.2软件进行肽图分析, 参数设置如表3所示。对两份样品的MS/MS数据进行搜库, 以确定用于监控和定量的CQA。

Database Parameters	
Protease	Trypsin (C-term KR)
Specificity	High
Fixed Modification	Carboxymethylation (C)
Variable Modifications	Deamidation (N)
	Deamidation (Q)
	Glycation (K)
	NH3 loss (NQ)
	Oxidation (MW)
	Lys (C-term)
	Gln-Pyro-Glu (N-term)
	N, O Glycans (CHO)

Table 3. Biopharma Finder 搜库条件.

参考之前的报道，在本文的研究中我们选定了如下的CQAs用于定量：糖基化（glycosylation）、脱酰胺（deamidation）、天冬氨酸异构化（isomerization）和C端赖氨酸丢失（C-terminal lysine truncation）。对于每个CQA，我们选取了鉴定到的每个电荷态的前四个同位素峰，在BioPharma Finder中另存为Target Peptide Workbook，并一键导出为BioPharma Finder workbook file (.wbpf)，随后将其导入变色龙 Processing Method中的 MS Component Table。

任何新发现的CQA可以随时添加进BioPharma Finder workbook和变色龙方法中，这为方法开发和优化阶段提供了极大的灵活性。一旦在变色龙软件中建立了标准化的分析方法，即可将该方法应用于GMP环境下的应用中。

接下来，使用Chromeleon CDS 7.2.9软件进行CQA定量。我们基于变色龙软件中的MS Quantitative模板创建了MAM数据处理的方法，基本参数如表4所示。在变色龙软件中，可以对峰积分的参数进行优化，以确保积分结果一致且可信，从而得到准确的定量结果。

MS Detection	Value
Extracted Ion Chromatogram	<MS Default Detection Settings>
Detection Algorithm	ICIS
	Default Values
MS Settings	Value
MS No. of Decimal Points	5
Mass Tolerance	Manually Define Mass Tolerance, 8 ppm
Integration	Inhibit Integration for TIC Channel
MS Spectra Bunching	No baseline correction, 1 scan
Composite Scoring	Value
Pass Score if at Least	2 criteria passed
Fail Score if Less Than	1 criterion passed
Isotopic Dot Product	≥0.900
Mass Accuracy	≤5.00 ppm
Peak Apex Alignment	≤0.50 min

Table 4. 变色龙数据处理条件.

3. 实验结果

本次实验选取的两份NIST mAb标准品来源于同一批次，通过对比不同溶液置换耗材处理后选定CQA含量的变化趋势，进而研究不同耗材对CQA定量结果的影响。图2展示了Biopharma Finder对两个样品进行肽图分析的结果，可见在上样量约4μg肽段的情况下，NIST mAb标准品轻链覆盖率≥96%，重链覆盖率≥98%，除了一些胰酶酶切过短的肽段没有鉴定到，其余区域均可鉴定到肽段信息，为CQA的选取和定量提供了坚实的基础。

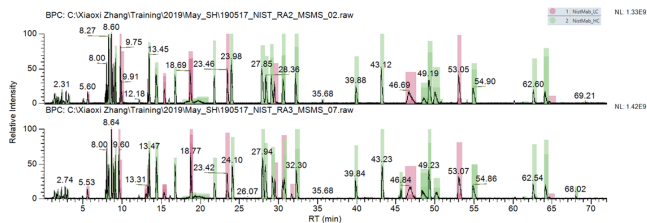


Figure 2. 两份NIST mAb标准品（RA2，上；RA3，下）酶解肽段基峰谱图（Base Peak Chromatogram）。

对于两个样品，我们分别进行了三针技术重复。表5展示了对主要糖型的定量结果。由图中可以看出，分别使用不同前处理耗材的两个样品的六针进样之间均呈现良好的重现性。

Injection	A2G0F(%)	A2G1F(%)	A2G2F(%)	A1G0F(%)	A1G1F(%)	A1G0(%)	M5(%)	Unglycosylated(%)
190517_NIST_RA2_1_MS	40.52	39.72	9.55	4.17	3.39	0.68	1.15	0.83
190517_NIST_RA2_2_MS	40.25	39.99	9.62	4.18	3.38	0.63	1.12	0.83
190517_NIST_RA2_3_MS	39.95	40.38	9.54	4.23	3.38	0.63	1.09	0.81
190517_NIST_RA3_1_MS	40.16	40.37	9.54	4.21	3.32	0.59	1.08	0.74
190517_NIST_RA3_2_MS	40.53	40.10	9.33	4.27	3.34	0.60	1.06	0.77
190517_NIST_RA3_3_MS	40.60	40.05	9.29	4.19	3.34	0.63	1.08	0.81
avg	40.34	40.10	9.48	4.21	3.36	0.62	1.10	0.80
SDTEV	0.24%	0.23%	0.12%	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%	0.03%
CV	0.59%	0.57%	1.29%	0.77%	0.77%	4.35%	2.81%	4.31%

Table 5. 不同溶液置换条件下NIST mAb糖型含量对比。

图3A展示了肽段FNWYVDGVEVHNAK上D283的异构化比率和N289的脱酰胺比率。由图中不难发现，两种不同溶液置换条件下天冬氨酸异构化和脱酰胺化比率并没有显著差异，表明对于这两种修饰，使用不同溶液置换耗材也无显著差异。

以RA2样品为例，进一步观察发生天冬氨酸异构化和未修饰峰的对比，可见由于修饰/未修饰肽段色谱保留时间的差异，可以将其分离开，在变色龙软件中按照保留时间差异进行相应设置，分别提峰进行相对定量(图3B)；得益于Orbitrap质谱的高灵敏度，相对含量只有未修饰峰约0.15%的异构化峰也可以检测到高质量的一级质谱图和准确的肽段同位素峰分布(图3C-F)。

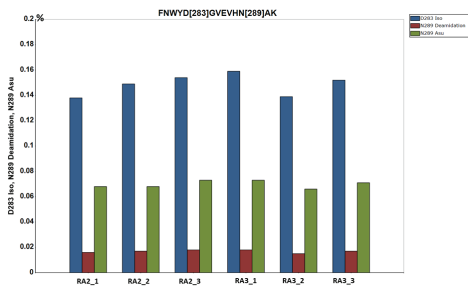


Figure 3A. 肽段FNWYVDGVEVHNAK上D283的异构化比率和N289的脱酰胺比率对比。

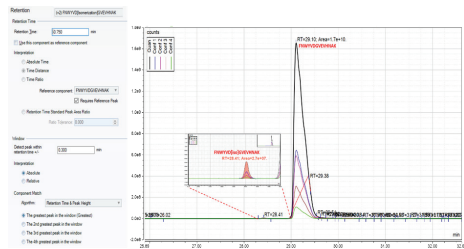


Figure 3B. RA2样品中肽段FNWYVDGVEVHNAK发生/未发生天冬氨酸异构化XIC峰的对比。

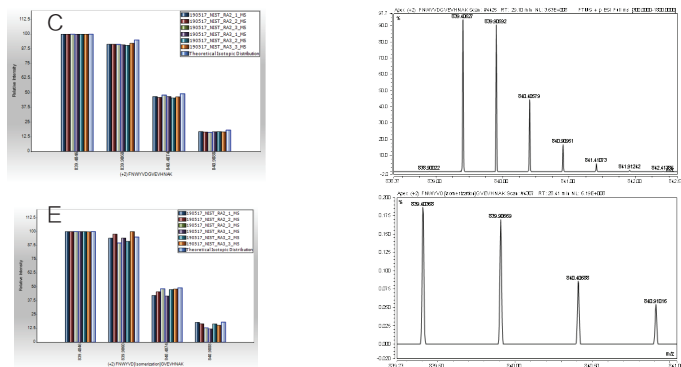


Figure 3C-F. 两个样品中肽段FNWYVDGVEVHNAK发生/未发生天冬氨酸异构化一级质谱峰及肽段同位素峰分布。3C, 肽段FNWYVDGVEVHNAK理论与实测同位素峰分布。3D, 肽段FNWYVDGVEVHNAK一级质谱峰。3E, 肽段FNWYVD[iso]GVEVHNAK理论与实测同位素峰分布。3F, 肽段FNWYVD[iso]GVEVHNAK一级质谱峰。

表6展示了重链C端修饰的定量结果。可见对于重链C端的赖氨酸丢失，即使采用了不同的前处理耗材，样品之间修饰的定量CV仍可保持在较低水平。

Injection Name	MS Quantitation Lys Clipping(%)
190517_NIST_RA2_1_MS	89.148
190517_NIST_RA2_2_MS	89.150
190517_NIST_RA2_3_MS	89.150
190517_NIST_RA3_1_MS	88.782
190517_NIST_RA3_2_MS	88.332
190517_NIST_RA3_3_MS	89.006
Average	88.928
STDEV	0.325
CV	0.37%

Table 6. 重链C端赖氨酸丢失定量结果。

4. 结论

在本实验中，我们使用基于Thermo高分辨质谱平台的HR-MAM流程对在预处理步骤中使用不同溶液置换耗材的NIST mAb标准品进行了CQA的鉴定和定量。得益于HR-MAM流程的稳健性、灵活性、特异性和高灵敏度，我们可以在一次实验中同时对多个CQA进行监控和定量。

对比不同溶剂交换前处理耗材的实验结果，可发现肽图强度、色谱峰型及分离与肽图覆盖度等无明显差异，且与关键质量属性相关的特定修饰，使用不同耗材处理得到的定量比率并无显著区别，更进一步证明了HR-MAM流程的稳定性。

参考文献

- Rogers, R., et al. Development of a quantitative mass spectrometry multi-attribute method for characterization, quality control testing and disposition of biologics. *MAbs*, 2015, 7, 881.
- Rogers, R., et al. A view on the importance of “multi-attribute method” for measuring purity of biopharmaceuticals and improving overall control strategy. *The AAPS Journal*, 2018, 20, 7.



热线 800 810 5118
 赛默飞 电话 400 650 5118
 官方微信 官方微博 www.thermofisher.com