

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

Kellen DeLaney, Samantha Ippoliti, Lisa Reid, Owen Cornwell, Ying Qing Yu, Emma Harry, Mark Towers

Waters Corporation

摘要

随着越来越多的单抗(mAb)生物类似药不断涌现, 业界非常需要采用简化的流程来表征这些产品。要在快节奏、不断增长的市场中占有一席之地, 拥有能够提供数据以可靠地鉴定和定量肽属性的仪器, 以及能够在保持合规性的同时加快并自动完成分析的数据分析流程, 至关重要。全新的Xevo G3 QToF平台与ACQUITY™ Premier UPLC™系统相结合, 能够对生物治疗性蛋白质进行稳定可靠的分析。基于应用程序的合规信息学平台waters_connect™能够简化从采集到分析的数据管理流程。这些集成式工具能够开发出高效的生物制药工作流程, 包括用于表征和属性监测的工作流程。

本研究展示了waters_connect如何与Xevo G3 QToF配合用于单抗生物类似药的表征和监测。我们分析了四种英夫利昔单抗样品(原研药和三种生物类似药)的肽图, 旨在研究这些样品的脱酰胺、氧化、赖氨酸剪切和糖基化等产品属性。使用合规软件waters_connect内的Peptide MAM应用程序定量分析各单抗之间的相对丰度差异。还对原研药和一种生物类似药进行了目标属性的降解研究, 以根据每种单抗的热降解鉴定关键质量属性(CQA)。结果展示了搭载集成式waters_connect数据采集和处理工具的Xevo G3 QToF平台如何成为比较肽图分析工作流程以确定mAb生物相似性的合适平台。

优势

- 原研药和生物类似药单抗的高覆盖率肽图分析，对肽属性进行可靠的鉴定和定量
- 集成、合规、基于应用程序的工作流程，简化肽图分析数据的采集、处理和审查
- 可重现地定量分析低含量肽属性，以确定生物相似性

简介

随着单克隆抗体(mAb)专利到期，越来越多的生物类似药正在获得监管机构批准。在竞争日益激烈的生物类似药市场上，需要采用简化的流程来表征和比较生物类似药与原研药。表征生物类似药需要一种可靠的工作流程来鉴定和定量对安全性、有效性和稳定性至关重要的各种产品属性。生物类似药产品与原研药产品的活性成分高度相似，但它们的特性可能会因生产方法的不同而有所差别，只要这些差别不会产生具有临床意义的影响即可。表征和比较生物类似药的主要途径之一是使用肽图来分析翻译后修饰。酶解mAb并使用液相色谱(LC)-质谱(MS)联用法分析肽片段，能够确认一级序列并找到产品变异位点。多属性方法(MAM)在定量多个样品的目标属性方面越来越受欢迎，这种方法的通量高于传统的数据分析表征方法。与针对单个属性使用多种正交分析技术不同，MAM能够使用LC-MS直接监测样品的大量属性¹。

在waters_connect信息学平台控制下运行的Xevo G3 QTof质谱仪（图1）为执行生物制药工作流程提供了一种简化的解决方案。Xevo G3 QTof更新了离子光学元件，旨在优化肽传输效率并提供全面的定量能力，适用于生物治疗药物属性的表征和监测。合规的waters_connect平台能够处理从样品提交到数据分析和审查的整个工作流程，其中集成的UNIFI™应用程序（肽图分析）、科学数据库（属性数据库）和Peptide MAM应用程序（目标属性监测和新峰检测）能够实现表征与监测工作流程的无缝协调。本研究展示了该组合式工作流程用于英夫利昔单抗和三种生物类似药产品（Inflectra®、Avsola®和Renflexis®）的肽图表征和监测的有效性。我们比较了四种mAb的肽图，通过降解研究鉴定并可重现地监测了原研药和其中一种生物类似药的关键质量属性(CQA)。

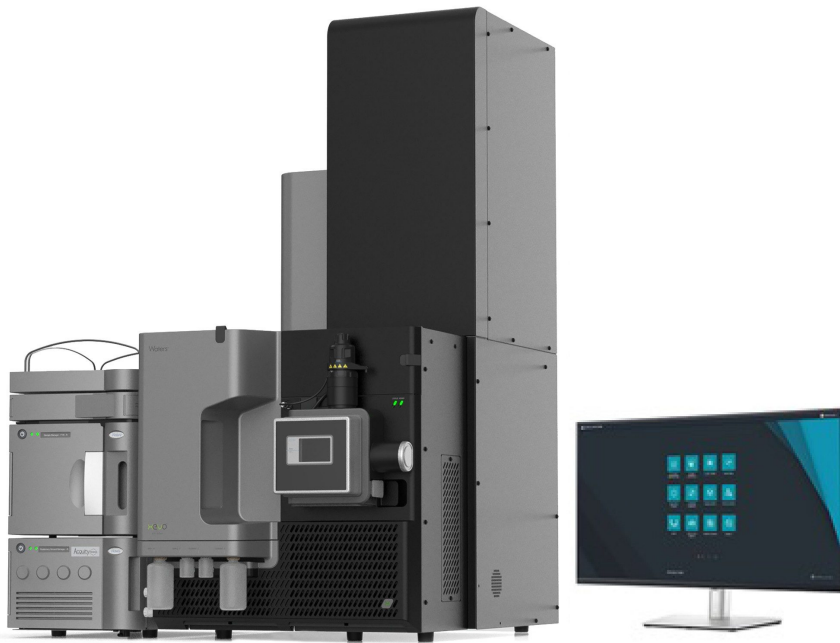


图1.搭载集成式waters_connect信息学软件的Xevo G3 QToF平台，能够进行合规、基于应用程序的数据采集、处理、审查和报告。

实验

样品描述

将包括原研药(Remicade[®])和生物类似药(Inflectra)在内的英夫利昔单抗样品在37 °C下温育0周（无降解）、1周或2周。包括另外两种生物类似药（Avsola和Renflexis）在内的所有样品都经过还原、烷基化、脱盐、胰蛋白酶酶解和0.1%甲酸酸化。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系统 – BSM配置

检测：

ACQUITY Premier TUV; 10 mm分析型流通池; λ

= 214 nm

| | |
|-------|---|
| 样品瓶: | 采用MaxPeak™ HPS的QuanRecovery™样品瓶(P/N: 186009186) |
| 色谱柱: | ACQUITY Premier CSH™ 130 Å C18 1.7 μm, 2.1 × 100 mm |
| 柱温: | 60 °C |
| 样品温度: | 8 °C |
| 进样体积: | 2 μL |
| 流速: | 0.200 mL/min |
| 流动相A: | 0.1%甲酸的水溶液 (LC-MS级) |
| 流动相B: | 0.1%甲酸的乙腈溶液 (LC-MS级) |
| 梯度: | 流动相B在50 min内从1%增加至35% (总运行时间为80 min) |

质谱条件

| | |
|--------|---------------------|
| 质谱系统: | Xevo G3 QTof |
| 电离模式: | ESI+ |
| 采集范围: | 100–2000 <i>m/z</i> |
| 毛细管电压: | 2.2 kV |

| | |
|--------------|--------------------------|
| 碰撞能量： | 低能量：6 V 高能量梯度：20–50 V |
| 锥孔电压： | 20 V |
| 离子源温度： | 120 °C |
| 脱溶剂气温度： | 350 °C |
| 锥孔气流速： | 35 L/h |
| 脱溶剂气流速： | 600 L/h |
| 智能数据捕获(IDC)： | 低(5) |

数据管理

使用搭载UNIFI应用程序（1.9.12.7版）和Peptide MAM应用程序（1.0.0.3版）的waters_connect信息学平台（2.1.1.13版）采集并处理数据。

结果与讨论

全面表征生物类似药对于确保产品与原研药产品的可比性至关重要。本研究证明，在集成式waters_connect平台中运行的Xevo G3 QToF适用于对英夫利昔单抗和获批的生物类似药进行严格的对比分析。虽然每种生物类似药的氨基酸序列都与原研药相同，但产品变体谱图的差异会影响药物的安全性、稳定性和有效性。

为深入了解生物类似药之间的差异，我们比较了各种英夫利昔单抗产品的肽图。将ACQUITY Premier UPLC与Xevo G3 QToF联用以分析胰蛋白酶酶解样品，使用MS^E数据非依赖型碎裂来鉴定肽并定位修饰位点。在waters_connect内的UNIFI应用程序肽图分析工作流程中，四种英夫利昔单抗产品的序列覆盖率均超过95%，质量数误差小于5 ppm。此外，结果展现出优异的进样间重现性，峰强度的相对标准偏差低于5%。这一显著的重现性可从图2A看出，该图中Remicade三次重复进样的叠加色谱图几乎完全重叠。

虽然各mAb样品的色谱图看起来非常相似（如图2B所示），但在产品变体的相对丰度方面观察到显著差异。在四种产品中，定位到47处修饰，包括6处氧化、12处脱酰胺、28处N-糖基化和1处C-端赖氨酸剪切。图3显示了天然和氧化形式的肽的高能量MS^E谱图示例。由于分配的碎片离子获得了高覆盖率，因此能够可靠地鉴定肽并定位蛋氨酸修饰，如y离子系列所示。使用waters_connect中的Peptide MAM应用程序定量不同修饰的相对丰度差异。该软件能够就在waters_connect系统内通过对UNIFI应用程序肽图分析工作流程在各个样品中鉴定出的产品质量属性列表进行靶向定量。

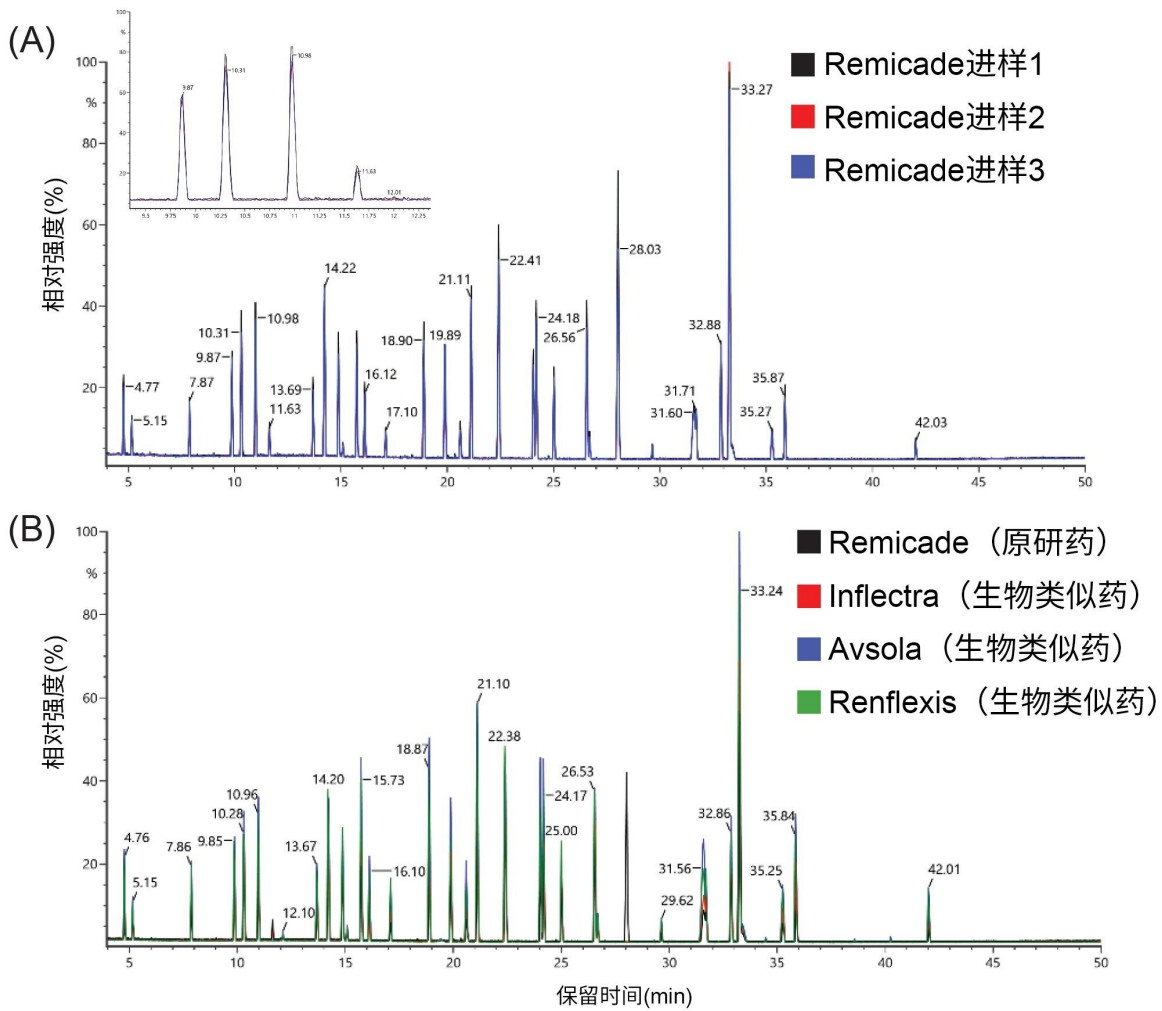


图2.mAb酶解物的基峰离子(BPI)叠加色谱图：(A)原研药(Remicade)样品的重复进样结果，显示峰几乎完全重叠；(B)原研药和三种生物类似药的进样结果，显示出相似的肽图谱。

在查看定量结果之前，我们执行了系统适用性分析作为Peptide MAM工作流程的一部分。评估已知肽样品的间歇进样结果，此步骤检查旨在确保系统为分离和质谱检测仪器以及自动化数据处理程序产生可接受和预期的结果。该过程是增强结果可信度的关键，因为属性监测需要高度的分析严谨性。利用MassPREP™肽混标(P/N: 186002337 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html>>)进行系统适用性进样。图4B显示了如何在进样中跟踪肽数据的两个示例，包括质量数误差和峰宽。重复测定值的可视化使用户能够轻松识别随时间推移的异常或系统漂移。图4C显示了每种肽的全部四种系统适用性参数，反映出该平台在整个样品序列持续期间表现出较高的质量精度（±1.5 ppm以内）和优异的重现性。使用Xevo G3 QTof所实现的重现性让我们更容易区分样品之间的细微趋势，同时减少了获得有意义的痕量产品变体结果所需的重复样品数量，可节省时间和费用。

使用Peptide MAM应用程序测得的目标肽属性的相对定量结果显示，所监测属性的相对标准偏差平均小于2.0%。图5以示例显示了这些结果在应用程序中的呈现方式，简化的条形图有助于快速评估每个目标属性的数据。

氧化和脱酰胺肽以及C-端赖氨酸偶联的定量结果如图6所示。监测的所有六个氧化位点均显示各英夫利昔单抗产品之间存在明显差异。例如，重链胰蛋白酶酶解肽(HT) 02、HT11以及HT03上的一个位点在原研药中表现出更高的氧化百分比，而HT22在两种生物类似药（Avsola和Renflexis）中表现出更高的氧化百分比。

脱酰胺的差异不太突出。在监测的12个脱酰胺位点中，只有两个位点在生物类似药之间存在显著差异，例如HT07，它在三种生物类似药中具有更高的脱酰胺百分比；另一个位点是HT38，它在Inflectra和Avsola中的脱酰胺百分比相比于Remicade和Renflexis较小。

我们还定量分析了C-端赖氨酸剪切程度，因为这种修饰在生物生产过程中很常见，并且可能对受体结合产生影响⁴。如图6所示，不同生物类似药之间的赖氨酸剪切程度差异显著，其中Renflexis在肽上保留的百分比最小。

不同英夫利昔单抗产品之间各种N-糖变体的百分比表现出差异，可能是因为生产过程和细胞系差异导致的⁵。图7显示了HT26肽的28种N-糖型的相对丰度，分为三组：高丰度（相对丰度高于约2%）、低丰度（相对丰度低于约2%）和免疫原性（含有N-羟乙酰神经氨酸(NeuGc)或半乳糖- α -1,3-半乳糖(α -gal)的聚糖）。

FA2和FA2G1在所有四种mAb中都是主要糖型，分别占有所有形式肽的总丰度约50%和30%。不过，它们在每种mAb中确切的相对含量各不相同，例如在Avsola中，FA2丰度最高，FA2G1丰度最低。而在Inflectra中，FA2丰度

最低，FA2G2丰度最高。

正如预期一样，与Avsola和Renflexis相比，Remicade和Inflectra中的免疫原性糖型丰度更高，这是由于细胞系的差异，Remicade和Inflectra来自鼠细胞系，Avsola和Renflexis则来自中国仓鼠卵巢细胞系。

低丰度糖型在四种mAb之间显示出截然不同的相对丰度。例如，A1、M5A1G1、FM5A1和A1G1在Remicade中的相对丰度最高，而A2G1和M6在Renflexis中的相对丰度最高，A2G1在Inflectra中最高。糖基化差异非常值得关注，因为它们可能会影响药物引发良性或不良免疫反应的能力。

除比较肽图以外，我们还对原研药和一种生物类似药（Inflectra）进行了降解研究。降解试验在生物治疗药物开发中非常重要，可获得与开发分析方法、确定剂型、鉴定杂质、计算保质期和比较生物类似药产品降解途径相关的信息^{6,7}。无论采用热降解、化学降解还是机械降解，目的都是加速蛋白质降解并提高杂质水平，提供有关蛋白质的有效性和免疫原性如何受到影响的见解。这些研究能够鉴定CQA，即对产品效价、有效性和安全性至关重要的肽属性。

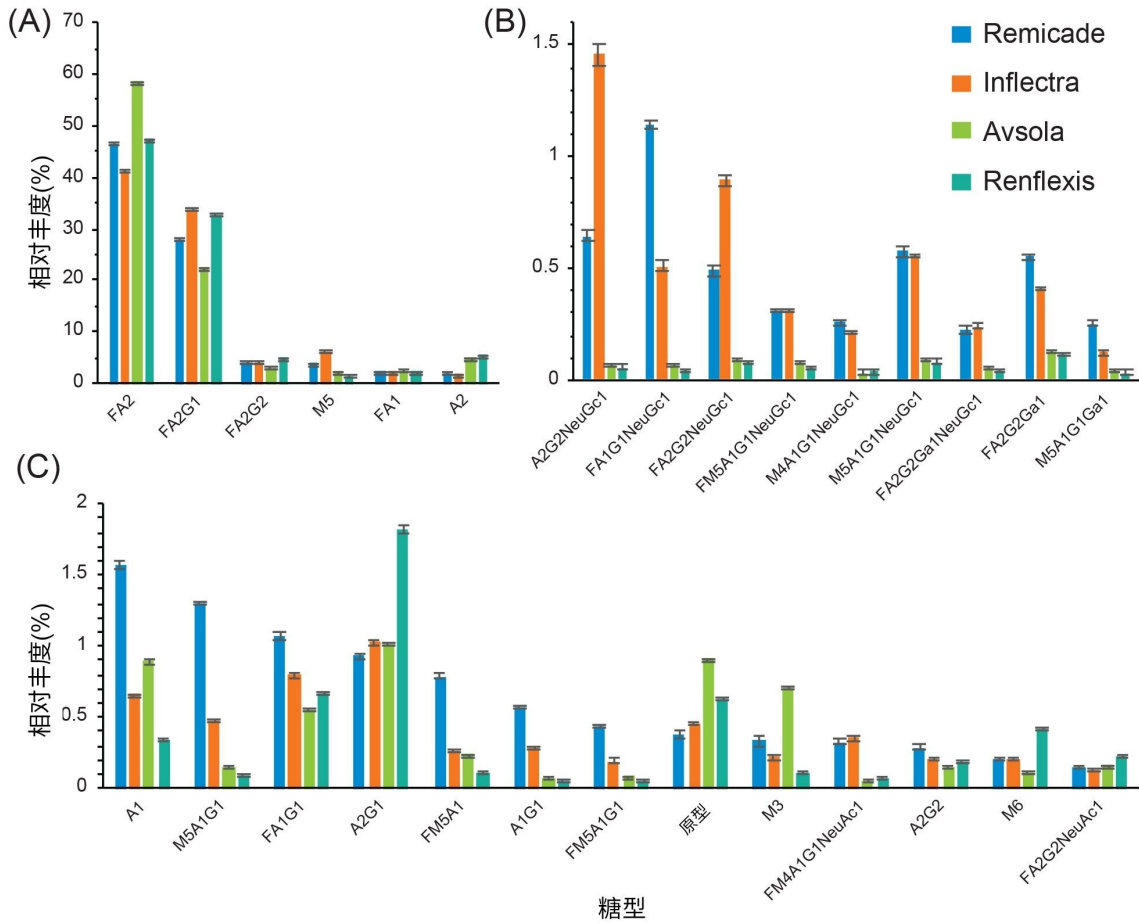


图7.原研药和三种生物类似药中糖基化重链肽HT26的相对丰度，按照(A)高丰度糖型、(B)免疫原性糖型和(C)低丰度糖型分类。糖型基于Oxford命名法进行标记。误差条柱表示基于三次重复进样的标准偏差。

本研究采用降解实验，通过Peptide MAM应用程序来监测Remicade和Inflectra中CQA的变化。样品在分析前接受一到两周的温度降解处理，并与未降解样品进行比较。图8显示了对比Inflectra与Remicade的未降解（对照）和两周降解样品的镜像图。虽然镜像图中的色谱图看起来相似，主峰无明显差异，但使用MAM应用程序鉴定出若干CQA的细微变化，如图9所示。许多CQA在降解样品中表现出升高的反应，但并非所有CQA在原研药与生物类似药之间都表现出一致的增加。例如，HT22和HT02的氧化在Remicade的两周样品中有所减少，但在Inflectra的两周样品中有所增加。其他CQA在两者之间表现出一致的结果，例如HT07和HT38的脱酰胺，在两种mAb的一周和两周样品中均逐渐增加。在降解样品中，糖型的相对丰度或赖氨酸剪切的相对含量未观察到显著差异（数据未显示）。预计生物类似药的产品变异模式并不相同，需要对所有差异进行风险评估，以确定这些差异对分子的功

能 and 安全性特征的潜在影响。

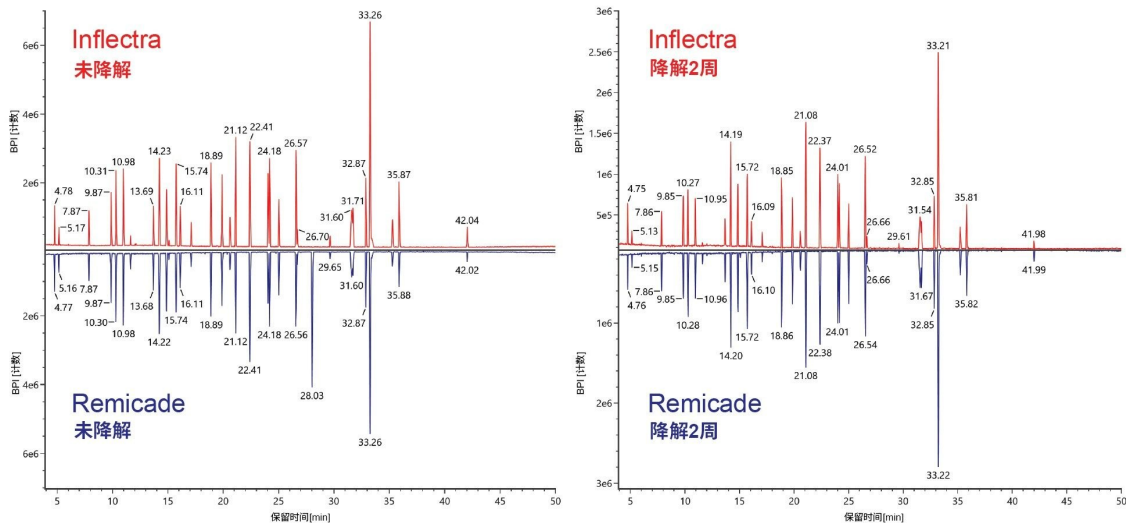


图8.比较Inflectra与Remicade未降解样品（左）和两周高温降解样品（右）的镜像图

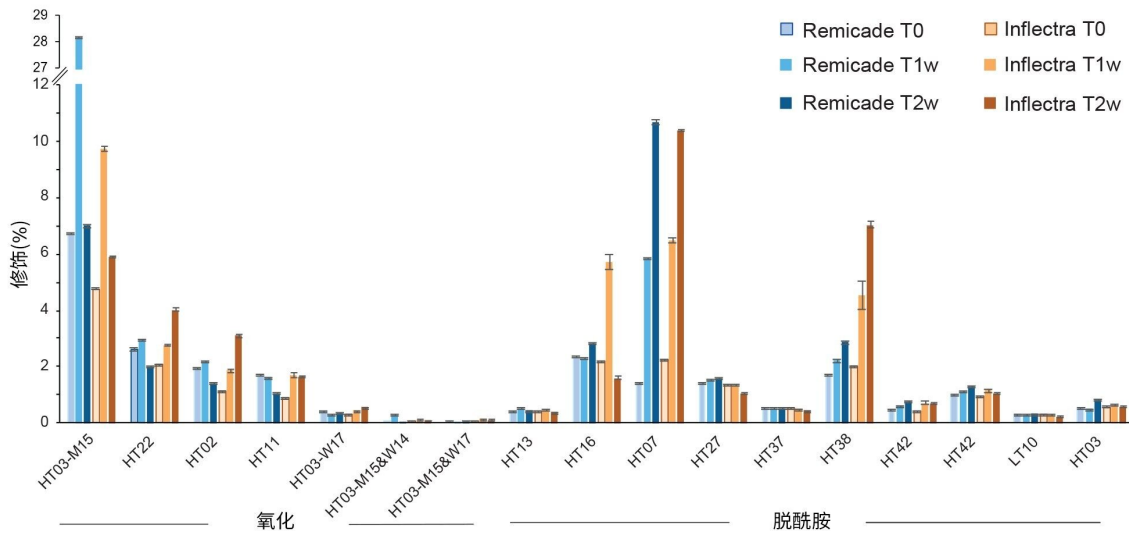


图9. Remicade和Inflectra中氧化和脱酰胺肽在各种降解条件下的相对丰度，包括未降解(T0)、一周降解(T1w)和两周降解(T2w)。误差条柱表示基于三次重复进样的标准偏差。对于具有多个修饰位点的肽，标明经修饰的氨基酸。H，重链；L，轻链；T，胰蛋白酶酶解肽。

结论

全面表征生物类似药mAb对于确保产品的安全性和有效性以及依靠原研药的经验来减轻后续产品的临床负担至关重要。搭载合规信息学工具waters_connect的Xevo G3 QTof平台能够通过简化的肽图分析和Peptide MAM工作流程对产品属性进行稳定高效的分析。本研究使用该平台表征一级结构，使英夫利昔单抗原研药和三种生物类似药样品都实现了较高的序列覆盖率。借助集成的UNIFI应用程序和Peptide MAM应用程序，对四种mAb产品的肽属性进行了鉴定、相对定量和比较。此外，还通过降解研究对潜在的CQA进行了鉴定和定量。这些结果表明，Xevo G3 QTof能够与waters_connect数据采集和处理工具无缝集成用于生物类似药肽图表征和属性监测工作流程。

参考资料

1. Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, Campbell P, Bailey R, Balland A. Development of a Quantitative Mass Spectrometry Multi-Attribute Method for Characterization, Quality Control Testing, and Disposition of Biologics.mAbs.*Taylor and Francis*, 2015 Aug, 7(5), 881–890.
2. Ranbaduge N, 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.
3. Ranbaduge N, Yu YQ. 智能数据捕获(IDC)为多属性方法(MAM)研究提供出色的Xevo G2-XS数据采集和处理性能. 沃特世应用纪要: [720007441ZH](#), 2021年12月.
4. Faid V, Leblanc Y, Berger M, Seifert A, Bihoreau N, Chevreux G. C-terminal Lysine Clipping of IgG1: Impact on Binding to Human FcγRIIIa and Neonatal Fc Receptors.*Eur J Pharm Sci.*2021 Jan, 159, 105730.
5. Duivelshof BL, Jiskoot W, Beck A, Veuthey J, Guillarme D, D' Atri V. Glycosylation of Biosimilars: Recent Advances in Analytical Characterization and Clinical Implications.*Analytica Chimica Acta.*2019 Dec, 1089, 1–18.
6. Haw A, Wiggenghorn 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.

7. Pisupati K, Benet A, Yian Y, Okbazghi S, Kang J, Ford M, Saveliev S, Sen KI, Carlson E, Tolbert TJ, Ruotolo BT, Schwendeman SP, Schwendeman A. Biosimilarity Under Stress: A Forced Degradation Study of Remicade® and Remsima™.mAbs. *Europe PMC*, 2017 Aug, 9(7), 1197–1209.

特色产品

[Xevo G3 QToF](https://www.waters.com/nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/xevo-g3-qtof.html)

[ACQUITY Premier系统](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739)

[ACQUITY UPLC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/134801648)

720007632ZH, 2022年5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