

## 生物药相似性评估的常规工作流程

使用台式X500B QTOF质谱仪进行曲妥珠完整单抗分析

Sibylle Heidelberger<sup>1</sup> and Sean McCarthy<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 71 Four Valley Dr. Concord, ON L4K 4V8, Canada

<sup>2</sup> 500 Old Connecticut Path, Framingham, MA, 01701, USA

### 引言

生物药的研发过程是十分复杂的，在产品开发的过程中，需要大量的表征工作来确保药物的安全性和有效性。虽然有许多评估相似性的方法，但使用LC-MS进行完整蛋白分析可提供产品的异质性和杂质方面的相关信息。这种快速分析的能力使LC-MS检测成为开展其他研究之前的关键分析步骤。

在这里，我们展示了一种使用X500B QTOF系统高可重现性和耐用的分析生物药完整蛋白的方法，并使用 BiopharmaView™ 软件进行简单快速的批处理分析。

### 实验条件和方法

生物类似药曲妥珠单抗由两处不同的制造商获得（标记，trast-1和trast-2）。样品使用0.2%甲酸稀释，或使用PNGase F（新英格兰生物实验室（伊普斯维奇，马萨诸塞州，美国））按标准流程去糖基化。

#### 色谱条件

液相色谱系统为ExionLC™，蛋白质进样量为0.5 μg，使用 Protein BEH C4柱、300A 1.7 μm、2.1 mm × 50 mm柱在80 条件下分离。使用标准流动相（流动相A：水中0.1%甲酸，流动相B：乙腈中0.1%甲酸），色谱流速0.2-0.5 mL/min，总运行时间为5分钟。每次进样后前0.5 min切换至废液。

#### 质谱条件

使用配备了Turbo V™ 离子源的X500B QTOF进行数据采集，large protein模式，扫描范围900-4000 m/z。

电喷雾参数如下：

Curtain gas:	35
Ion source gas 1 (psi):	50
Ion source gas 2 (psi):	50
Temperature ( )::	400

### 数据处理

使用BioPharmaView™进行数据处理，采用曲妥珠单抗标准样品作为参照。

### 结果和讨论

#### 糖基化曲妥珠单抗

在这项研究中，我们使用了两种不同批次的曲妥珠单抗。我们从一个快速和简单的色谱方法开始，提供脱盐样品用于MS分析。使用X500B上的分流阀将色谱分离的初始部分排废液，脱盐后，切换阀门将样品注入MS源。如图1所示，色谱分离具有很高的重现性。

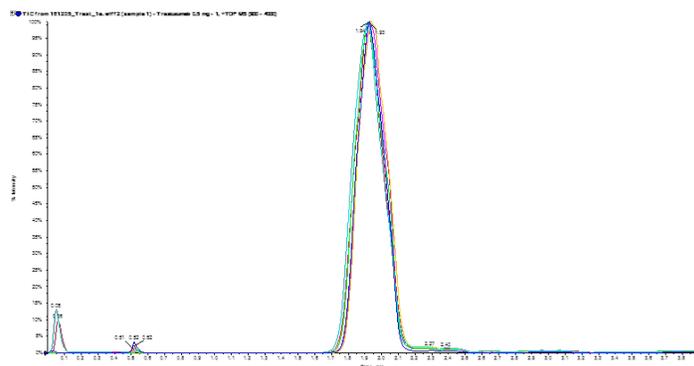


图1. 两个不同制造商的曲妥珠单抗高可重复性的色谱分离。

使用BiopharmaView™完整蛋白工作流程处理数据。首先在软件中输入蛋白的理论序列以及可能发生的翻译后修饰，一旦确定了蛋白的序列和预期的翻译后修饰，就可以确定色谱窗来选择数据。图2所示为三次重复进样同一批曲妥珠单抗的原始谱图。谱图重现性优异。

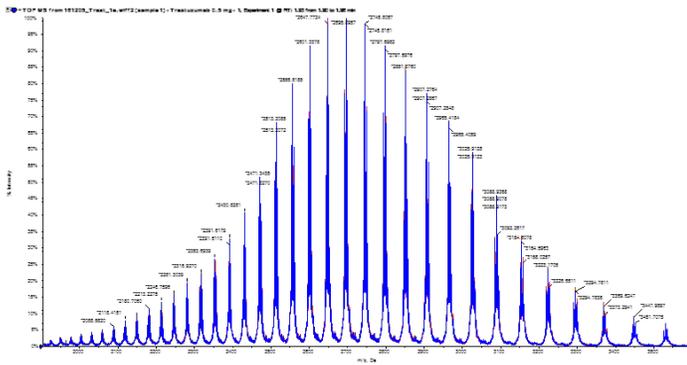


图2. 三次重复进样曲妥珠单抗的原始谱图。以不同的颜色（蓝色、粉色、红色）表示，并以m/z的形式反映高斯分布。

使用Biopharmaview™将此样品的原始谱图与第二批曲妥珠单抗进行比较（图3）。如图所示，糖型的信号强度存在一些差异，但是每个电荷态的谱图质量非常相似。

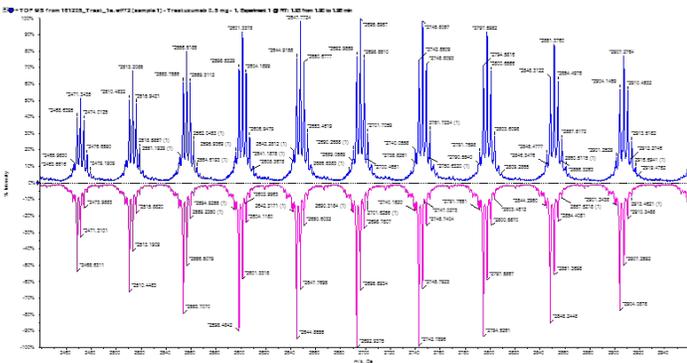


图3. 一批曲妥珠单抗（蓝色）与第二批曲妥珠单抗（粉红色）的镜像图显示了糖型模式的明显变化。

虽然原始谱图的评估对于评估不同电荷状态的轮廓相似性很重要，但完整分子量数据的构建是进行数据比较的最常用方法。通过对第一批抗体进行表征，并根据以前的报告对所得质谱图中每个峰进行识别和验证（图4）。

提交一个批次的数据分析，将第二批曲妥珠单抗与我们最初的表征样品进行比较。重建的谱图与原始数据一致，在每种糖型的质量上显示出很好的一致性，但是样品之间的强度不同（图5）。

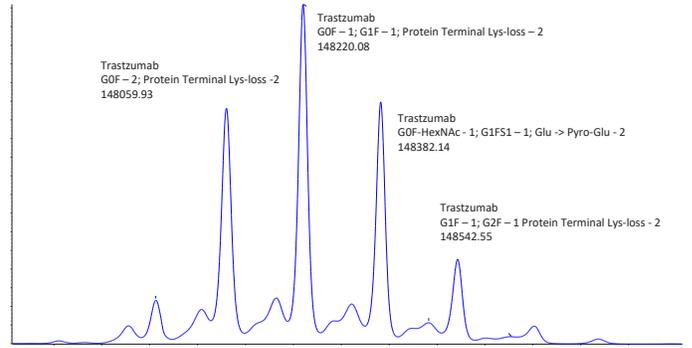


图4. 带注释的曲妥珠单抗重建谱图，包括N端赖氨酸损失和糖基化的所有修饰。

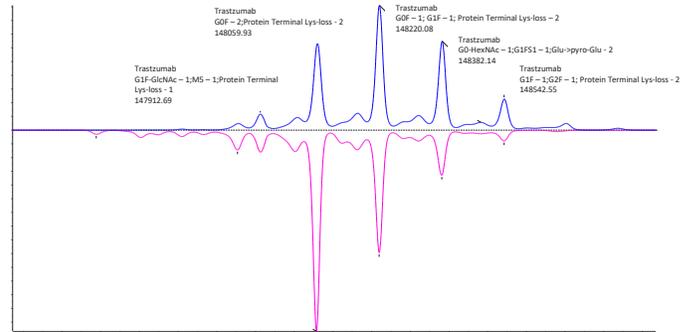


图5. 两批曲妥珠单抗重建谱图的糖型和强度比较。蓝色为第一批，粉色为第二批。

每个批次重复进样结果绘制在条形图中，以显示每个主要糖型的相对丰度，如图6所示。所示的图是在BPV中自动生成的，可以快速评估翻译后修饰的强度。

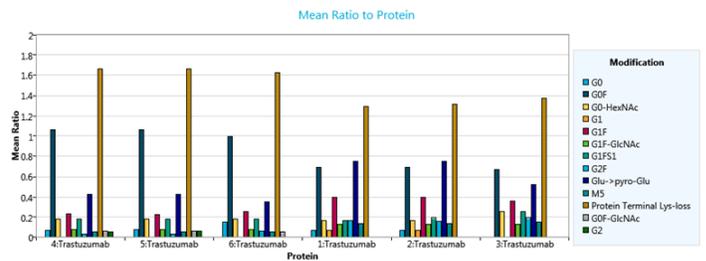


图6. 两个批次样品主要糖型和其他修饰的相对丰度比较。批次1（1:Trastuzumab-3:Trastuzumab）和批次2（4:Trastuzumab-6:Trastuzumab）。

回顾图3的结果，显示了主要糖型的强度变化，以及mannose-5（MAN5）种类存在的证据。绘制了该糖型与G1F图的对比图，以探究MAN5种类的水平。如图所示，与第二个样品相比，第一个样品中的MAN5峰更大。且重复分析结果一致。

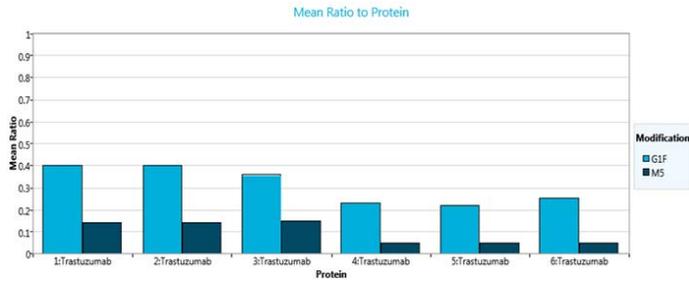


图7. Man5与G1F丰度比对，批次1（1:Trastuzumab–3:Trastuzumab），批次2（4:Trastuzumab–6:Trastuzumab）。

## 结论

在生物药生产过程中，批次间的比对是非常重要的工作。能够快速地对批次内或批次间样品进行比较可以有效监控和保证产品质量。台式的X500B QTOF质谱仪结合BioPharmaView™软件，非常适用于此类批次比对工作。本文中，BioPharmaView™软件通过样品独特的糖型特征，轻松快速地识别两个曲妥珠单抗生产批次之间的差异。该可视化工具可以使用户能够识别、量化和跟踪这些在生产批次之间的差异。

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte.

Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-5590-ZH-A



### SCIEX中国公司

北京分公司  
地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话：010-5808 1388  
传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心  
地址：上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话：021-2419 7200  
传真：021-2419 7333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司  
地址：广州市天河区珠江江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510 0200  
传真：020-3876 0835

微博：@SCIEX