

智能数据采集(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

Nilini Ranbaduge, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了在开展多属性方法(MAM)研究的Xevo G2-XS系统上应用以采集为中心的数据简化算法“智能数据采集(IDC)”的优势。Xevo G2-XS 系统(QToF MS)常用于药品表征,也可用于常规监测肽的产品质量属性(PQA)和关键质量属性(CQA)。为了支持当前在开发灵敏且稳定的多属性方法(MAM)方面的努力,我们展示了利用IDC在不影响定量精度的同时提高Peptide MAM数据质量的方法。

waters_connect信息学平台具有直观>IDC软件开关以及默认IDC水平选项,可在该平台上启用IDC。本研究的结果证实了启用IDC的数据相对于关闭IDC采集的适用性,揭示了启用IDC的数据在常规MAM分析中的优势。IDC算法在保持%修饰水平相当的前提下,显著减少了新峰检测(NPD)的假阳性结果数量,从而大幅减少了分析人员手动验证这些新峰所需的工作,并且简化了监管环境中的MAM工作流程。本研究发现,默认IDC设置15对NISTmAb降解样品的MAM分析表现出理想性能。该水平的数据简化使数据文件大小大幅缩减90%以上,数据处理速度提高四倍,能够提升MAM分析部署和后续数据管理的总体效率。

优势

- Peptide MAM分析的高效合规工作流程方法
 - 改进新峰检测,减少分析人员干预需要
-

- 缩减原始数据文件大小并缩短数据处理时间
- 不影响属性定量结果

简介

多属性方法(MAM)是一种新兴的LC-MS分析方法，用于直接测量产品以及对维持药物分子质量特征至关重要的关键质量属性。MAM因具备诸多品质而广受欢迎，例如：通过多属性分析支持产品鉴定结果确认以提高实验室效率、监控目标属性和杂质、检测新峰以支持纯度分析。但是，要将生物制药开发中的MAM分析转化为监管环境中的常规分析，需要对LC-MS平台、信息学和工作流程进行更彻底的调查，以确保准确度和稳健性。

使用Xevo G2-XS QToF MS系统执行MAM在生物制药开发中具有许多优势，因为仪器方法可以从属性表征过渡到属性监测，而无需方法转移或重新优化。该系统配备多种MS/MS离子碎裂MS功能，可以进一步研究检测到的任何新峰，并可靠分配最低水平的产品属性。

充分发挥waters_connect中Peptide MAM应用程序的效用，最初为BioAccord系统发布的智能数据采集(IDC)降噪算法已可用于Xevo G2-XS系统。IDC功能可实时简化数据并且大幅减少化学和电子噪音，从而缩减文件大小并提高数据处理质量和速度^{1,2}。本应用纪要证实了对Xevo G2-XS QToF MAM数据启用IDC与“关闭IDC”数据收集相比的优势。通过靶向监测肽属性和新峰检测(NPD)，确认降噪数据的数据质量，并量化IDC在缩减文件大小和缩短数据处理时间方面的优势。

实验

样品描述

系统适应性样品：MassPREP肽混标（部件号：[186002337](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186002337-massprep-peptide-mixture.html>>）。

对照样品/阴性对照：mAb胰蛋白酶酶解标准品（部件号：[186009126](#) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009126-mab-tryptic-digestion->

[standard.html](#)>) 。

加标对照样品：加标15种重元素标记肽的mAb胰蛋白酶酶解标准品。

降解样品：NISTmAb标准品8671在pH 8.0、温度40 °C下用50 mM Tris缓冲液培养14天。14天结束时，样品已经过还原、烷基化和胰蛋白酶酶解。临分析前用0.1%甲酸酸化并稀释酶解物，得到最终浓度0.1 µg/µL。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统
检测条件：	可变波长紫外检测器、ESI+ MS
样品瓶：	采用MaxPeak HPS技术的QuanRecovery样品瓶（部件号：186009186）
色谱柱：	ACQUITY Premier CSH C ₁₈ 肽分析专用柱 （部件号：186009489）
柱温：	60 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	10 µL
流速：	0.2 mL/min
流动相A：	0.1%甲酸的水溶液
流动相B：	0.1%甲酸的乙腈溶液

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.200	99.0	1.0	初始
3.00	0.200	99.0	1.0	6
78.00	0.200	65.0	35.0	6
85.70	0.200	15.0	85.0	6
93.00	0.200	15.0	85.0	6
100.70	0.200	99.0	1.0	6
120.00	0.200	99.0	1.0	6

流动相A: 0.1%甲酸的水溶液; 流动相B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

质谱条件

质谱系统: Xevo G2-XS系统

电离模式: ESI+

采集模式: MS^E

采集范围: m/z 50~2000

毛细管电压: 1.2 kV

碰撞能量: 60-120 V

锥孔电压: 20 V

数据管理

信息学软件: 搭载Peptide MAM和UNIFI应用程序的
waters_connect

结果与讨论

通过UNIFI应用程序中MS仪器参数下的对话框启用智能数据采集设置。如图1所示，可从下拉菜单中选择控制数据去噪程度的IDC设置，其中包含三个默认设置（15、10和5）以及一个自定义设置选项。我们评估了三个默认IDC参数对Peptide MAM数据、监测%肽属性水平和新峰检测功能(NPD)的影响。减少MS数据中的仪器和化学噪音伪影可以显著缩减文件大小，还能缩短数据处理时间，这是使用通过waters_connect Peptide MAM应用程序处理的数据测量的。

Settings
Experiment
Options
Events

MS^E Experiment

Acquisition time

Use analysis method run time

Use custom run time

Start time: min End time: min

Scan settings

Mass range:

Scan time: s

Collision energy

Low energy: V

High energy ramp: V to: V

Intelligent Data Capture

Intensity threshold:

图1. MS方法中的智能数据采集(IDC)功能提供降噪能力递增的4个默认降噪级别：关闭、5、10和15，还提供用户指定阈值的自定义设置选项。

使用IDC生成的相同%修饰水平

为优化在Peptide MAM中使用IDC的优势，我们分别使用15、10、5和0（关闭）水平的IDC阈值获取了NIST mAb

酶解物的数据。我们在Peptide MAM应用程序中处理数据，以确定30个选定质量属性的%修饰水平。图2A显示了HC T25: EEQYNSTYR糖肽的结果。糖肽是强度相对较低的肽，可能会因数据简化算法的不当应用而受到不成比例的影响。通过启用IDC和关闭IDC采集的数据对选定糖肽生成了一致的%修饰曲线，包括检测到较低水平的T25未修饰(0.53%–0.58%)和Man5 T25(1.26%–1.13%)峰。Man5糖肽仅为基峰肽强度的0.08%。此外，在使用15和0（关闭）的IDC设置时，IDC使采集的Man5谱图保持了MS谱图质量（图2B）。两张MS谱图均显示 m/z 1203.2711处+2电荷态峰的同位素分布一致。相对于关闭IDC采集的数据，IDC 15数据显示基线噪声水平更低，从而产生质量更高的谱图和更小的数据文件。

高质量的新峰检测(NPD)数据

NPD在MAM数据处理期间的靶向肽属性监测之后执行。目标是与参比对照样品（图3A）相比，识别实验样品中新的或显著变化的峰。这些“新”峰可能代表意外的产品变体或与产品/工艺相关的杂质，它们的特征在药物开发过程中发生了改变。但是，手动验证每个新峰会耗费时间和资源，尤其是在受到法规监管的质量和制造环境中，新峰也可能引发代价高昂的不合格(OOS)调查和产品上市延迟。配备实时降噪功能的IDC采集可以消除由于LC-MS采集伪影造成的潜在假阳性峰。如图3所示，该实验共评估三个处理级别，IDC 15、IDC 5和IDC关闭数据采集。使用常见的默认参数（图3A）筛选新峰的数据集。IDC 15处理（图3B）在阴性对照中未检出新峰，在加标对照（阳性对照）中检出15个新峰，在降解mAb样品中检出136个峰。加标样品的NPD数据与实验部分所述的15种加标重元素标记肽匹配（图3C）。与IDC 15相比，在IDC 5条件下采集的数据显示出更高的新峰水平（图3D），并且包含多个假阳性鉴定结果（图3D）。在IDC关闭条件下采集的数据（未显示）中，假阳性结果增加更为明显，清楚地证明了IDC在消除假阳性结果的同时保留所有真实新峰的能力。

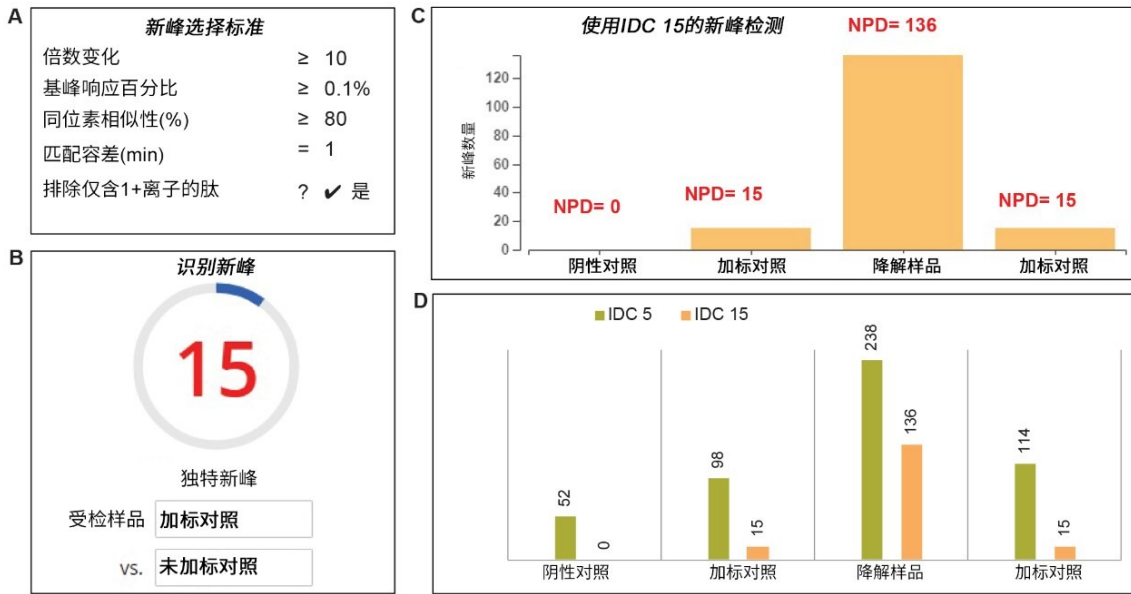


图3.基于Xevo G2-XS的MAM新峰检测(NPD)。图中显示了waters_connect Peptide MAM应用程序使用的筛选标准 (A图)，以及使用该标准生成的15个“新”峰结果 (B图)，用于对15肽加标样品与未加标对照样品进行二元比较。还显示了使用IDC 15数据采集条件时，与对照样品相比，在加标和降解mAb样品中检出的新峰 (C图)。基于Peptide MAM应用程序在处理较弱的降噪设置时产生更高假阳性率的表现，确定了IDC 15相较于IDC 5对于采集NPD数据的优势。

缩减数据文件大小并缩短处理时间

复杂MAM研究产生的大型文件和数据集可能会给数据管理系统带来不必要的压力。智能数据采集将通过实时数据噪音处理和缩减原始数据文件大小提供数据采集解决方案。此功能通过消除会产生干扰的大部分化学和机械噪音来实现，而不是对产生有意义结果的真实峰信号加强处理。通过在选定的IDC 5、10和15级别启用IDC进行Peptide MAM数据采集，与IDC关闭采集相比，显著压缩了数据文件大小 (图4A)：从IDC“关闭”到IDC 5，文件大小缩减65%，在IDC 15设置下缩减90%以上。因此，其他三个设置下的Peptide MAM数据处理速度相比IDC关闭采集均更快 (图4B)。在IDC 15条件下观察到最佳的数据降噪水平，数据处理总时间减少75%，对于2次进样的数据集，与IDC关闭采集的数据相比，处理时间节省3小时以上。

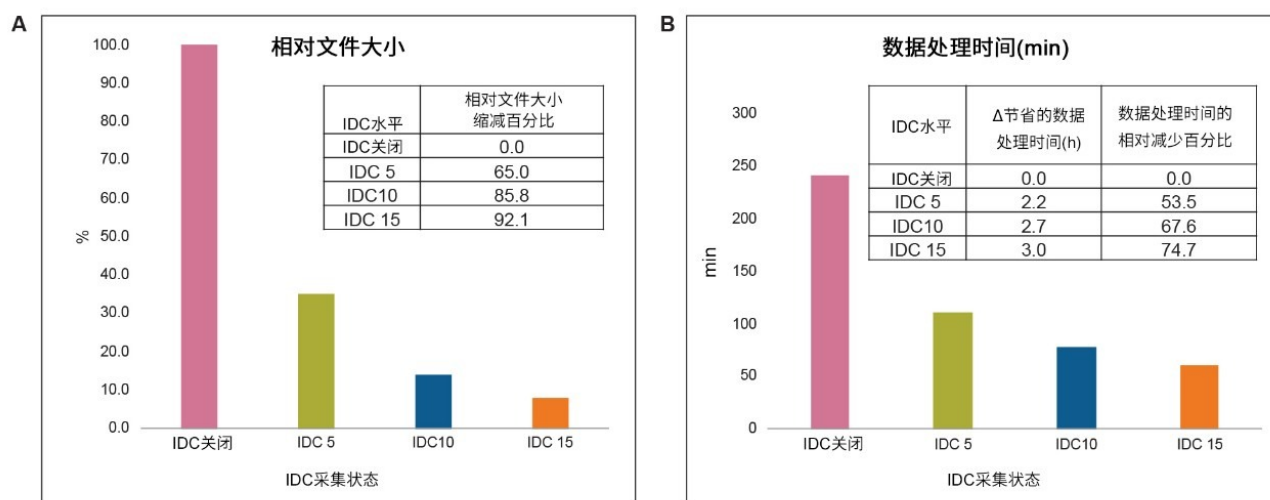


图4.随着在数据采集期间逐步应用更严格的IDC设置，平均文件大小(A)显著缩减。IDC关闭与IDC 15采集之间的数据文件大小缩减92%。(B) IDC 15与IDC关闭相比，两次进样的Peptide MAM应用程序处理时间相应减少多达75%。

结论

在waters_connect控制下运行的Xevo G2-XS QToF上应用智能数据采集(IDC)功能经证明有益于Peptide MAM分析的许多方面。能够生成更高质量的MS数据，同时显著缩减数据文件大小和缩短数据处理时间，提升Peptide MAM分析工作流程用户的效率。在得到最佳结果IDC 15采集条件下，产生了与IDC关闭数据相当的%修饰结果，表明对灵敏度或目标属性的相对分析没有影响。此外，IDC 15采集大幅减少了NPD中假阳性新峰的数量，同时在加标mAb样品MAM分析过程中识别出所有预期新峰。综上所述，这些结果清楚地表明，Xevo G2-XS平台上的MAM工作流程用户可以充分利用IDC采集数据，更好、更快地生成准确且有意义的Peptide MAM结果。

参考资料

1. Mortishire-Smith, R.; Richardson, K.; Denny, R.; Hughes, C. Intelligent Data Capture: Real-Time Noise

Reduction for High Resolution Mass Spectrometry. Waters White Paper, [720006567EN](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006567en.pdf>> (2019).

2. Ippoliti, S.; Yu, Y., Q.; Mortishire-Smith, R. Peptide Mapping Using Intelligent Data Capture on Vion IMS QToF. Waters Application Brief, [720006636EN](#). (2019).

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

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

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

waters_connect <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>>

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/waters/10195515>>

720007441ZH, 2021年12月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.