

自动执行微型生物反应器细胞培养物样品的快速高通量LC-MS mAb亚基筛选

Alireza Aghayee, Yamin Htet, Stephan M. Koza, Lindsay Morrison, Henry Shion, Ying Qing Yu

Waters Corporation

摘要

单克隆抗体(mAb)仍然是快速增长的生物药物类别之一，并且正在大幅改善世界各地患者的生活质量。成功发现和开发mAb治疗药物需要采用复杂的分析技术，这些技术可以快速测量对这些药物的安全性和有效性产生极大影响的关键产品属性。因此，对用于监测在克隆选择阶段和工艺开发过程中产生的蛋白质的高通量分析平台的需求日益增加¹。

由于mAb在宿主细胞培养基中进行生产，因此大规模、异质结构监测mAb生产带来了许多分析挑战。选择合适的克隆通常需要并行培养数十到数百个转染细胞系，因此需要分析许多样品。细胞培养条件的优化通常还需要并行培养，每次实验需要对每种培养基至少分析一次。这需要样品制备快速且分析仪器稳定的高通量方法，以及轻松、简单的数据解析。作为方法的组成部分，自动化样品制备方案可以提高样品通量并改善生物制药开发中分析工作流程的效率²。

本文介绍了一种对直接从复杂样品（例如包括宿主细胞蛋白质在内的细胞培养基）中获得的mAb进行样品制备和LC-MS分析的全自动化工作流程。该方法包括使用蛋白A的mAb纯化步骤以及之后的FabRICATOR® (IdeS)酶解和DTT还原步骤，可得到适合使用Waters™ BioAccord™ LC-MS系统进行高通量LC-MS分析的mAb亚基。

优势

- 使用Andrew+™移液机器人，根据全自动化蛋白A和Ides酶解方案进行快速mAb亚基分析
- 使用BioAccord™ LC-MS系统与waters_connect™信息学解决方案/INTACT Mass™应用程序³进行高通量LC-MS分析
- 使用BioResolve™ RP色谱柱通过反相UPLC™分析还原的亚基，用这种孔径为450 Å的实心核颗粒获得优异的峰形和分离度

简介

治疗性mAb的开发和生产需要密切监测多个产品质量属性。其中涉及到多种需要评估的产品质量属性，例如N-糖基化、氧化、C端赖氨酸裁剪和糖化。在克隆选择和整个工艺开发过程中，通常需要分析大量样品，以确保最终产品获得成功。这可能会形成瓶颈，延缓新治疗药物的开发，或者限制工艺优化的程度。最终，快速LC-MS方法以及样品制备和样品分析等常规流程的自动化有助于缓解这一瓶颈。我们已经证明，可以快速分析完整水平的mAb，并且只需极少的样品制备⁴。然而，完整mAb分析可能会限制在不使用高分辨率LC-MS仪器的情况下能够追踪的蛋白质属性。

对亚基形式的mAb进行快速、高通量筛选有可能促进生物制药产品的开发并改善其整体质量，同时降低生产成本。在本研究中，使用FabRICATOR (IdeS)蛋白酶在铰链下方的特定位点裂解抗体，然后通过DTT还原轻链与重链之间的二硫键，生成mAb亚基（大小为23~25 kDa）。亚基比完整的mAb更均一且质量数足够低，可以使用价格适中的MS仪器获得质量足够高的谱图，同时仍然提供相当短的分析时间和简化的数据解析。本文介绍了一个用于纯化和酶解直接从细胞培养基中收获的治疗性mAb的全自动化工作流程。该方法使用蛋白A磁珠进行纯化，然后进行酶解/还原的联合操作。利用Andrew+移液机器人实现整个样品制备过程的自动化，得到可供Waters BioAccord LC-MS系统分析的亚基。为开发更适合与微型生物反应器配合使用的程序，本研究直接（使用未纯化的培养基）使用小体积（20 μL至100 μL）mAb培养基样品，或使用经蛋白A纯化的样品，进行完整分析或亚基水平的分析⁵。

样品描述

未转染的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞培养基由Syd Labs, Inc.提供。简而言之，在第1天将 6×10^6 个CHO-K1细胞/mL接种到烧瓶中，并在120 mL培养基中温育。第2天，从烧瓶中收集100 mL培养基并进行0.2 μm过滤。每天重复此操作，直至第15天。将所有收集的培养基合并然后储存于4 °C。在整个细胞培养过程中相应地记录细胞活力和数量（图1a）。然后，将曲妥珠单抗(T-mab)加入收集的细胞培养基中，以制备0.5 μg/μL的样品，得到已知浓

度的模拟培养基样品（图1b至1c）。将该细胞培养后期观察到的细胞活力较低的等分试样纳入模拟样品中，为样品纯化步骤提供更大的挑战。

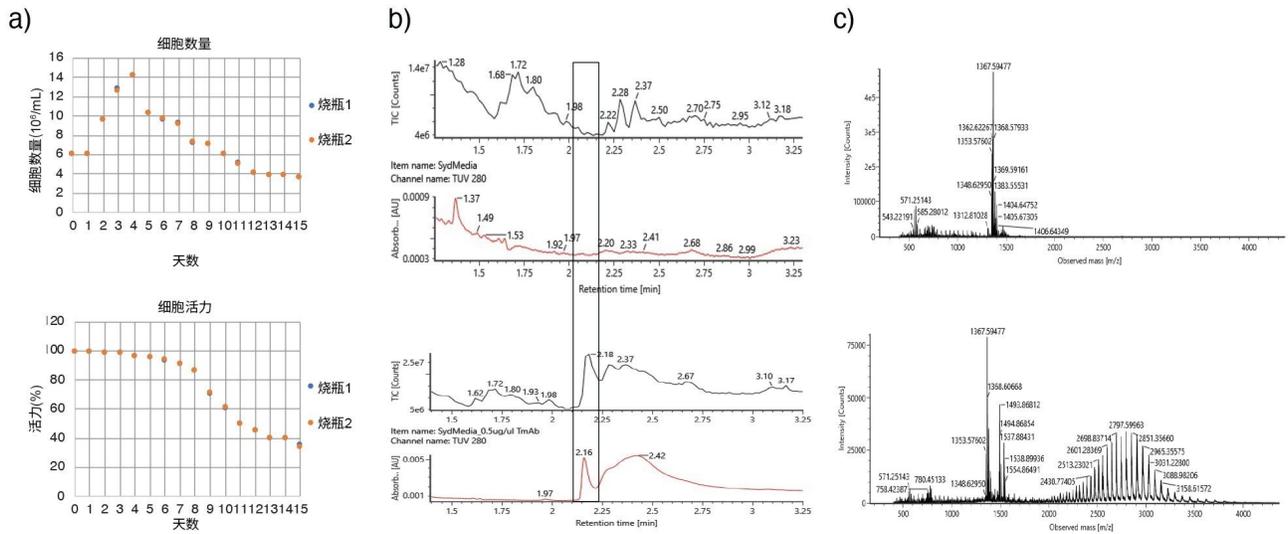


图1.a)在15天内培养的未转染CHO细胞的细胞计数和细胞活力。b-c) CHO细胞培养基（上图）和加标曲妥珠单抗后（下图）的直接LC-MS分析结果（b: TIC迹线，c: 质谱图）。

样品前处理

使用Andrew+移液机器人开发出用于样品制备的全自动化工作流程。通过将100 µL样品（具有指定浓度）与Magne®蛋白A磁珠（Promega，每个样品50 µL浆液）一起温育，然后在96孔板形式的Andrew+机器人上使用Magnet+设备捕获磁珠，对来自细胞培养基的mAb进行纯化。清洗后，将纯化的mAb在50 µL甘氨酸-HCl (2M, pH 2.5)中洗脱两次（总共100 µL），然后加入60 µL由MES (100 mM)和Tris-HCl (900 mM)组成的中和缓冲液(pH 7.5)中。

然后，取20 µL纯化的mAb（浓度<0.5 µg/µL）的等分试样，向每份样品中加入10 µL 2个单位/µL的FabRICATOR (Ides)和30 µL 40 mM二硫苏糖醇(DTT)进行酶解和二硫键还原，在37 °C下温育60 min得到三个mAb亚基（Fc/2、轻链和Fd'）。有关Andrew+机器人的详细方案可以从OneLab数据库(onelab.andrewalliance.com)下载。使用的所有试剂和化学品如下表所示（表1）。

方案规格	材料	体积
细胞培养基	过滤后的CHO细胞培养基	100 μL/孔
磁珠	Promega Magne™ 蛋白A亲和磁珠	50 μL/孔
平衡缓冲液	1×磷酸盐缓冲盐水(PBS), pH 7.4	3 × 150 μL/孔
结合缓冲液	1× PBS pH 7.4	3 × 150 μL/孔
清洗缓冲液	1× PBS pH 7.4和水	3 × 150 μL/孔
洗脱缓冲液	甘氨酸盐酸盐, 200 mM, pH 2.5	2 × 50 μL/孔
中和缓冲液	MES 100 mM和Tris-HCl 900 mM, pH 7.5	60 μL/孔
Fabricator	Ides水溶液, 2个单位/μL	15 μL/孔
缓冲液中的DTT	盐酸胍6 M和Tris-HCl 200 mM中的DTT	35 μL/孔
样品平台	96孔twin.tec PCR板, 带裙边, 绿色, Eppendorf	200 μL/孔

表1.用于mAb纯化和酶解的所有试剂和材料的列表。

Andrew+自动化

Andrew+移液机器人可提供简化的全自动化蛋白质纯化和酶解方案, 如图2所示。相比之下, 其他自动化液体处理器仅能提供半自动方案, 需要1~5个手动干预步骤才能完成类似程序⁵。



位置	Domino 和互联装置
1,2,3,4,5	吸头盒 (10-300 μL)
6,7	微孔板 Domino
8	平板加热振荡器+
9	96-PCR 板 Magnet+
10, 11	深孔微量滴定板

图2.最多可处理48个样品的自动化蛋白A纯化和亚基分析的Andrew+ Domino和互联装置配置。

LC-MS分析

采用4.5 min反相LC-MS方法，在Waters BioAccord系统上根据表2中的参数使用0.1%甲酸和乙腈流动相对mAb亚基进行LC-MS分析。所有数据均使用UNIFI v2.1.2.14进行采集和处理。

液相色谱条件

液相色谱系统： ACQUITY™ UPLC I-Class PLUS

检测条件： TUV检测器

样品收集： 96孔twin.tec PCR板，带裙边，绿色，Eppendorf，部件号：951020443

色谱柱： BioResolve RP色谱柱, 450 Å, 2.7 μm, 2.1 mm × 100 mm, 部件号：176004157

柱温： 80 °C

样品温度： 10 °C

进样体积： 3 μL

流速： 0.4 mL/min

运行时间： 4.5 min

流动相A： 0.1%甲酸水溶液

流动相B： 0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)	曲线
0	0.4	80	20	初始
2	0.4	59	41	6
2.2	0.4	15	85	6
2.3	0.4	15	85	6
2.5	0.4	80	20	6
3.5	0.4	59	41	6
3.6	0.4	15	85	6
3.65	0.4	15	85	6
3.8	0.4	80	20	6
4.5	0.4	80	20	6

质谱条件

质谱系统: ACQUITY RDa™

电离模式: ESI+

采集范围: 50-2000 *m/z*

毛细管电压: 1.50 kV

扫描速率: 2 Hz

锥孔电压： 30 V

实时校正标准液： waters_connect实时校正标准
液试剂盒（部件号
： 186009298）

数据管理

数据采集和处理软件： 带有INTACT Mass应用程序的
waters_connect

结果与讨论

使用小体积(20~100 μ L)细胞培养基进行纯化和酶解的全自动化样品制备采用Andrew+移液机器人，以96孔板形式进行。从细胞培养物等粗样品中亲和纯化mAb是治疗性抗体工艺开发和生产过程中的标准程序。该程序通常使用亲和配体（例如与IgG特异性结合的蛋白A）进行。蛋白A纯化可能是一个繁琐的过程，因为它涉及大量平衡和清洗步骤，并且占用分析人员的大量时间（图3a）。在完整水平上，未纯化和纯化的样品所产生的MS结果相当。然而，经蛋白A纯化的样品还产生了更高质量的色谱图，与制剂缓冲液中完整mAb的色谱图非常相似（图3b）。

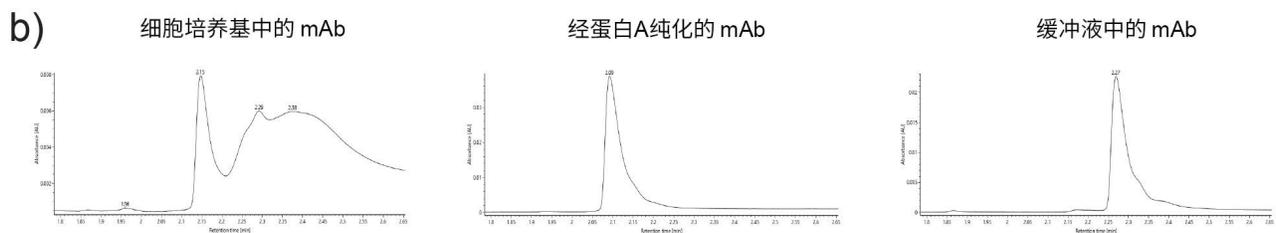
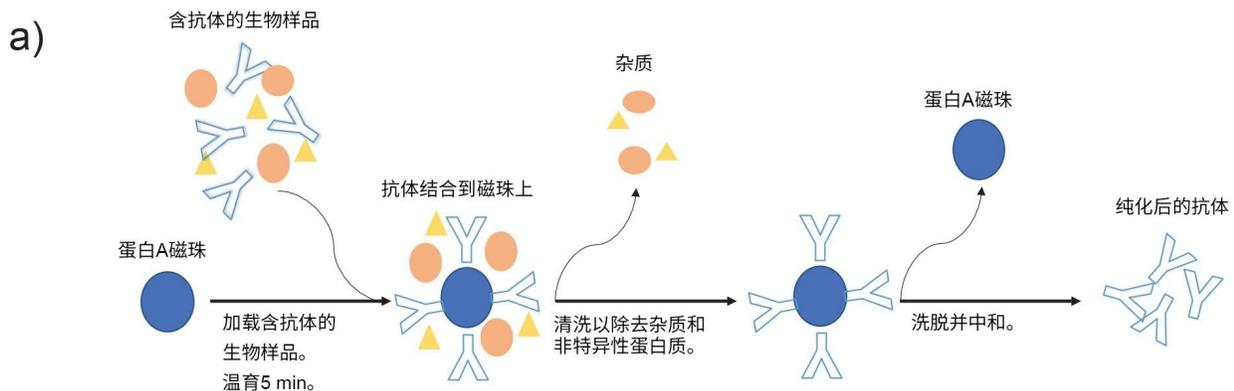


图3.a)使用蛋白A偶联磁珠纯化抗体的示意图。b)经过蛋白A纯化的细胞培养基中的mAb以及缓冲液中的mAb的色谱图。

一种使用Andrew+移液机器人的高重现性、可扩展且全自动的96孔板方案，专为细胞培养物样品而设计。在Shaker+装置上将样品与蛋白A磁珠一起温育，然后使用Magnet+装置捕获蛋白A磁珠，以去除流出的馏分。清洗蛋白A磁珠以及捕获的mAb，并使用低pH清洗液洗脱纯化的mAb。中和pH后，在二硫键还原剂DTT的存在下，使用FabRICATOR (Ides)对纯mAb样品进行酶解。由此在96孔板上产生还原的mAb亚基，其适合直接转移至BioAccord LC-MS系统的自动进样器。馏分分析证明，从细胞培养基中有效捕获了mAb，然后使用FabRICATOR (Ides)和DTT洗脱纯mAb并酶解成亚基（图4）。

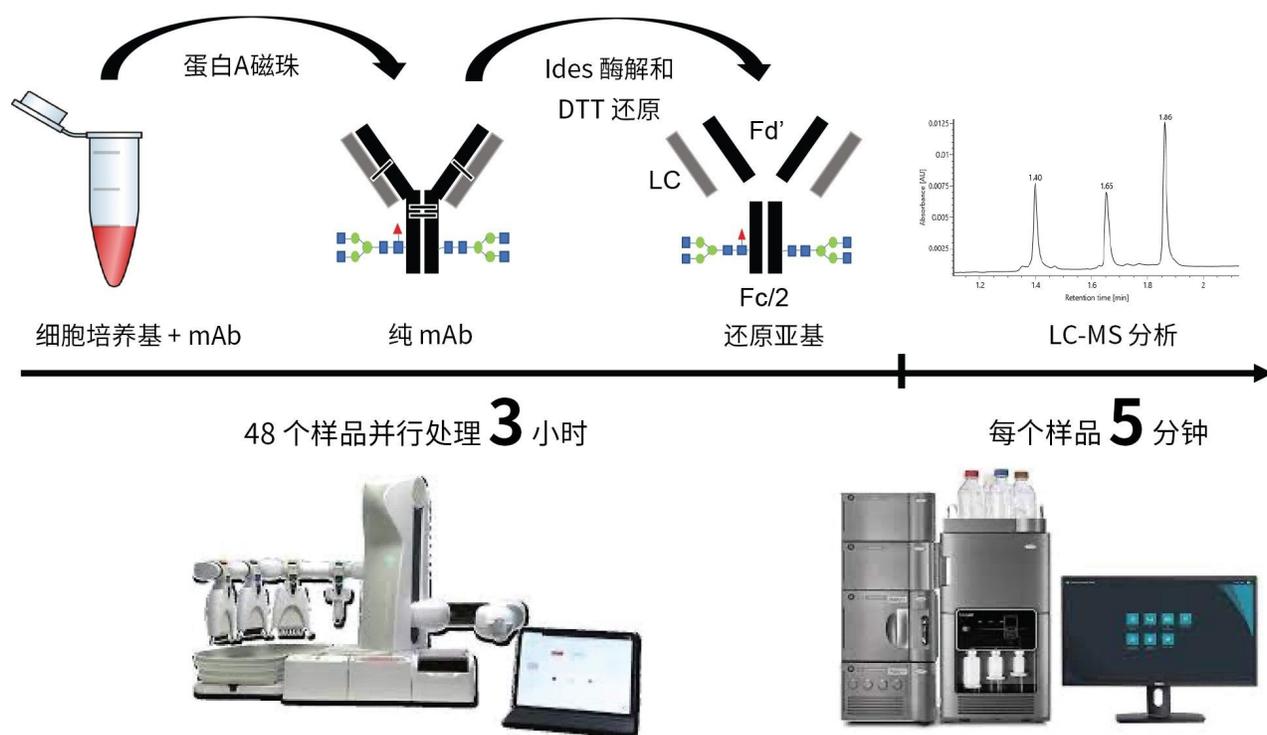
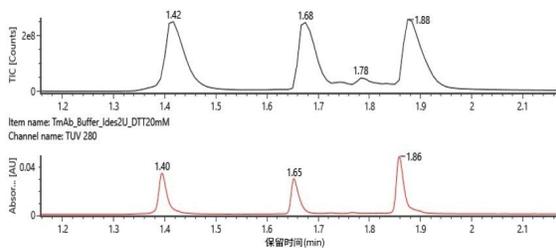


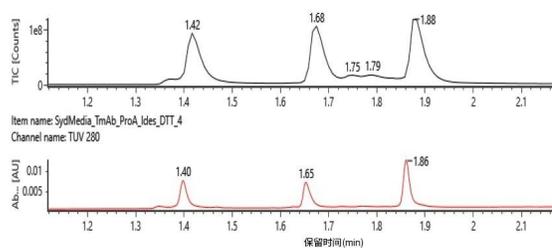
图4.使用Andrew+进行自动化抗体纯化和酶解以及使用Waters BioAccord系统进行快速LC-MS分析的工作流程。

在BioAccord LC-MS上使用BioResolve RP色谱柱通过反相UPLC分离还原的亚基。利用沃特世mAb亚基标准品（部件号：[186008927 <https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html>](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008927-mab-subunit-standard.html)）对系统性能进行基准测试。确定RDa检测器用于亚基分析的质量精度符合标准 (<20 ppm)。纯化样品的LC-MS分析得到所有三个亚基的高质量谱图（图5a至5c），可以对不同修饰（例如Fc糖基化）进行相对定量。未纯化的细胞培养物样品的直接LC-MS分析未得到适合LC-MS分析的亚基（图5d）。这可能是由于未纯化的细胞培养基中酶促反应效率低下以及存在宿主细胞蛋白。

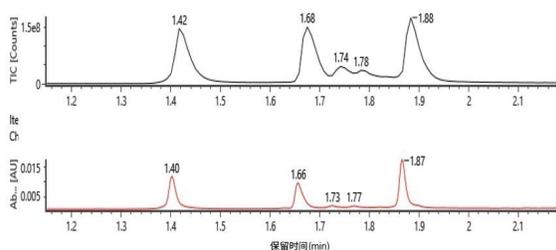
a) 制剂中的对照 mAb



b) 细胞培养基中经蛋白A纯化的 mAb
手动方法



c) 细胞培养基中经蛋白A纯化的 mAb
自动方法



d) 直接分析细胞培养基中的 mAb

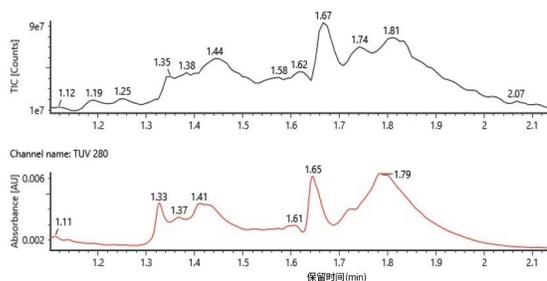


图5.a-c)来自纯化和酶解的mAb的亚基的LC-MS分析结果。d)未纯化和酶解的mAb。

利用手动方案和Andrew+机器人方案生成的蛋白A纯化和酶解的mAb的LC-MS结果相似，且所有结果与对照样品的结果相当（表2）。这些亚基水平的分析有利于轻松解释LC、Fd'和Fc/2的实验结果，并提供有关mAb Fc糖基化的信息（图6）。

亚基	对照方法的平均亚基质量数 (Da)	手动方法的平均亚基质量数 (Da)	Andrew+方法的平均亚基质量数(Da)
LC	23443.26 ± 0.03	23443.18 ± 0.05	23443.19 ± 0.05
Fd'	25383.39 ± 0.07	25383.13 ± 0.09	25383.59 ± 0.07
Fc/2			
•G0	25089.67 ± 0.08	25089.30 ± 0.16	25089.04 ± 0.13
•G0F	25236.05 ± 0.05	25236.07 ± 0.11	25236.02 ± 0.09
•G1F	25398.37 ± 0.06	25398.30 ± 0.12	25398.46 ± 0.08
•G2F	25560.82 ± 0.12	25560.64 ± 0.26	25560.14 ± 0.26

表2.对照（缓冲液中的*TmAb*，无*Pro A*，酶解）、手动（细胞培养基中的*TmAb*，经*Pro A*纯化，酶解）和自动化（细胞培养基中的*TmAb*，经*Pro A*纯化，酶解）方案之间的亚基LC-MS分析比较。对于每种条件，*N*=8。

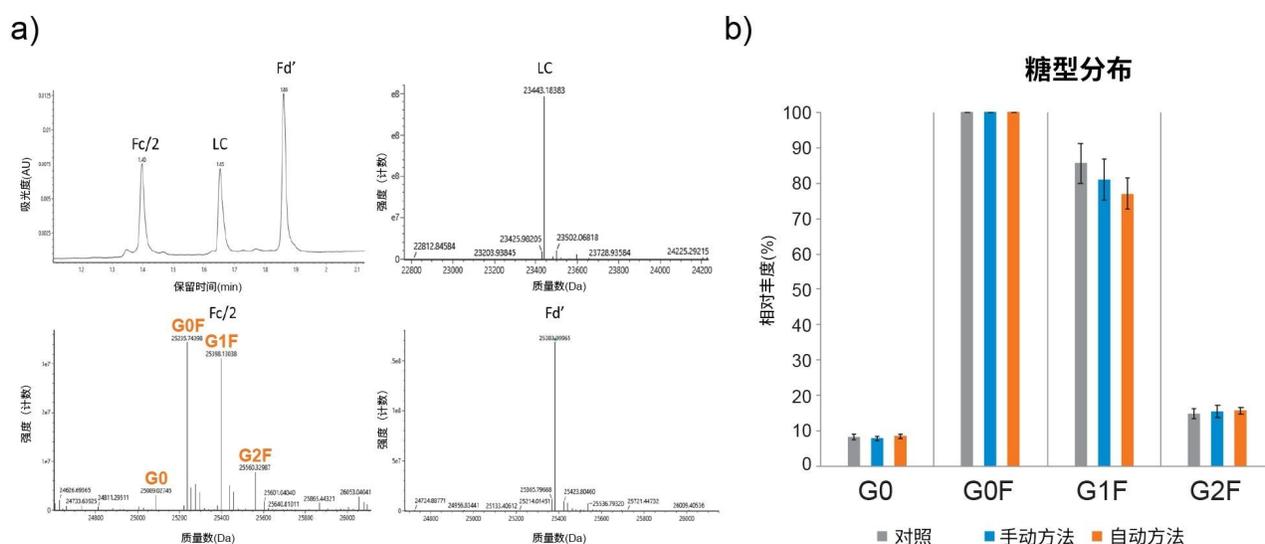


图6.a)亚基水平的分析解释了LC、Fd'和Fc/2的结果；b)来自利用手动方案（蓝色）和Andrew+辅助方案（橙色）生成的Fc/2肽段的去卷积质谱图的Fc N-糖基化谱图，以及与对照（灰色）的比较。对于每种条件，*N*=8。

结论

开发和实施分析方法以促进重组蛋白质工艺开发可能具有挑战性，因为高效和稳定的分析至关重要。通过有效的自动化样品制备和LC-MS筛选，我们已经证明可以直接从复杂的培养基中分析mAb以确定若干重要的产品质量属性。

这种用于纯化和酶解的全自动化组合方案对于8个样品需要大约2小时，对于48个样品需要大约3小时，并能够一致、可靠地生成类似于手动执行程序的结果。此外，由于所需的样品量极少且磁珠纯化步骤可扩展，该程序可用于制备低至0.5 µg的有限样品量和高达10 µg mAb的样品量，因此适合与微型生物反应器和更大规模的生物反应器装置配合使用。

此外，BioAccord LC-MS系统与waters_connect信息学解决方案/INTACT Mass应用程序简便易用，可通过自动化数据采集和处理来提高分析人员的工作效率，实现对mAb亚基的高通量质量数确认。

参考资料

1. Lu, RM., Hwang, YC., Liu, IJ. *et al.* Development of Therapeutic Antibodies for the Treatment of Diseases. *J Biomed Sci* 27, 1 (2020).
2. Jia Dong, *et al.*, High-Throughput, Automated Protein A Purification Platform with Multiattribute LC-MS Analysis for Advanced Cell Culture Process Monitoring, *Anal.Chem.* 2016, 88, 8673-8679.
3. Shion 等人, INTACT Mass™ - 一款用于生物治疗药物快速质量数确认和纯度评估的通用waters_connect™应用程序, 沃特世应用纪要, [720007547ZH](#), 2022年2月.
4. Lindsay Morrison, *et al.*, Direct LC-MS Characterization of Glycoform Distribution and Low Molecular Weight Impurities in mAb Process from Ambr® 15 Bioreactors, Sartorius Application Note, March 29, 2022.
5. Elsa Wagner-Rousset, *et al.*, Antibody-Drug Conjugate Model Fast Characterization by LC-MS Following Ides Proteolytic Digestion, *mAbs*, 6:1, 173–184.
6. Kuhn, E.; Fabbami, L.; Heuvel, Z. V. D.; Murphy, S.; Jaffe, J. D.; Carr, S. A. Automation of the Multiplexed Peptide Immune-MRM-MS Workflow on Bravo AssayMAP Platform. Broad Institute, Cambridge, MA; Agilent Technologies, Santa Clara, CA.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

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

[ACQUITY RDa检测器 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027)

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

[UNIFI生物制药平台解决方案 <https://www.waters.com/waters/10195515>](https://www.waters.com/waters/10195515)

720007615ZH, 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