

Similis Bio - 在生物工艺和开发过程中采用精简的mAb亚基LC-MS工作流程对候选mAb生物类似药进行多属性监测

Samantha Ippoliti, Jared Young, Katy McNally, Caitlin Hanna, Ying Qing Yu, Bradley Prater, Mark Wrona, Emma Harry

Waters Corporation, Similis Bio

摘要

本应用纪要总结了Similis Bio与Waters Corporation™合作开展的一项研究，证明分析人员可以对反应器样品实施自动化的蛋白A纯化处理和LC-MS mAb亚基分析，以便与原研药比较，帮助筛选候选单克隆抗体(mAb)生物类似药，从而为工艺开发提供支持。已知达到一定浓度的N-寡糖不仅会影响翻译后修饰(PTM)（如C端赖氨酸变体和其他亚基特异性修饰（LC和Fd'）），还会影响药代动力学和效应器功能活性。实验证明，该方法具有足够的灵敏度和精密度，可以定量这种浓度下的N-寡糖。这种mAb亚基LC-MS监测方法可以为生物制药和生物制造组织的mAb生物工艺、开发和质量控制提供支持。

优势

- 使用Andrew+™移液机器人，先对细胞培养物样品进行自动ProA纯化，然后进行FabRICATOR™亚基酶解
- 使用BioAccord™ LC-MS系统简化LC-MS采集，作为一款专为适应不同专业水平的分析人员而设计的台式TOF质谱仪，任何分析人员都可以轻松操作它
- 利用waters_connect™ Intact Mass应用程序轻松完成自动化数据采集和分析，借助合规功能保障数据可靠性

- 使用这种mAb亚基LC-MS方法可以定位Fab修饰与Fc修饰
- 证明mAb亚基LC-MS工作流程与游离N-糖分析结果之间具有正交性

简介

由于生物类似药有望为一系列疾病提供更实惠、更有效的治疗方法，近年来这类药物的开发展现出强劲势头。然而，生物类似药的开发不仅复杂而且相当具有挑战性，不仅需要开展大量表征工作，还需要和参比产品做比较。在产品开发生命周期的早期阶段，克隆选择会显著影响产品能否匹配目标产品质量特性。由于表达动力学和细胞应激反应，不同克隆的N-寡糖谱和常见PTM（例如C端赖氨酸、侧链氧化和糖基化）可能会有所不同。因此，在克隆选择过程中评估这些产品质量属性有助于筛选出特性与原研药高度匹配的克隆，从而降低后续工艺开发成本。此外，评估细胞培养补料培养基和补充剂的实验设计(DoE)研究也会采集许多样品，需要通过多种分析方法进行检测，以便指导工艺开发。这会造成巨大的分析检测负担，必须设法缩短周转时间才能实现迭代开发工作流程。

本研究使用快速、自动化的mAb亚基属性即时监测工作流程（图1），在克隆选择和上游工艺开发过程中比较并筛选了mAb生物类似药的产品质量属性。使用Andrew+移液机器人对取自Sartorius Ambr250™高通量生物反应器的生物类似药样品进行自动化蛋白A (ProA)亲和捕获，并使用Genovis FabRICATOR进行亚基酶解。然后使用BioAccord LC-MS系统分析经过纯化和FabRICATOR酶解的样品，对游离亚基进行完整分子量分析。每个样品完成采集后，由waters_connect信息学平台中的Intact Mass应用程序自动采集、处理数据，并将数据可视化。



图1.mAb亚基MAM工作流程，使用Andrew+机器人平台进行自动化样品前处理（ProA纯化和FabRICATOR酶解），然后使用搭载waters_connect信息学软件的BioAccord LC-MS系统采集和处理LC-MS数据。

采用这种通量较高的方法可以得到N-糖基化图谱、未加工C端赖氨酸丰度、糖基化和氧化水平，所得结果与采用正交分析技术测得的各项质量属性相当，而且在自动化、可扩展性和通量方面具有显著优势。决策者尤其关注分析方法对高甘露糖和无岩藻糖基化游离寡糖的灵敏度，因为这些物质在较低的相对丰度下也可能大幅影响mAb药代动力学(pK)和效应器功能活性。该mAb亚基LC-MS工作流程能够充分满足生物类似药开发早期阶段对数据灵敏度、精密度和重现性的要求。Genovis最近提出了一套类似的mAb亚基LC-MS监测工作流程，证明BioAccord系统是在mAb亚基水平高效进行常规产品质量属性监测的理想平台¹。

实验

样品描述（自动纯化）

使用最近发布的Andrew+机器人平台（配备Extraction+模块）工作流程²纯化细胞培养样品。简言之，使用每个孔中装填有ProA树脂的0.2 μm滤板，清洗，然后上样。先清洗每个样品，然后将其洗脱到含有中和缓冲液的收集板中（图2A）。使用两个克隆制备同一产品的不同细胞培养物样品，下文分别称之为“生物类似药”和“生物类似药-阴性对照”。

样品描述（亚基酶解）

使用Andrew+自动化系统（配备Heater/Shaker+模块），将20 μL浓度约为1 mg/mL的ProA纯化样品（以及原研

药（市售药）样品）转移到PCR板中，用于可以一并还原部分亚基的一步式亚基酶解步骤。取10 μL 制备好的混合母液（图2B）（2单位/ μL FabRICATOR酶，50 mM Tris，10 mM DTT，pH 7.5）加入每个样品孔中，然后将板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 下温育30 min（图2C）。用0.1%甲酸水溶液将样品稀释5倍（至0.1 mg/mL），供LC-MS分析使用（图2D）。

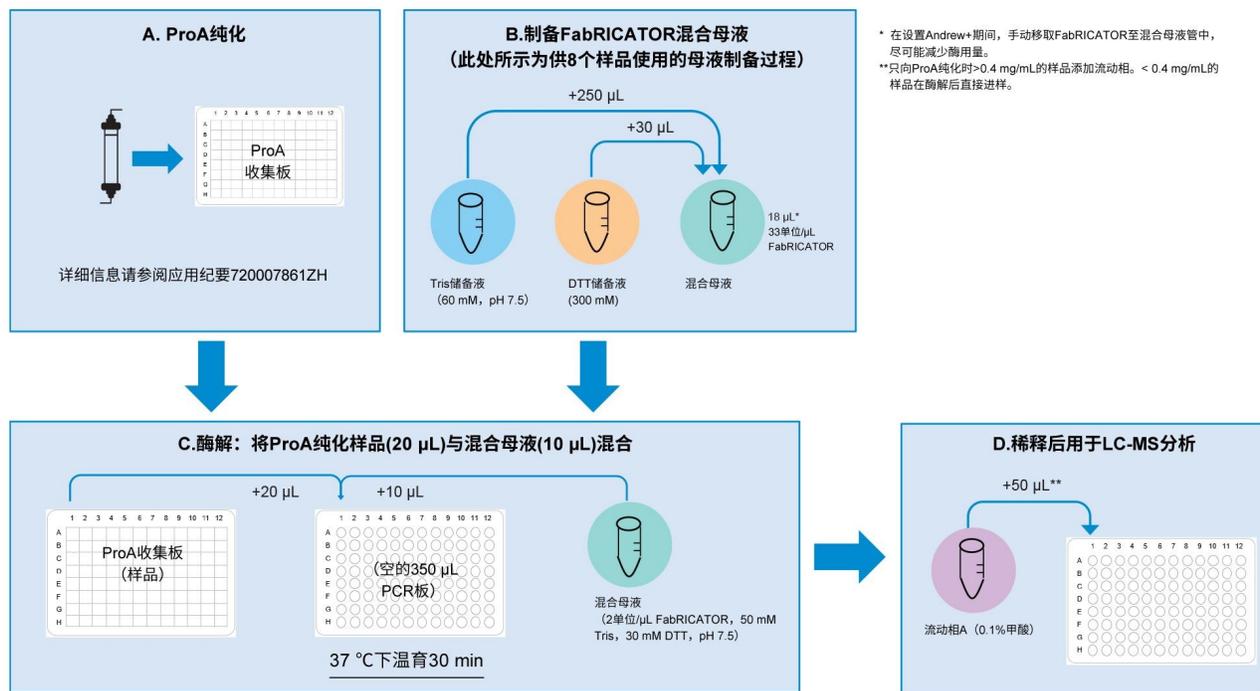


图2.使用Andrew+移液机器人对亚基进行样品前处理

蛋白A和FabRICATOR样品前处理

机器人系统：

配备Extraction+和Heater/Shaker+模块的
Andrew+移液机器人

软件：

OneLab (Andew Alliance/沃特世)

过滤板：

Pall AcroPrep™ Advance 96孔过滤板 - 350 μL ,
0.2 μm Supor™滤膜 (P/N: 8019)

收集板:	QuanRecovery™ 700 µL 96孔板 (P/N: 186009184)
亚基酶解板:	Eppendorf twin.tec™ PCR Plate 96 LoBind™ (例如, P/N: 0030129555)
蛋白A树脂:	Cytiva MabSelect™ (P/N: 17519901), 浆液含量约为25% (1:1, PBS:50%树脂)。针对50%树脂, 1000 x g离心3 min, 然后用体积等于树脂体积的400 mM NaCl的20%乙醇溶液置换上清液。
PBS:	磷酸盐缓冲液 (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、8 mM Na ₂ HPO ₄ 和2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4)
中和缓冲液(NB):	1M Tris HCl, pH 7.5
洗脱缓冲液(EB):	100 mM甘氨酸, pH 3.0
轨道振荡器:	Eppendorf Thermomixer® C (8 °C)
FabRICATOR酶:	Genovis (P/N: A0-FR1-020)
二巯基苏糖醇(DTT):	Pierce No-Weigh DTT (P/N: A39255)

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ Premier UPLC系统
检测:	ACQUITY UPLC TUV(280 nm)
色谱柱:	BioResolve™ RP色谱柱, 2.7 µm, 2.1 x 100

	mm (P/N: 186008945)
柱温:	60 °C
样品温度:	6 °C
进样:	0.5 µg经FabRICATOR酶解的mAb (0.1 mg/mL样品进样5 µL)
流速:	0.3 mL/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	0.3	80	25	6
10.0	0.3	60	40	6
10.3	0.3	20	80	6
11.3	0.3	20	80	6
11.6	0.3	80	25	6
15.0	0.3	80	25	6

质谱条件

质谱系统:	ACQUITY RDa™
电离模式:	ESI正离子

采集范围:	400~7000 <i>m/z</i> (高质量)
毛细管电压:	1.5 kV
锥孔电压:	50 V
脱溶剂气温度:	550 °C

数据管理

使用waters_connect信息学平台 (3.1版) 中的Intact Mass应用程序 (1.4.0.0版) 采集和处理数据。

结果与讨论

mAb亚基LC-MS属性监测工作流程在样品分析时间方面折衷, 将其缩短为15 min, 但仍然是监测原研药和mAb生物类似药重要局部产品质量属性的好方法³⁻⁷。本文介绍的研究从Ambr250生物反应器即时采样, 自动执行ProA纯化和FabRICATOR亚基酶解, 然后进行LC-MS分析。使用Intact Mass应用程序中的Acquire and Process (采集和处理) 功能 (图3), 用户可以设置分析序列、监测实时数据读数, 还可以在每次进样完成数据采集后查看去卷积/处理后的数据。由于可以在仪器运行后续样品的同时查看处理后的数据, 用户可以更快制定决策, 这对开发过程很有帮助。

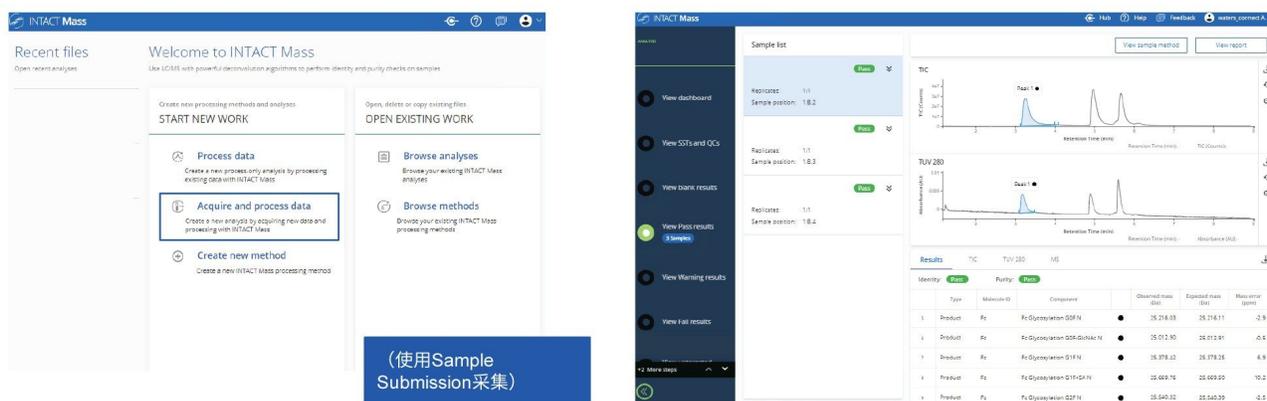


图3.使用waters_connect信息学平台中的Intact Mass应用程序整合采集和数据处理步骤。通过Sample Submission应用程序采集数据，并在每次进样采集完成后由Intact Mass应用程序自动处理数据。

本研究的主要目的是评估测定mAb生物类似药样品中Man5和无岩藻糖基化N-糖基化水平的mAb亚基LC-MS属性监测方法，确定该方法的灵敏度和精密度是否足以减少开展其他正交分析的需求。会一并还原链间二硫键的FabRICATOR酶解过程会产生三个可通过RPLC-MS监测的蛋白质链（Fc、LC和Fd¹，如图3色谱图所示），每个链的质量都在23~25 kDa之间。N-糖基化位点位于Fc亚基上。原研药（图4A，上图）、生物类似药（图4A，中图）和生物类似药-阴性对照（图4A，下图）的MaxEnt1去卷积质谱图见下文，已知后者的Man5含量比较高。原研药和生物类似药的N-糖谱相对一致，但生物类似药中未加工C端赖氨酸的含量明显不同（分别为0%和15%，见图4B）。和预期一致，我们在生物类似药-阴性对照中观察到大约10%的Man5类物质，生物类似药样品中的含量则比较低，与原研药相近（图4B）。

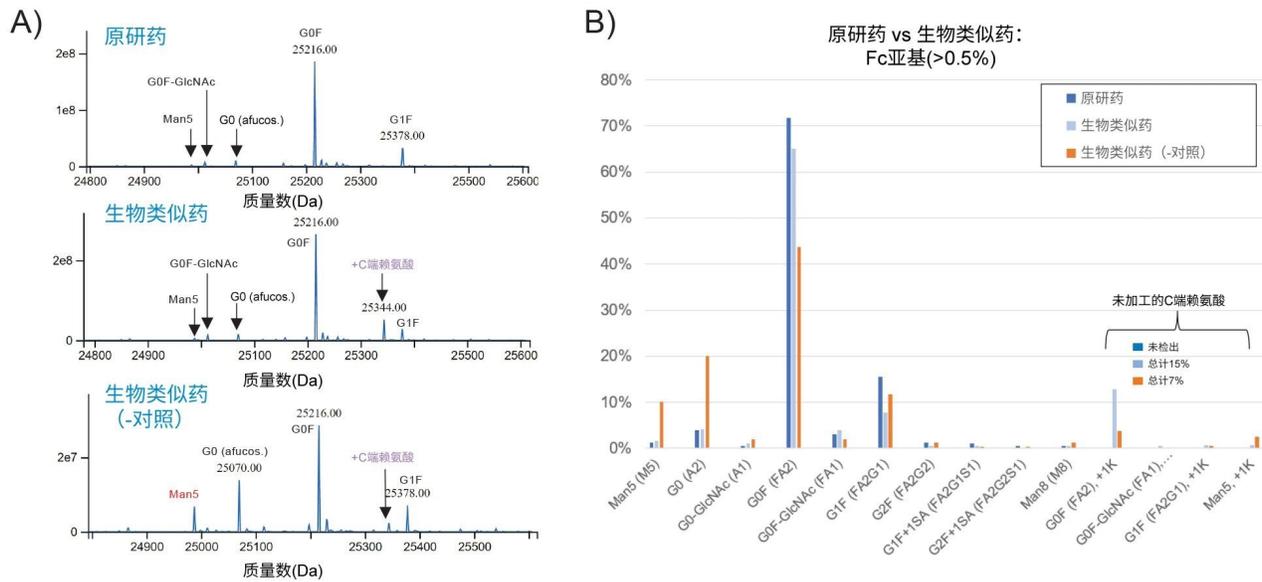


图4.A) *Intact Mass*应用程序生成的Fc亚基去卷积质谱图，比较了原研药、经ProA纯化的生物类似药样品，以及生物类似药阴性对照样品（含高浓度Man5）；B) Fc亚基（包括N-糖型和未加工C端赖氨酸）的相对定量结果。

Similis Bio监测游离寡糖水平的标准操作规程(SOP)是一种游离N-糖分析方法，该方法先用酶从mAb上释放游离寡糖，然后标上荧光标记(RapiFluor-MS)，再进行HILIC-FLR-MS分析⁸。该方法的灵敏度和稳健性很不错，但它只能针对样品中存在的N-糖提供一组指向性很强的信息。如果有一种mAb亚基LC-MS方法能够得到与游离寡糖分析方法相当的结果，还能提供有关mAb的其他质量属性信息，那么它就可以取代当前的工作流程，甚至有望取代其他分析方法。我们比较了丰度最高的五种N-糖型的LC-MS结果*（图5A）与Similis Bio内部通过游离寡糖分析方法得到的结果。各样品中每种物质的相对差异百分比($\Delta\%$)绘制在图5B中。LC-MS亚基分析方法测得的这些N-糖的相对差异百分比值都在游离寡糖分析方法所得结果的2%以内。这表明两种方法所得结果的可比性在可接受范围内。

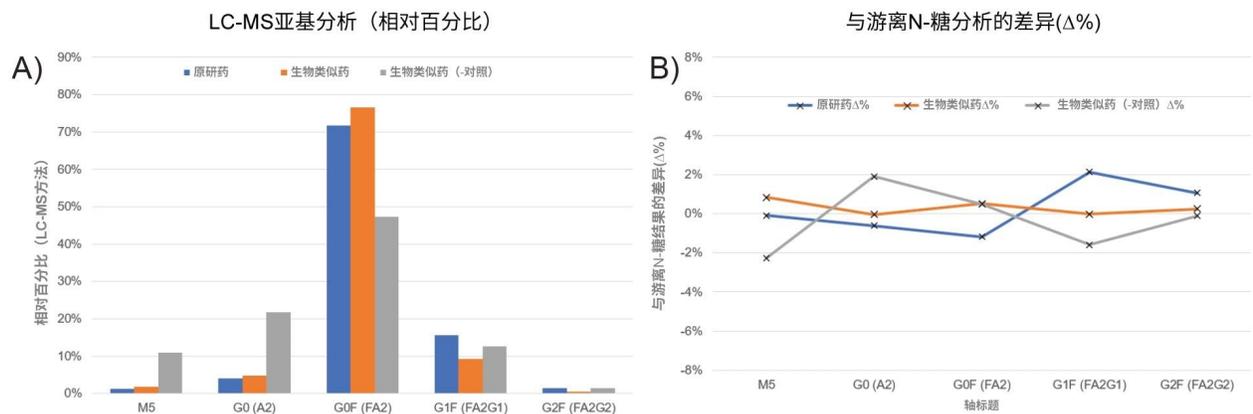


图5. Fc亚基和游离RFMS N-糖结果比较（丰度最高的5种物质）。图A：LC-MS亚基方法检测到的相对百分比（已根据游离N-糖分析方法未检测到的C端赖氨酸变体做了调整）。图B：LC-MS方法与游离N-糖方法的结果差异（ $\Delta\%$ ）。

除N-糖谱外，mAb亚基LC-MS监测方法还可提供有关其他质量属性的信息，例如未加工C端赖氨酸、Fd'和LC糖基化，以及氧化。已经有人在工艺开发的亚基分析中尝试使用类似方法，并且随后验证了该方法可应用于mAb QC^{9, 10}。

过去，这些属性一般通过肽图分析（光学或LCMS）等正交方法，或者间接通过光学LC和CE方法在肽、完整蛋白质或亚基水平进行评估。以C端赖氨酸为例，我们可以制备未处理的样品和经过羧肽酶B (CPB)处理（以去除带正电荷的残余C端赖氨酸）的相同样品，通过比较二者的电荷异构体特征来研究它。在电荷异构体特征中，未加工的C端赖氨酸物质通常以碱性异构体形式出现，这种异构体会随着CPB酶解而减少。从逻辑上讲，基于样品之间碱性异构体的差异，应能粗略估计样品中未加工C端赖氨酸的含量。这种方法对于电荷异构体特征较为简单的mAb来说通常很有用，但随着复杂性增加，分析结果会越来越不明确。本文所述的mAb亚基LC-MS方法可以简化该属性的分析。

此外，这种mAb亚基LC-MS监测方法还可提供Fd'和LC链上可能存在的修饰的概览，这些修饰中包含负责控制mAb药品的结合过程，因而可以控制mAb活性的序列部分。这些潜在的修饰包括但不限于糖基化、氧化和/或未转化的N端焦谷氨酸（非pyroQ）。（请注意，在亚基水平，LC-MS很难区分氧化修饰和非pyroQ修饰。）在本案例研究中，原研药和生物类似药样品中都检测到低水平的Fd'和LC糖基化(<2%)。原研药或生物类似药的LC中均未观察到氧化/非pyroQ修饰，但Fd'亚基中含有10%~15%的这类修饰。如果要区分带有氧化和/或非pyroQ修饰的Fd'，需要进一步开展研究。

为了测试这种mAb亚基LC-MS监测方法的稳健性，我们在两个不同的实验室酶解（手动酶解和自动FabRICATOR酶解）相同的原研药（市售药）以制备样品，然后分别在各实验室的BioAccord系统上运行样品。相对丰度>0.5%的所有Fd'、LC和Fc亚基（图6显示了Fc亚基）的结果全都一致（偏差在1.5%以内）。无论采用手动还是自动化样品前处理，这种mAb亚基LC-MS方法在多个实验室的比较实验中都表现得十分稳健、可靠。

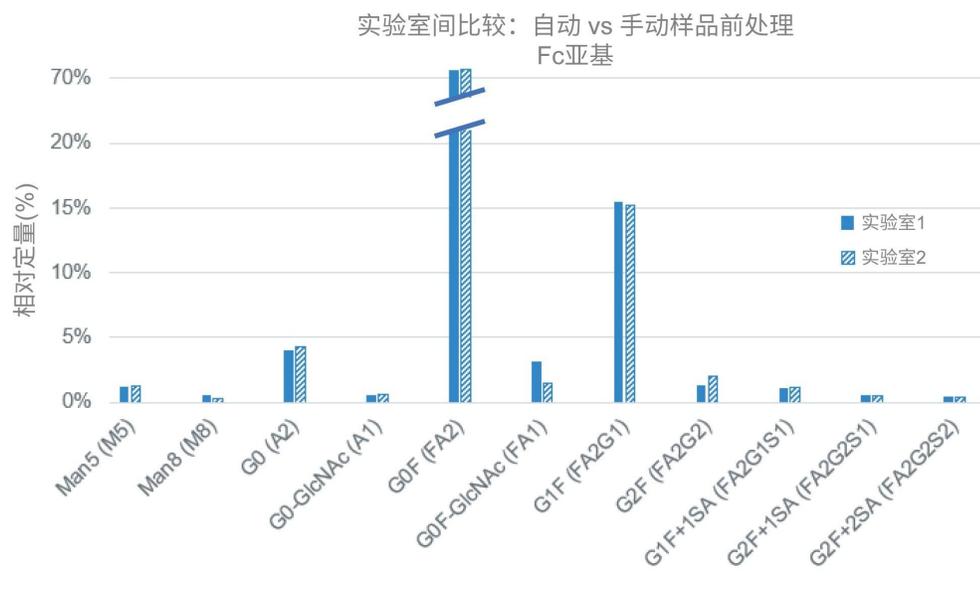


图6.不同实验室参与的比较实验得出的Fc N-糖基化结果相当（实验室1=自动样品前处理，实验室2=手动样品前处理）

*通过合并末端含和不含赖氨酸残基的值，调整了LC-MS亚基N-糖型的相对百分比，以便与游离寡糖分析方法得到结果进行比较。这是为了排除含C端赖氨酸的物质产生的响应，游离寡糖分析方法无法检测这种物质。

结论

Similis Bio与沃特世公司合作开展的研究表明，对原研药和直接从生物反应器中采集的生物类似药候选药物进行亚基LC-MS分析的工作流程可以用于监测mAb的某些产品质量属性。这套即时工作流程包括使用Andrew+机器人平台进行自动化ProA纯化和FabRICATOR酶解，然后使用BioAccord系统进行LC-MS分析。使用Intact Mass应用程序可以在合规的waters_connect信息学平台上无缝整合数据采集、监测和处理步骤。使用该mAb亚基LC-MS工

作流程分析原研药和生物类似药样品生成的结果与使用游离寡糖分析方法得到的结果一致。该工作流程还可进一步提供有关其他质量属性的信息，包括未加工C端赖氨酸、糖基化和氧化，减少了通过正交方法获取这些信息需要付出的时间和精力。

参考资料

1. Nägeli A, Ekemohn M, Nyhlén H. Automated Middle-level Analysis of Therapeutic mAbs in Complex Protein Samples. *Genovis Application Note*. AN0056.
2. Koza SM, Hanna CM, Jiang AHW, Yu YQ. 使用生产级的蛋白A亲和色谱树脂进行自动化高通量分析级单克隆抗体纯化. 沃特世应用纪要. [720007861ZH](#). 2023年2月.
3. Dong J, Migliore N, Mehrman S, Cunningham J, Lewis M, Hu P. High-Throughput, Automated Protein A Purification Platform with Multiattribute LC-MS Analysis for Advanced Cell Culture Process Monitoring. *Anal Chem*. 2016; 88: 8673-8679.
4. Sokolowska I, Mo J, Dong J, Lewis M, Hu P. Subunit mass analysis for monitoring antibody oxidation. *mAbs*. 2017; 9:3, 498-505.
5. Sokolowska I, Mo J, Pirkolachahi F, McVean C, Meijer L, Switzar L, Balog C, Lewis M, Hu P. Implementation of a High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method in Quality Control Laboratories for Release and Stability Testing of a Commercial Antibody Product. *Anal Chem*. 2020; 92, 2369-2373.
6. Shion H, Yu YQ, Chen W. 在数据可靠性环境下进行可重现的完整蛋白质质量数例行分析. 沃特世应用纪要. [720006472ZH](#). 2019年10月.
7. Ippoliti S, Yu YQ, Ranbaduge N, Chen W. 建立适用于开发、工艺监测和QC放行且稳定耐用的mAb亚基产品质量属性监测方法. 沃特世应用纪要. [720007129ZH](#). 2021年1月.
8. Deriš H, Cindrić A, Lauber M, Petrović T, Bielik A, Taron CH, Wingerden M, Lauc G, Trbojević-Akmačić I. Robustness and repeatability of GlycoWorks RapiFluor-MS IgG N-glycan profiling in a long-term high-throughput glycomic study. *Glycobio*. 2021; 31 (9) 1062-1067.
9. Sokolowska I, Mo J, Dong J, Lewis M, Hu P. Subunit mass analysis for monitoring antibody oxidation.

mAbs.2017; 9:3, 498-505.

10. Sokolowska I, Mo J, Pirkolachahi F, McVean C, Meijer L, Switzar L, Balog C, Lewis M, Hu P. Implementation of a High-Resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method in Quality Control Laboratories for Release and Stability Testing of a Commercial Antibody Product.*Anal Chem*. 2020; 92, 2369-2373.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <

<https://www.waters.com/nextgen/us/en/products/chromatography/chromatography-systems/acquity-premier-system.html>>

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

生物制药领域专用的BioAccord LC-MS系统 <https://www.waters.com/waters/en_US/BioAccord-LC-MS-System-for-Biopharmaceuticals/nav.htm?cid=135005818>

720007997ZH, 2023年8月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号