

LC-MS法直接表征Ambr® 15生物反应器内mAb工艺的糖型分布和低分子量杂质

Lindsay Morrison, Charles Prochaska, Alireza Aghayee, Clint Kukla, Ying Qing Yu

Waters Corporation, Sartorius Stedim

摘要

在上游开发过程中全面表征生物治疗性蛋白的关键质量属性(CQA)对仪器有较高需求，随之导致核心实验室周转时间长，因此通常仅限于少数高性能培养物。虽然液相色谱-质谱联用(LC-MS)法表征生物治疗性蛋白时经常使用蛋白A纯化或其他亲和富集方法，但取消此步骤可降低样品前处理的复杂性，并缩短从采样到分析的时间。本应用纪要介绍了一种精简且稳定的mAb产物监测方法，该方法直接从运行CHO工艺的Ambr® 15中收集mAb发酵样品。分析方法在一套小型台式LC-MS系统上开发，可用于快速确认mAb糖型和评估mAb纯度。开发出的这种方法具有高通量，并有可能成为CQA过程中日内监测的全自动平台。

优势

使用BioAccord™ LC-MS系统快速表征Ambr® 15细胞培养物糖型分布和低分子量杂质，无需事先进行亲和纯化

简介

细胞培养技术的进步催生出越来越复杂的生物治疗性分子，包括双特异性抗体、融合蛋白和抗体偶联药物等诸多

类别。这些混合型分子更为复杂，生产过程也非常精细，因为它们往往比单克隆抗体更容易错配和聚集。选择适当的克隆和可以减少这些特性的工艺条件，就能尽量降低因克隆或生长条件设置不合适造成下游候选药物存在隐患的风险。

由于新分子的复杂性，聚集和错配倾向等因素可能比单独使用传统滴度测量法更适合推动理想候选药物的选择。取消常用的蛋白A纯化步骤为完整分子量分析提供了一种简化的工作流程，非常适合在上游开发和克隆选择实验室中与Ambr®系统一起使用。这种方法开创性地结合了BioAccord LC-MS系统的稳健性和易用性与Ambr®多并行生物反应器系统的高通量自动化性能。

主要糖型和低分子量杂质的表征通常使用反相液相色谱-质谱联用法进行完整分子量分析。高分辨率质谱能够准确测量治疗药物的分子量、相对丰富的糖型组合以及其他翻译后修饰。通常情况下，即使这些蛋白形式的相对丰度低至1-5%，也能以极少的样品前处理来鉴定，并且结果具有良好的可信度。LMW杂质表征已经采用了多种分析技术，包括SDS-PAGE、体积排阻色谱、亲水作用色谱(HILIC)-质谱联用技术以及反相液相色谱-质谱联用技术^{1,2}。其中，RPLC-MS的分析时间更快、系统稳健性更高且信息量更大。这些特点的结合使它特别受上游实验室青睐。本研究利用在24路Ambr® 15系统上开展的单克隆抗体开发实验展示了一种用于分析糖型分布和低分子量杂质的简单直接的方法。

使用Ambr® 15和Ambr 250高通量多并行生物反应器评估克隆候选药物的生产率和培养基策略是上游工艺开发的常用方法。使用Ambr®自动液体处理器简化了滴度和培养基代谢物的日常评估，有助于生成大量样品。由于传统样品管道中存在传输限制，因此生物治疗性药物CQA的分析通常仅对采集的一部分样品进行。分析所得的CQA数据随后由分析人员传递给上游科学家，数据传递通常在培养物运行完成数周后进行。这种传统的工作流程限制了采集的样品总数，让许多CQA无法用作工艺监测指标或工艺控制驱动因素。将BioAccord LC-MS与Ambr®系统一起引入上游实验室可提高通量，并将总数据周转时间从数周缩短至不到24小时。

实验

细胞培养条件

使用分批补料工艺在Ambr® 15平台（24容器系统）中培养表达IgG单克隆抗体的CHO细胞系。所有容器均使用Sartorius 4Cell® XtraCHO细胞培养基分批处理，并在接种前保持无菌24小时。在12天的培养过程中，培养站1中十二个容器（CS1-1, CS1-12）始终保持对照温度36.8 °C；培养站2中十二个容器（CS2-1, CS2-12）的温度开始保持在36.8 °C，第3天下降到33 °C，并在剩下的时间保持此温度。容器CS1-1、CS1-5、CS1-9、CS2-1、CS2-

5和CS2-9盛装葡萄糖对照样品，即葡萄糖目标浓度在12天的培养期间始终为5 g/L。容器CS1-4、CS1-8、CS2-4和CS2-8中的补料葡萄糖目标浓度开始为12 g/L，第5天降低至5 g/L。容器CS1-2、CS1-10、CS2-2和CS2-10中的葡萄糖开始保持在较高浓度(12 g/L)，第3天降低至5 g/L。其余容器（CS1-6、CS1-11、CS2-6和CS2-11）在13天的批次中一直保持较高的葡萄糖浓度。容器CS1-03、CS1-07、CS1-12、CS2-03、CS2-07和CS2-12中添加了糖基化修饰补充剂作为阳性对照，本文剩下部分为使内容更加简单直观已将其排除。各容器的条件见表1。

所有容器每天都使用Ambr® 15液体处理器取样进行细胞计数、pH和pO₂测量(475 µL)，然后转移到Ambr®工作台上的样品管中。从第2天开始，每隔1天从每个容器中额外取275 µL，以便有多余样品供BioAccord使用和留样。在这些取样量大的采样日，取100 µL等分样品用于细胞计数，剩余样品在380 rcf下离心两分钟。使用Sartorius Minisart® 0.45 µm针头过滤器过滤上清液，如有必要，可在进样至LC-MS之前先用LC-MS级水稀释。

培养容器	起始葡萄糖浓度 (g/L)	葡萄糖浓度转变日 (12g/L → 5g/L)	温度转变日 36.8 °C → 33 °C
CS1-01	5	n/a	n/a
CS1-05	5	n/a	n/a
CS1-09	5	n/a	n/a
CS1-04	12	5	n/a
CS1-08	12	5	n/a
CS1-02	12	3	n/a
CS1-10	12	3	n/a
CS1-06	12	n/a	n/a
CS1-11	12	n/a	n/a
CS2-01	5	n/a	3
CS2-05	5	n/a	3
CS2-09	5	n/a	3
CS2-04	12	5	3
CS2-08	12	5	3
CS2-02	12	3	3
CS2-10	12	3	3
CS2-06	12	n/a	3
CS2-11	12	n/a	3

表1.细胞培养条件

本研究评估了从Ambr® 15获得的澄清样品的低分子量片段和完整糖谱，样品未通过蛋白A纯化。将澄清样品上样到装配BioResolve™ RP色谱柱（部件号：[186009016](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009016-bioresolve-rp-mabpolyphenyl-) <

<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/columns/186009016-bioresolve-rp-mabpolyphenyl->

[column-450a-27--m-1-mm-x-100-mm-1-pk.html](#)>) 的BioAccord系统中。BioResolve微珠的粒径更大, 更能耐受残留细胞碎片的污染; 优质的色谱分离度让分析人员能够运行快速梯度以获得高效的占空比。使用的所有溶剂和试剂均为LC-MS级。BioAccord系统由waters_connect信息学软件控制。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY™ Premier系统
检测条件:	TUV
样品瓶:	QuanRecovery™
色谱柱:	2.1 x 100 mm BioResolve RP 色谱柱
柱温:	60 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	1.5-3 µL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	水 + 0.1%甲酸
流动相B:	乙腈 + 0.1%甲酸

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.00	0.4	80	20	6
2.85	0.4	59	41	6
3.02	0.4	15	85	6
3.22	0.4	15	85	6
3.32	0.4	80	20	6
6.00	0.4	80	20	6

质谱条件

质谱系统：ACQUITY RDa™

电离模式：正离子

采集范围：500-7000 *m/z*

毛细管电压：1.5 kV

碰撞能量：不适用

锥孔电压：95 V

结果与讨论

研究发现，上游工艺数据（包括活细胞密度(VCD)、活力和代谢物）在对照条件下与预期一致，符合该细胞系和培养基组合的历史趋势。在反馈条件下，葡萄糖目标浓度开始保持在较高的12 g/L水平，之后降低到标准值5 g/L。恢复到5 g/L水平比目标浓度变化滞后大约两天，可能是因为细胞生长减缓且日常补料中含有标准葡萄糖，导致消耗量减少。CS1在对照条件下的VCD峰值最高，其次是葡萄糖反馈条件和高葡萄糖浓度条件。这种条件性趋势在CS2中遵循相同的模式，不过与CS1对应的容器相比，所有CS2容器中的细胞生长都有所减缓。这一结果符合预期，因为CS2在第3天降低了温度。

通过连续500次进样评估了BioAccord系统直接分析澄清的Ambr® 15生物工艺样品的适用性和性能。在澄清的上清液中观察到三个色谱峰，分别对应于目标抗体、游离的修饰轻链以及轻链共价二聚体（图1a）。有轻链特征的色谱峰包含至少十种蛋白形式（图1b），主要物质的分子量为23,526.89和23,712.94 Da，分别对应于用额外的半胱氨酸残基和谷胱甘肽修饰的轻链。轻链二聚体的去卷积谱图中未发现修饰（图1c），原因可能在于C-端半胱氨酸的共价键。完整单克隆抗体的去卷积谱图与复杂N-糖具有一致的糖型分布（图1d）。

通过监测完整抗体的紫外线(UV)峰面积以及根据UV测量的抗体相对丰度评估了重复进样的色谱性能（图2a和2b），预计色谱柱结垢和非特异性吸附将导致测量结果随着时间推移逐渐劣化。使用糖型质量精度和G0F/G0F糖型的相对丰度评估了质谱仪的稳健性。质谱仪前端的物料堆积和离子斑使脱溶剂和离子聚焦作用减少，进而导致抗体的谱学性能变差。这种现象通常表现为完整糖型的分辨率损失，同时质量精度也有所降低。MaxEnt1去卷积处理峰强度的准确度会受到影响，还会影响后续定心步骤的输出结果。因此，我们还在500次进样中跟踪监测了糖型的相对丰度（图2c和2d）。

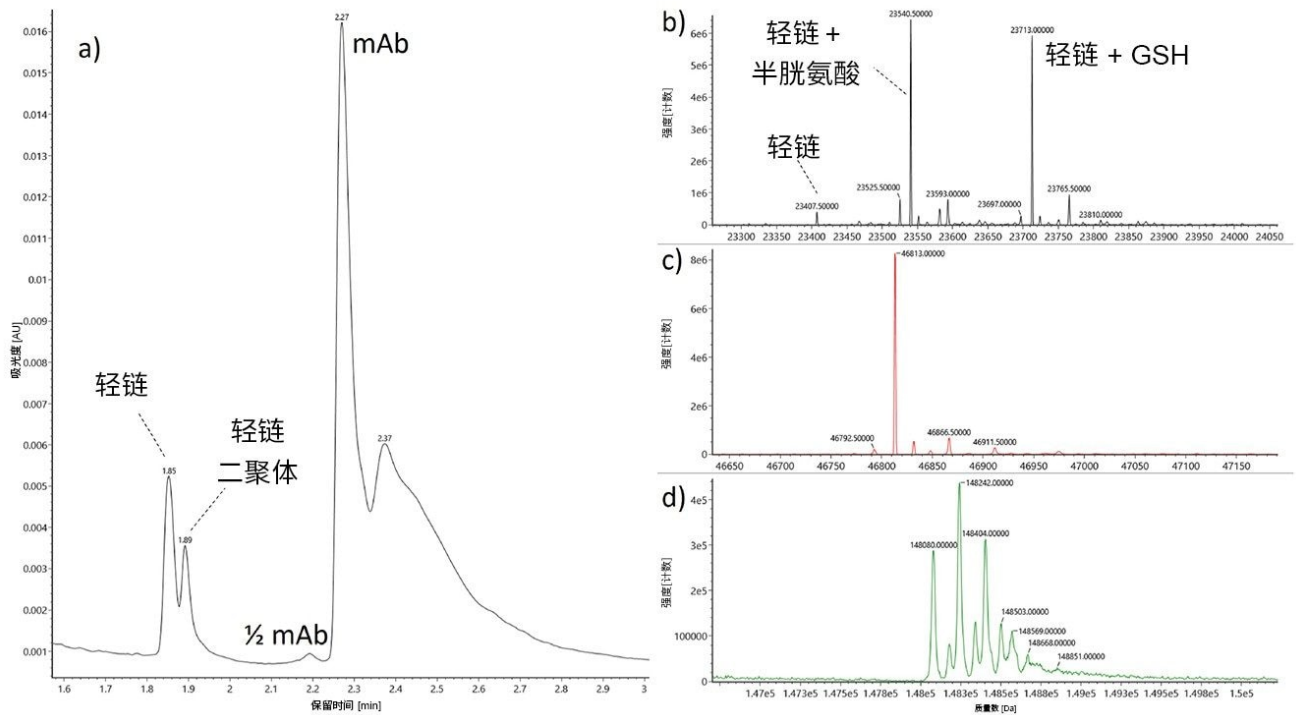


图1.细胞培养物经过离心和过滤后通过LC-MS分析观察到的主要物质的UV色谱图(a)和去卷积质谱图。从图中可以看出，轻链包含几种修饰形式(b)，其中C-端半胱氨酸的半胱胺酰化和谷胱甘肽化尤为显著。还展示了轻链二聚体(c)和完整单克隆抗体(d)的去卷积质谱图。

总体而言，四个指标在整个稳健性评估期间均表现出优异的重现性，没有明显的信号衰减或失真迹象。原始UV峰面积（图2a）和完整分子量测量值百分比的RSD分别为2.9%和0.19%。值得注意的是，通过相对比较目标单克隆抗体及其片段的UV峰面积得到的所有完整分子量测量值百分比均在88%~89%之间（图2b）。测得的保留时间也非常稳定，所有进样的保留时间均为2.3分钟。四种主要糖型的质量精度（图1c）也相当优异，介于-15~15 ppm之间。G0F/G0F、G1F/G0F和G1F/G1F糖型的相对丰度RSD分别为6.7%、5.1%和6.5%。

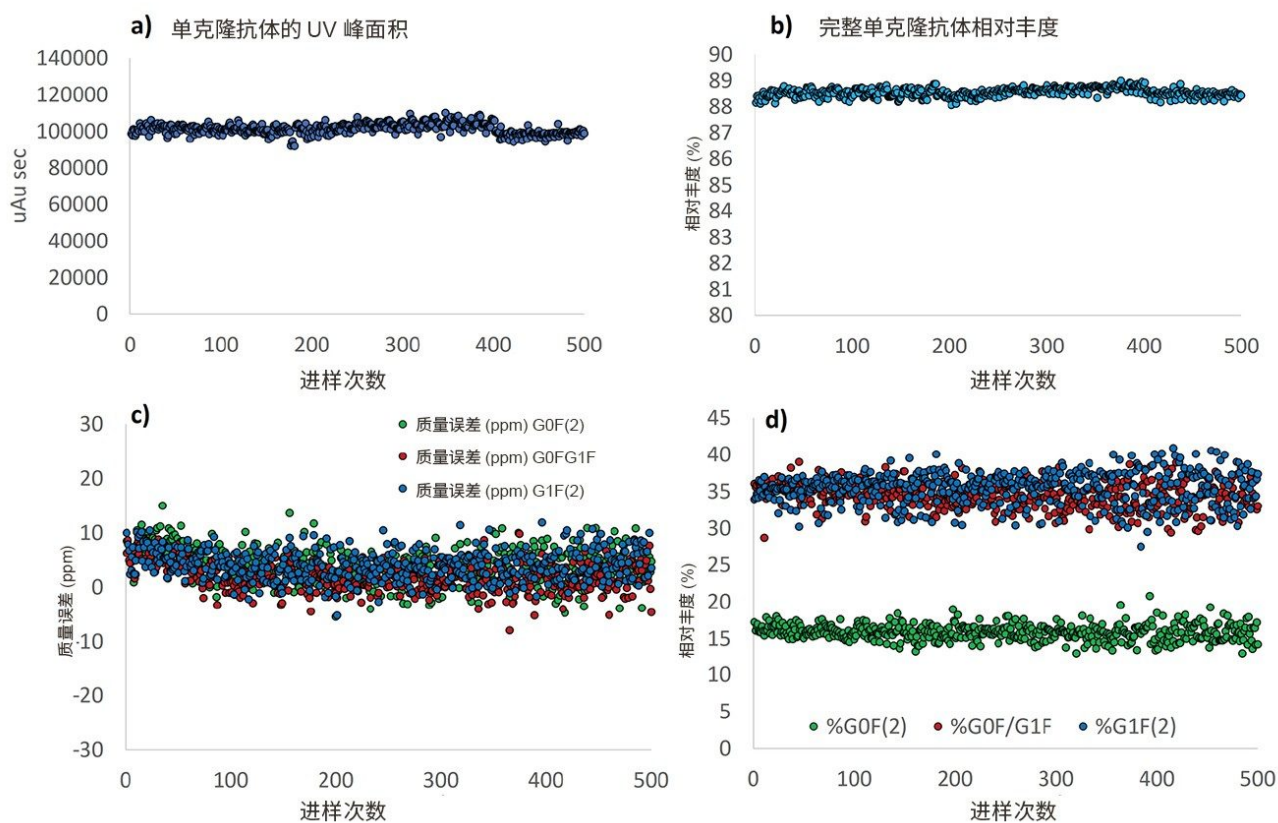


图2. BioAccord LC-MS在以下方面的性能：(a)完整单克隆抗体的UV峰面积；(b)通过比较完整单克隆抗体及其低分子量(LMW)片段的UV峰面积得到的完整单克隆抗体相对丰度；(c)完整单克隆抗体糖型的质量精度；以及(d)根据各糖型的去卷积MS信号强度计算出的糖型相对丰度。

使用Ambr® 15在一系列温度和葡萄糖条件（表1）下进行工艺优化实验。于第2、4、6、8、10和11天测量完整糖型分布以及半胱胺酰化和谷胱甘肽化轻链的相对丰度。为每种生长条件的实验绘制G0F/G0F糖型相对丰度与培养时间的函数关系图（图3a）。在所有条件下，该糖型的相对丰度都随着分批补料实验的进行而不断变化，相对丰度持续下降，并在第6天达到最小值。与对照组相比，较高葡萄糖浓度和较低温度导致相对丰度升高，可能是因为在这种条件下少量半乳糖基化物质的生成增加或半乳糖清除引起的。这种现象在第6天就能轻松看出来。有趣的是，较低温度和较高葡萄糖浓度导致这种效应更加显著，第11天的糖谱差异达到25%。葡萄糖补料和温度对糖型分布的影响表明，通过调节葡萄糖浓度、温度和时间可以让糖型丰度的变化在可测量范围内。在培养实验早期使用此类数据有助于战略性改变工艺和补料参数，获得理想的糖型分布。

低分子量(LMW)杂质可引起患者的免疫反应，并且会降低产物总收率。研究发现，一般情况下，单克隆抗体的纯度

在整个培养过程中逐渐降低，这一现象与LMW物质（如未合并的轻链）增加相对应（图3b）。较低温度下的纯度低于对照温度下的纯度。有趣的是，高浓度葡萄糖条件下产生的纯度略高，这种转变早在第2天和第4天就已十分明显。这些结果表明，战略性调节葡萄糖补料可能会有效提高所研究工艺的产物相对纯度。

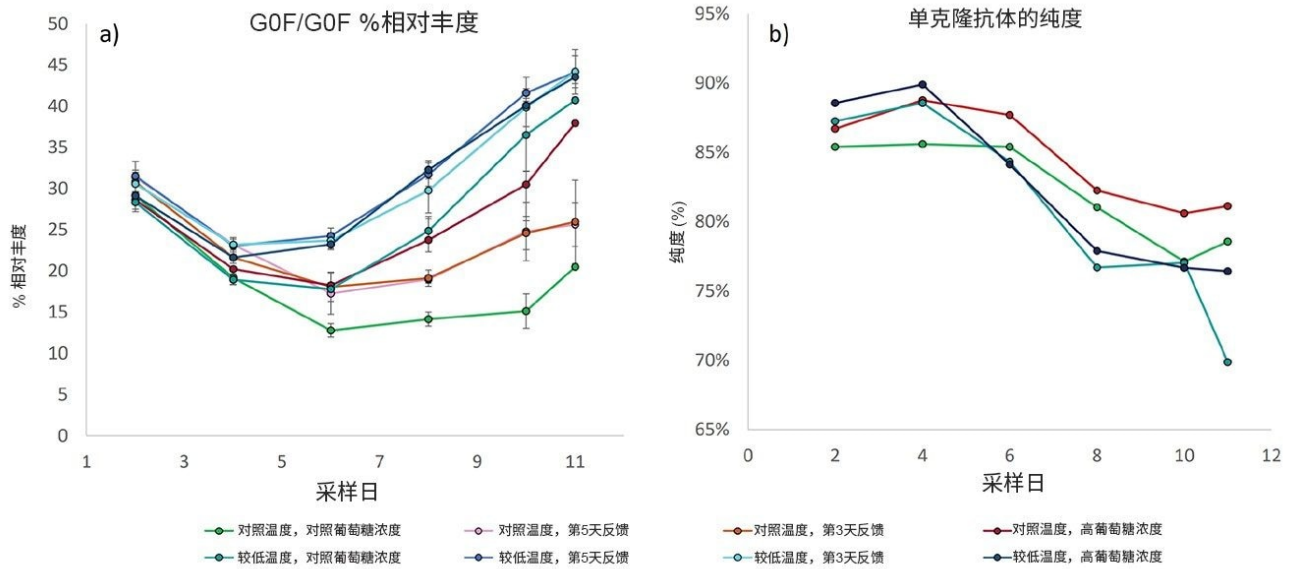


图3.(a)八种分批补料条件培养过程中的G0F/G0F糖型相对丰度。(b)对照温度、较低温度、对照葡萄糖浓度和高葡萄糖浓度反应器条件下的低分子量物质(LMW)纯度。

使用来自RDa飞行时间(TOF)质量分析器的MS信号监测游离轻链的半胱胺酰化和谷胱甘肽化形式的相对丰度。半胱胺酰化是指游离半胱氨酸与蛋白质上未配对的半胱氨酸形成二硫键，通常位于单克隆抗体轻链的C-端。这种翻译后修饰可能与培养物中可用半胱氨酸的量有关。谷胱甘肽化是指蛋白质在氧化或亚硝化应激条件下发生的一种调节细胞损伤的机制。因此，谷胱甘肽化轻链的相对丰度可用作评估细胞培养物氧化应激的一个指标。从糖型分布中可以看出，修饰轻链的相对丰度随时间推移而变化，半胱胺酰化形式在第6天达到最小值（图4b），与之对应的是谷胱甘肽化形式达到最大值（图4a）。有趣的是，在较低温度下培养的四培养站中半胱胺酰化轻链的丰度最高，而在对照温度条件下，培养物并没有表现出向更高丰度谷胱甘肽化轻链转变的强烈趋势。这种差异早在第4天就已经非常明显。因此，谷胱甘肽化轻链的丰度降低似乎与温度下降和细胞生长减缓有关。要确定具体的因果关系，还需要进一步调查，但不可否认的是，验证这些关系的能力是一种强大的工具。

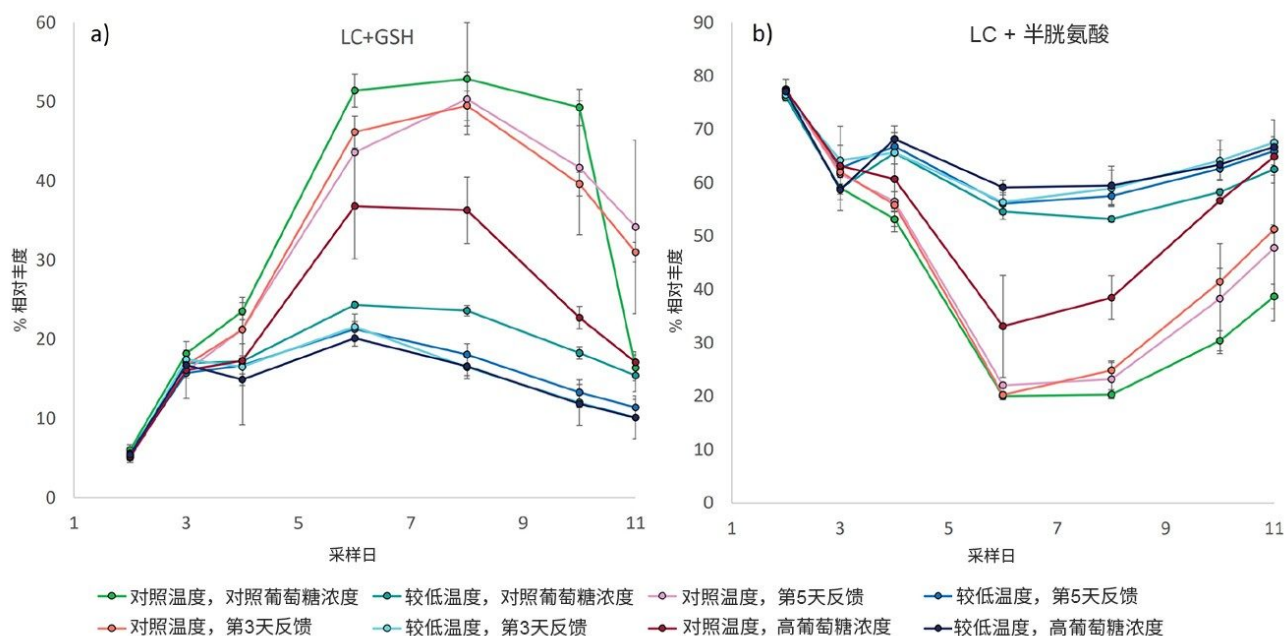


图4.8个培养站中(a)谷胱甘肽化和(b)半胱氨酸酰化轻链随时间推移的相对丰度

结论

本研究介绍了使用BioAccord LC-MS系统直接分析低分子量杂质和单克隆抗体糖型分布的方法，样品为使用 Ambr® 15系统培养的澄清但未纯化的细胞培养物。BioResolve色谱柱上的500多次进样表现出优异的稳健性和重现性，因此可每隔一天从48个并行生物反应器中取样并分析产品质量属性。考察培养过程中的糖型相对丰度后发现，在较低温度和较高葡萄糖浓度条件下，半乳糖发生显著清除或掺入损失。有趣的是，较高葡萄糖浓度条件下产生的纯度高于对照条件。总之，这些数据集表明，在整个培养过程中监测产品质量属性可以揭示理想工艺参数和补料策略，有助于提高产物纯度并定制糖型分布。

参考资料

1. Wang S, Liu AP, Yan Y, Daly TJ, Li N. Characterization of Product-Related Low Molecular Weight Impurities in Therapeutic Monoclonal Antibodies Using Hydrophilic Interaction Chromatography Coupled With Mass Spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2018, May 30;154:468–475.doi: 10.1016/j.jpba.2018.03.034.
2. Li W, Yang B, Zhou D, Xu J, Li W, Suen WC. Identification and Characterization of Monoclonal Antibody Fragments Cleaved at the Complementarity Determining Region Using Orthogonal Analytical Methods. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017, Mar 24;1048:121-129.doi: 10.1016/j.jchromb.2017.02.019. Epub 2017 Feb 21. PMID: 28242491.

特色产品

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>>

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

720007580ZH, 2022年4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