

## 对微型生物反应器样品中的单克隆抗体进行自动化高通量LC-MS聚焦肽图分析

---

Hua Yang, Stephan M. Koza, Ying Qing Yu

Waters Corporation

---

### 摘要

为促进细胞系选择和生物工艺优化，本研究开发出一种自动化高通量(HT)样品前处理方法和快速LC-MS肽图分析方法，来测定小体积低浓度微型生物反应器样品中的关键质量属性(CQA)肽。该方法使用Andrew+™自动化平台对溶于中和的蛋白A亲和色谱洗脱缓冲液的30 µL 1 mg/mL单克隆抗体(mAb)样品进行缓冲液置换和胰蛋白酶酶解。使用ACQUITY™ Premier CSH™ C<sub>18</sub>肽分析专用柱分离所得的肽，并用BioAccord™ LC-MS系统进行检测。结果证明，选定的CQA肽（包括N-糖基化肽、脱酰胺肽和氧化肽）得到了有效分析。自动化制备48个样品耗时3.5小时，其中酶解时间为2小时，每个样品的LC-MS分析时间为10 min。除蛋白A纯化的mAb外，该方法还适用于分析其他含少量蛋白质的样品。

### 优势

- 即使在低浓度下，对30 µg mAb中的CQA肽进行相对定量也能获得一致的结果
- Andrew+机器人平台的自动化胰蛋白酶酶解方案，使用抗自切性强的新型市售胰蛋白酶（RapiZyme™胰蛋白酶）
- 使用ESI-ToF BioAccord LC-MS对CQA肽进行高通量(HT) LC-MS分析，并使用waters\_connect™ Peptide MAM应用程序软件自动分析数据

---

## 简介

多年来，单克隆抗体(mAb)等重组蛋白生物药物帮助了大量患者摆脱疾病困扰。重组蛋白的开发和生产可能产生高昂成本，而在开发高效的高质量产品生产工艺方面，宿主细胞系选择和生物工艺优化是一个潜在瓶颈。为了缩短细胞系选择和工艺优化所需的时间，我们在早期工艺开发阶段使用了微型生物反应器<sup>1</sup>。近年来，产品质量已被纳入细胞系选择标准，部分原因是生产生物类似药的监管要求。虽然微型生物反应器具有能够接近大规模生物反应器生产条件的优势，但从微型生物反应器中采集的样品量可能会受到分析方面的限制。另一方面，分析样品的CQA（例如位点特异性修饰）通常需要通过LC-UV或LC-MS进行肽图分析，该过程可能费时费力且通量低。

本应用纪要介绍了一种自动程序，即使用Andrew+机器人(Andrew Alliance™)，在极少手动干预的情况下完成CQA肽图分析，来协助细胞系选择和细胞培养优化（图1）。本文介绍了一种聚焦或靶向肽图分析方法，用于监测选定CQA肽及其修饰形式的丰度。将30 μg 1 mg/mL mAb（英夫利昔单抗）样品还原并进行胰蛋白酶酶解，然后通过长达10分钟的反相分离结合MS检测来监测产生的CQA肽，以此来演示该方法。由于样品前处理过程中包含浓缩步骤，因此该方法也适用于分析mAb和其他浓度低于1 mg/mL的蛋白质样品。



Andrew+™ 移液机器人



BioAccord™ LC-MS系统

---

图1. Andrew+ 移液机器人和 BioAccord LC-MS 系统图

---

## 实验

### 样品描述

---

蛋白A洗脱缓冲液用100 mM甘氨酸(pH 3)和1 M Tris (pH 7.5)以5:1的体积比中和，用来稀释英夫利昔单抗(10 mg/mL)。获得的英夫利昔单抗终浓度为1.0 mg/mL。

在样品降解实验中，将英夫利昔单抗(10 mg/mL)置于0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和50 mM磷酸钠溶液(pH 7.6)中，在37 °C下温育2周，诱导氧化和脱酰胺作用。此外，还将降解样品与原始的未降解样品以1:1的体积比混合。然后使用上述中和的蛋白A洗脱缓冲液将所有样品稀释至1.0 mg/mL。

## 液相色谱条件

液相色谱系统: ACQUITY UPLC™ I-Class PLUS

检测: ACQUITY BioAccord MS系统

样品板: Acroprep™ Advance 350 µL  
Omega 10 k MWCO (p/n:  
PALL-8034)  
96孔Eppendorf twin.tec® PCR  
板，带裙边，150 µL  
(p/n:951020443)  
6 mm预开口硅胶/PTFE盖垫  
(分析销售和服务，p/n:  
96727)

色谱柱: ACQUITY™ Premier Peptide  
CSH™ C<sub>18</sub>色谱柱, 1.7 µm, 2.1  
× 100 mm (p/n: 186009488)

柱温: 60 °C

样品温度: 10 °C

进样体积: 5 µL, 10 µL

流速: 0.2 mL/min, 0.4 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 (50分钟梯度, 80分钟运行时间)

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.2	99	1	初始
1.0	0.2	99	1	6
51.0	0.2	65	35	6
57.0	0.2	15	85	6
61.0	0.2	15	85	6
66.0	0.2	99	1	6
90.0	0	99	1	11

## 梯度表（6分钟梯度，10分钟运行时间）

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	99	1	初始
1.0	0.4	99	1	6
7.0	0.4	70	30	6
7.8	0.4	15	85	6
8.3	0.4	15	85	6
8.8	0.4	99	1	6
14.0	0	99	1	11

## ACQUITY RDa检测器设置

模式： 包括碎片的全扫描

质量范围： 50~2000 *m/z*

极性： 正

采样速率： 5 Hz

锥孔电压： 30 V

碎裂锥孔电压： 60 V – 120 V

毛细管电压： 1.20 kV

脱溶剂气温度： 350 °C

## 数据管理

LC-MS软件： waters\_connect

---

## 结果与讨论

### 通用程序

本研究针对小体积低浓度微型生物反应器mAb样品开发出一种使用LC-MS分析来监测CQA肽的自动化高通量(HT)肽图分析方法。多年来，制药行业一直将肽图分析用于多属性监测(MAM)<sup>2</sup>。这些酶解程序通常使用100 µg或更多的蛋白质，因为产品表征研究通常需要大量浓缩样品。然而，在目前的应用中，从微型生物反应器获得的样品通常浓度和体积都较小。为使聚焦肽图分析的样品前处理更加高效，我们优化了盐酸胍浓度、蛋白质:酶比例、酶解时间等参数（数据未显示）。需要注意的是，本文所述方法的开发目的并不在于全面分析mAb的肽图，因此，在这些酶解条件下观察到明显的酶解不足情况。此外，该程序仅对样品进行二硫键还原，而不进行烷基化。

图2A展示了自动化聚焦肽图分析程序的主要步骤。用中和的蛋白A洗脱缓冲液将30 µg英夫利昔单抗稀释至1.0 mg/mL（详见实验部分）。假设mAb已经使用蛋白A亲和色谱树脂进行了亲和纯化。

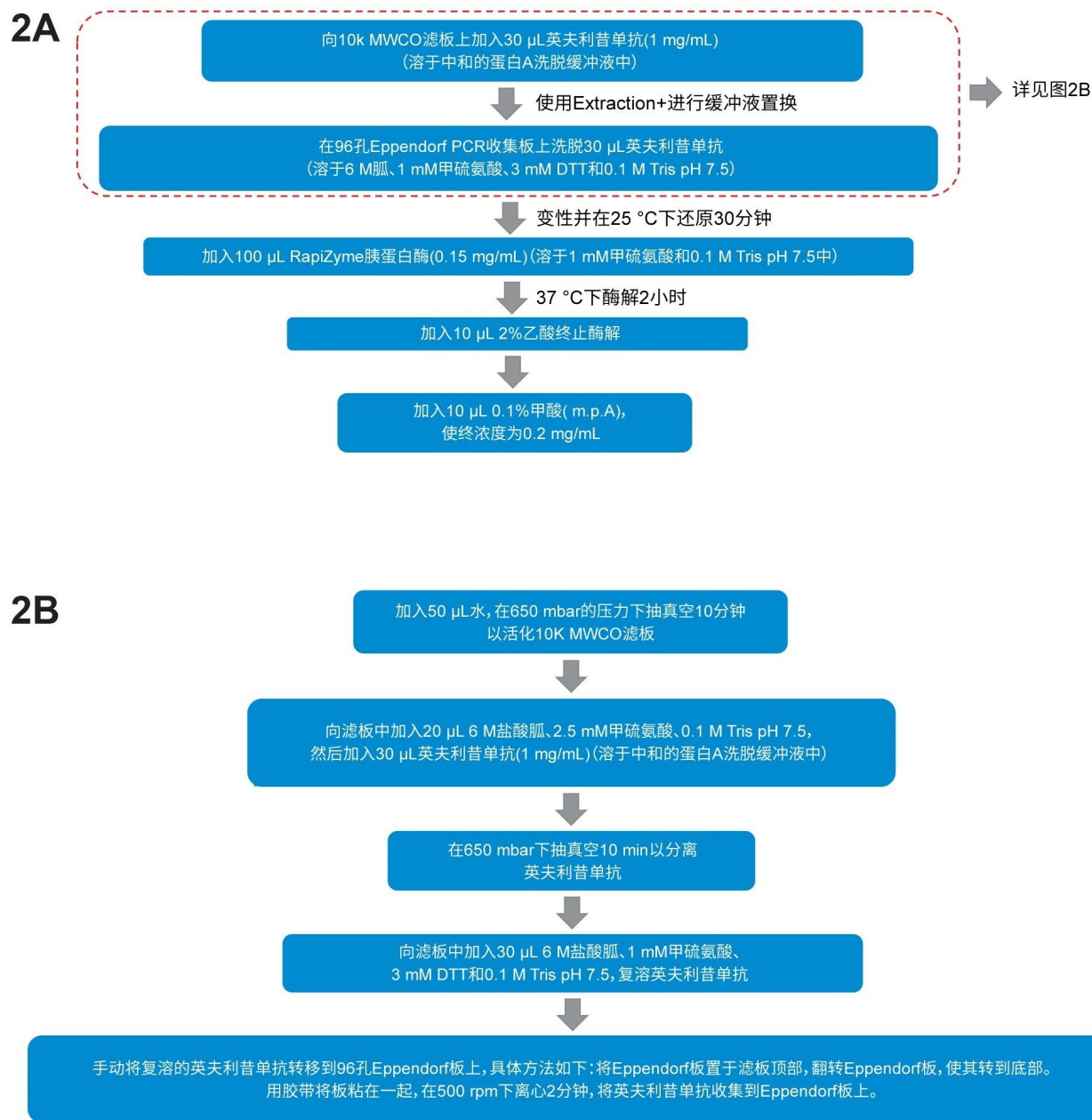


图2.A. 使用Andrew+自动化平台的通用酶解程序；

B. 缓冲液置换的详细步骤。

该方法的第一步是将样品加入变性和还原缓冲液（DRB、6 M盐酸胍、1 mM甲硫氨酸、3 mM DTT和0.1 M Tris pH 7.5）中进行缓冲液置换，如图2B所示。此步骤在Andrew+自动化系统上使用Extraction+ Domino完成，并

使用10 K MWCO滤板保留样品。上样前，向滤板孔中加入50  $\mu$ L水，并在650 mbar下施加10分钟真空，使滤板中的水排出。我们发现，此活化步骤可以加快后续步骤中的缓冲液排放<sup>3</sup>。随后加入20  $\mu$ L 6 M盐酸胍、2.5 mM甲硫氨酸、0.1 M Tris pH 7.5溶液和30  $\mu$ L mAb (1.0 mg/mL)，在650 mbar下施加12分钟真空，以排出缓冲液，同时保留mAb。然后向孔中加入DRB (30  $\mu$ L)。要将样品从滤板转移至96孔Eppendorf PCR板，需要将滤板翻转到PCR收集板上方，并以500 RPM的转速离心2分钟。需要注意的是，这种翻转和离心操作需要用户完成，并且会以镜像方式改变样品的孔位置。

完成变性并在25  $^{\circ}$ C下还原30分钟后，加入100  $\mu$ L 0.15 mg/mL RapiZyme胰蛋白酶（一种改性胰蛋白酶，溶于1.0 mM甲硫氨酸和0.1 M Tris pH 7.5中），以降低盐酸胍的浓度，同时酶解mAb。将反应混合物在37  $^{\circ}$ C下温育2小时，然后加入10  $\mu$ L 2%乙酸终止酶解。最后，加入0.10%甲酸（流动相A）稀释反应混合物，使酶解蛋白质的终浓度约为0.20 mg/mL。

此程序有几点值得注意。首先，如果样品浓度较低，缓冲液置换步骤可能会导致样品预浓缩。在当前的演示实验中，上样量为30  $\mu$ L，回收了30  $\mu$ L。但是，如果样品浓度较低，可以增加上样体积，回收时通过减少体积浓缩样品。其次，进行烷基化和不进行烷基化的结果相当。因此，该程序不包括烷基化步骤。第三，该程序中使用的胰蛋白酶自切程度非常低，这一优势有利于高浓度使用，从而加快酶解速率。图3A和3B分别显示了在ACQUITY Premier CSH C<sub>18</sub>, 2.1 x 100 mm肽分析专用柱上以50分钟梯度运行的空白酶解物和英夫利昔单抗酶解物。注：本实验选择了ACQUITY Premier CSH C<sub>18</sub>肽分析专用柱，每批合成的CSH C<sub>18</sub>颗粒均使用蛋白质的胰蛋白酶解物进行了QC测试，不符合性能规格的批次将视为不合格，通过这种方式来确保柱间性能的一致性。即使RapiZyme胰蛋白酶含量较高且蛋白质与酶的比例为2:1，空白酶解物中也未显示出过多的胰蛋白酶干扰峰。



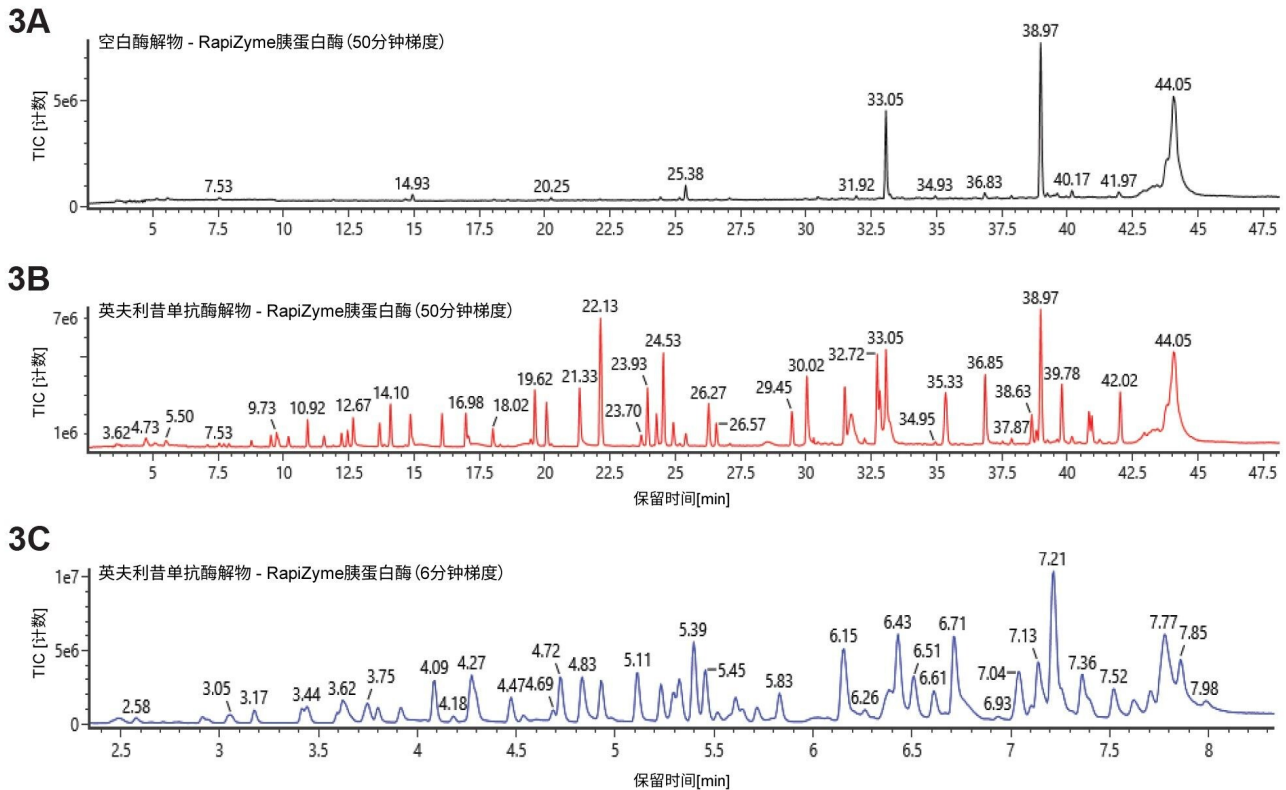


图3.使用RapiZyme胰蛋白酶得到的英夫利昔单抗CQA肽图分析结果的LC-MS色谱图。

- A. 空白酶解物；
- B. 英夫利昔单抗酶解物；
- C. 英夫利昔单抗酶解物。

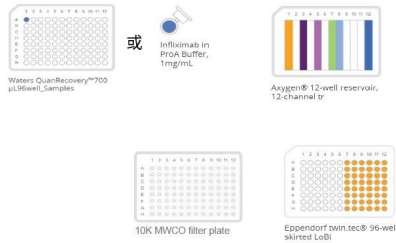
图A和图B的梯度为：流动相B在50分钟内从1%增加到35%，流速0.2 mL/min。图C的梯度为：流动相B在6分钟内从1%增加到30%，流速0.4 mL/min。

在高通量分析中，酶解物的洗脱梯度运行时间仅6分钟。正如预期所料，6分钟梯度（图3C）的色谱分离度低于50分钟梯度（图3B）。由于该方法的目标仅在于完成CQA肽的相对定量（使用观察到的电荷态的组合离子计数计算），而不是完全表征蛋白质，因此6分钟梯度已经足够满足要求。

图4显示了本实验的Andrew+布局。使用Andrew+自动化平台，酶解48个样品只需不到3.5小时，并且省去了七个手动移液步骤。



- 1: 吸头盒 (10~300  $\mu$ L吸头)
- 2: 吸头盒 (10~300  $\mu$ L吸头)
- 3: 微孔板
- 4: 深孔微孔板
- 5: Extraction+
- 6: 微量离心管
- 7: 96-PCR板Peltier+



48个样品



图4.Andrew+布局、Domino和48个样品酶解的实验时间

## 重现性

自动化样品前处理和LC-MS分析为一系列CQA肽提供了可接受的重现性。本研究使用48样品方案来酶解英夫利昔单抗样品 (30  $\mu$ L, 1.0 mg/mL)。从样品板上选择10个不同位置的样品进行LC-MS分析 (图5)。使用 waters\_connect信息学平台和Peptide MAM应用程序软件执行自动化数据分析。表1和图6显示了所评估的CQA肽的相对丰度, 以及这些测量值的相对标准偏差。结果发现, 进样体积为10  $\mu$ L (2  $\mu$ g mAb)时, 与进样体积为5  $\mu$ L (1  $\mu$ g)相比, 得到的结果更一致。在本例中, 进样量超过2  $\mu$ g并没有进一步改善重现性结果。对于所有20种CQA肽, 修饰百分比的%RSD均小于20% (n=10), 在%RSD介于10%~20%之间的8种CQA肽中, 有7种的修饰水平为1.66%或更低。氧化肽的RSD%略高, 原因正在调查中。总体而言, 这些数据表明, 在蛋白质位点特异性修饰的相对丰度测量方面, 该HT LC-MS方法可以使用少量(30  $\mu$ g)样品提供一致的结果。

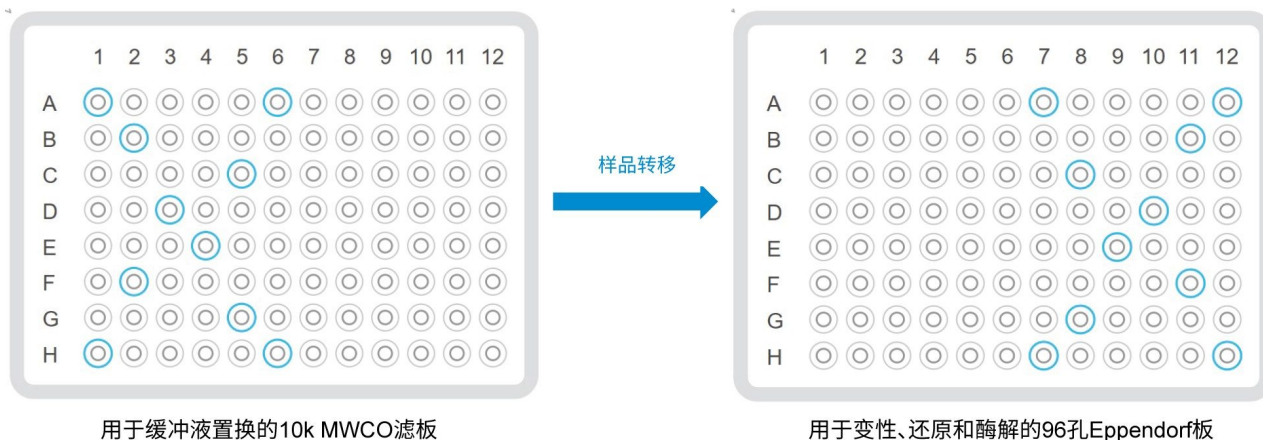


图5.重现性研究中10个代表性孔的位置。请注意，孔的位置在缓冲液置换前后是镜像的。

肽编号	肽名称和修饰	平均修饰百分比	标准偏差	%RSD
#1	HC:T2_LEESGGGLVQPGGSMK氧化M	0.66	0.13	19.47%
#2	HC:T3_LSCVASGFIFSNHWMNWVR脱酰胺N	1.47	0.08	5.30%
#3	HC:T3_LSCVASGFIFSNHWMNWVR氧化M	0.69	0.06	8.87%
#4	HC:T3_LSCVASGFIFSNHWMNWVR氧化W, 氧化M	0.50	0.07	14.94%
#5	HC:T7_SINSATHYAESVK脱酰胺N	0.94	0.05	5.69%
#6	HC:T11_SAVYLQMTDLR氧化M	0.50	0.08	16.88%
#7	HC:T22_DTLMISR氧化M	1.66	0.27	16.04%
#8	HC:T24_FNWWYVDGVEVHNAK氧化W	0.20	0.04	17.27%
#9	HC:T26_EEQYNSTYR G0F N	56.76	0.67	1.19%
#10	HC:T26_EEQYNSTYR G0F-GlcNAc N	3.91	0.43	10.90%
#11	HC:T26_EEQYNSTYR G1F N	31.28	0.62	1.98%
#12	HC:T26_EEQYNSTYR G2F N	3.48	0.28	8.08%
#13	HC:T26_EEQYNSTYR Man5	4.57	0.28	6.18%
#14	NC:HC:T27_VVSVLTVLHQDWLNGK脱酰胺N	0.55	0.03	5.33%
#15	HC:T37_NQVSLTCLVK脱酰胺N	0.22	0.01	5.06%
#16	HC:T38_GFYPSDIAVEWESNGQPENNYK脱酰胺N	3.87	0.14	3.58%
#17	HC:T42_WQQGNVFSCVMHEALHNHTYQK脱酰胺N	2.39	0.15	6.39%
#18	HC:T42_WQQGNVFSCVMHEALHNHTYQK氧化M	1.19	0.24	19.82%
#19	HC:T43_SLSLSPG +赖氨酸C-端	53.37	0.18	0.34%
#20	LC:T6_YASESMGIPSR氧化M	0.59	0.07	11.91%

表1. 英夫利昔单抗CQA肽相对丰度的平均值、标准偏差和%RSD (n=10)。

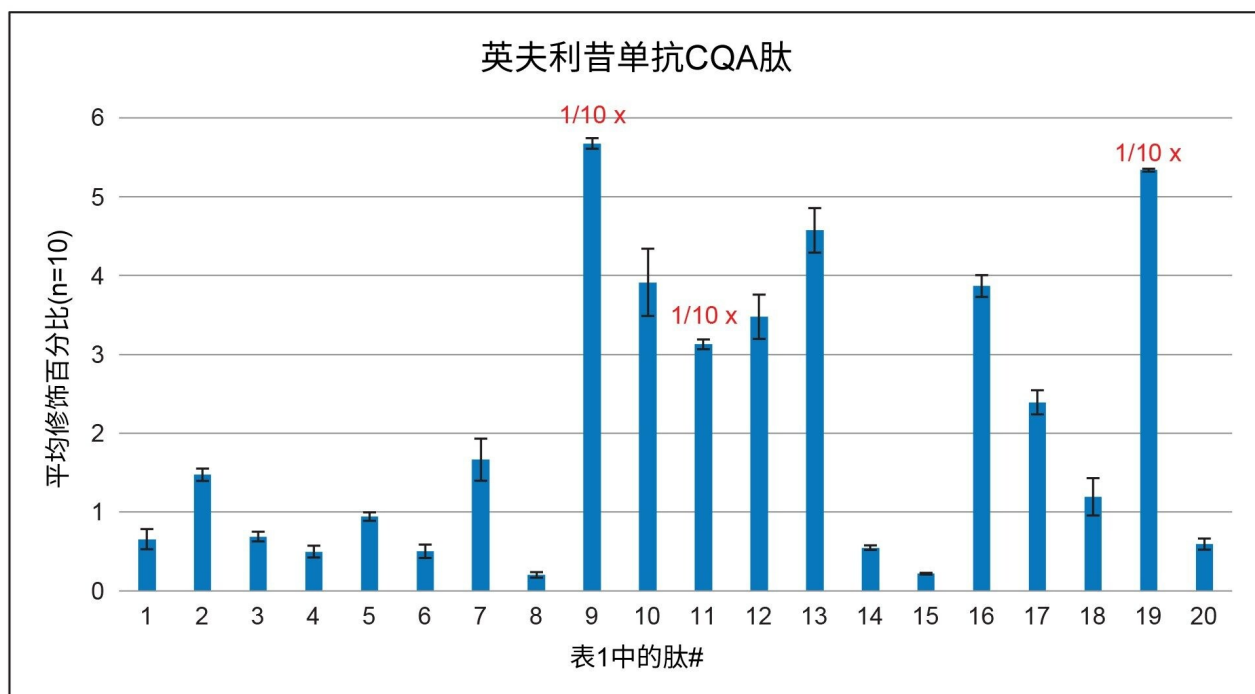
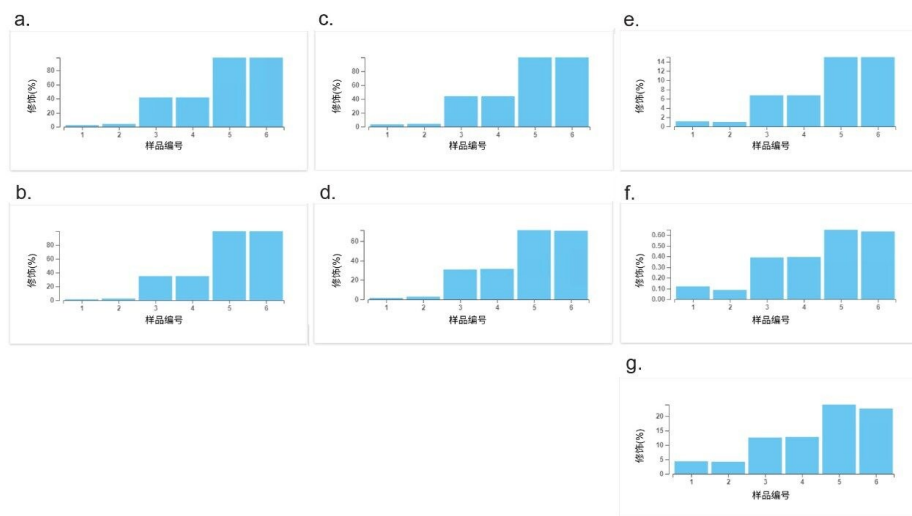


图6.英夫利昔单抗CQA肽相对丰度的平均值和标准偏差( $n=10$ )。对于肽#9、#11和#19，绘制十分之一的信号。

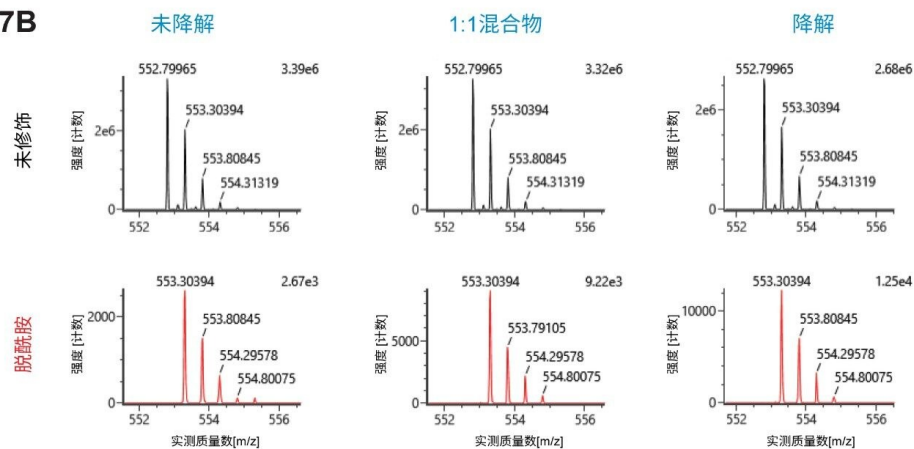
## 降解样品分析

在细胞系选择和工艺优化中，使用能够检测CQA肽修饰百分比变化的方法非常重要。为证明该方法符合预期目标，我们对样品进行了降解，以增加对氧化和脱酰胺作用的研究（详见实验部分）。还将降解样品与未降解样品混合（体积比1:1）。图7A显示了几种英夫利昔单抗CQA肽的修饰百分比。所评估的四种氧化CQA肽和三种脱酰胺CQA肽的LC-MS数据与具有中等水平降解肽的1:1混合样品一致。观察到脱酰胺HC:T37肽NQVSLTCLVK（图7A中的f）的丰度从0.1%增加到0.6%，这一结果很好地说明了该分析检测CQA变化的灵敏度。未修饰（上图）和脱酰胺（下图）肽的质谱图如图7B所示。根据保留时间，这种脱酰胺形式很可能是由天冬酰胺转化而来的天冬氨酸。图7C显示了N-糖修饰肽和C端重链(HC)肽的结果。HC C端肽的C端可以带或不带赖氨酸残基。正如预期所料，这些稳定的肽修饰获得了一致的修饰百分比。总体而言，结果表明，这种自动化HT CQA肽图分析方法能够检测不同生物工艺样品之间的位点特异性变化。

## 7A



## 7B



## 7C

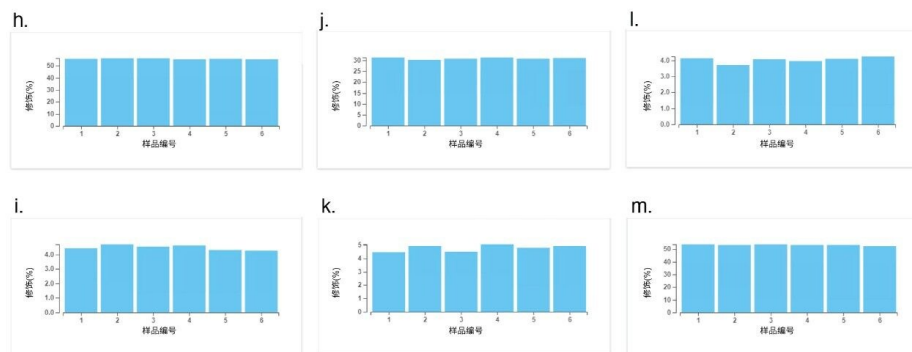


图7. 英夫利昔单抗CQA肽的修饰百分比。#1和#2为未降解样品，#5和#6为降解样品，#3和#4为1:1混

---

合样品。

A. 对于具有氧化或脱酰胺修饰的CQA肽，未降解样品和降解样品的1:1体积混合物的修饰百分比大约处于未降解样品和未降解样品的修饰百分比的中间。a. HC:T2 (LEES...GSMK)氧化M； b. LC:T6 (YASE...IPSR)氧化M； c. HC:T22 (DTLMISR)氧化M； d. HC:T42 (WQQG...TYQK)氧化M； e. HC:T7 (SINS...ESVK)脱酰胺N； f. HC:T37 (NQVS...CLVK)脱酰胺N； g. HC:T38 (GFYP...NNYK)脱酰胺N。

B. HC:T37肽NQVSLTCLVK的质谱图（图7A中的f）。上图：未修饰形式（ $m/z$ : 552.81，双电荷）；下图：脱酰胺形式（ $m/z$ : 553.30，双电荷）。

C. 对于未发生氧化或脱酰胺修饰的CQA肽，无论降解状态如何，修饰百分比都是一致的。h: HC:T26 (EEQYNSTYR) G0F N； i: HC:T26 (EEQYNSTYR) G0F-GlcNAc N； j: HC:T26 (EEQYNSTYR) G1F N； k: HC:T26 (EEQYNSTYR) Man5 N； l: HC:T26 (EEQYNSTYR) G2F N； m. HC:T43 (SLSLSPG) +赖氨酸C端。

---

## 结论

本文所述方法采用Andrew+机器人平台的自动化胰蛋白酶酶解方案，并使用抗自切性强的新型胰蛋白酶：RapiZyme胰蛋白酶，该产品与其他测序级胰蛋白酶产品相比具有更高的活性，使30  $\mu\text{g}$  mAb样品的CQA肽相对定量获得了一致的结果<sup>4,5</sup>。这种自动化胰蛋白酶酶解方法能够在4小时内生成48个样品。此外，ESI-ToF BioAccord LC-MS方法的总运行时间仅10分钟，得到的LC-MS数据可通过waters\_connect使用Peptide MAM应用程序软件自动处理。

本应用纪要所述的通用程序展示了机器人平台的功能和所用的LC-MS方法，该方法可轻松优化，以满足其他蛋白质样品的特定分析要求。

---

## 参考资料

1. Lange I., Chhatre S., and Zoro B. Reducing Timelines in Early Process Development – Using a Multiparametric Clone-Selection and Feed-Optimization Strategy. Bioprocess International,



November 2014.

2. Ren D., Pipes G.D., Liu D., Shih L-Y, Nichols A.C., Treuheit M.J., Brems D.N., Bondarenko P.V. An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. *Analytical Biochemistry* 392 (2009) 12–21.
3. Hanna C. M., Koza S. M., Yu Y. Q. 蛋白A纯化单克隆抗体的自动化高通量N-糖标记和LC-MS分析.沃特世应用纪要. [720007854ZH](#), 2023年2月.
4. Ippoliti S., Zampa N., Yu Y. Q., Lauber M. A. 使用RapiZyme™胰蛋白酶在生物制药表征中提供通用的快速酶解方案.沃特世应用纪要. [720007840ZH](#), 2023年1月.
5. Finny A. S., Zampa N., Addepalli B., Lauber M. A. Fast and Robust LC-UV-MS Based Peptide Mapping Using RapiZyme™ Trypsin and IonHance™ DFA. Waters Application note. [720007864](#), February 2023.

---

## 特色产品

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

搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统，适用于常规生物治疗药物分析 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134801648>>

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

720007885ZH, 2023年4月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号