

## 电荷异质性检测：从克隆筛选到制剂

LabChip 系统上可实现的另一项实验，是通过毛细管区带电泳评估生物分子（特别是抗体）上的电荷异质性。生物分子中出现异质性的主要因素之一是应力诱导的变异性。异质性通常会对药代动力学特性产生影响。此方法在保持总电荷的情况下，通过一个 10 分钟的反应对  $pI$  7.5 至 9 范围内的抗体进行荧光标记。标记的样品随后通过真空方式由进样针吸入微芯片，芯片中的样品被电动注入分离通道并实现分离。该方法在不到 60 秒的时间内即可实现主峰、酸性和碱性峰的充分分离。单克隆抗体的典型谱式如图 7 所示。

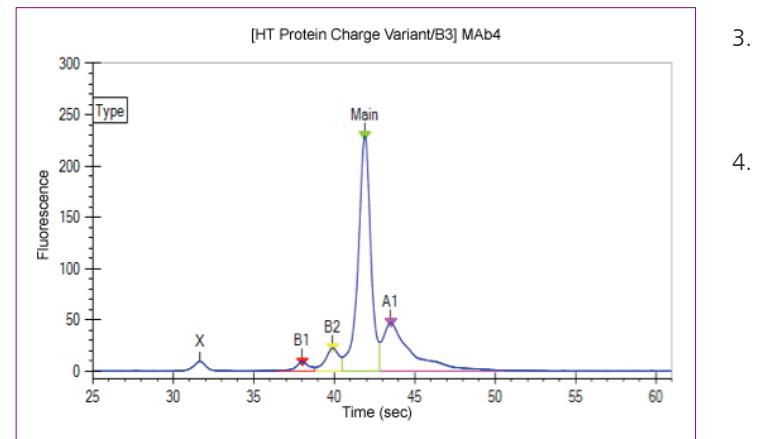


图 7. 图中所示为在大约 60 秒的时间内由 Labchip 得到的典型 mAb 曲线。碱性区在主峰的左侧（由 B1 和 B2 表示），酸性区在右侧（由 A1 表示）。抗体的分离取决于抗体分子的  $pI$ （以及分离缓冲液的 pH）

本文中，我们将介绍使用 LabChip® 微流体平台分析抗体，展示此方法在测定样品纯度和定量时的精度、线性范围及解析低丰度杂质的能力。抗体在还原和非还原条件下，通过可重复使用的微流体芯片，以自动化的高通量模式进行分析，每个样品的分析耗时仅为 41 秒。

## 小结

LabChip 微流体平台上的 HT Antibody Analysis 200 实验可作为 SDS-PAGE 和常规 CE- SDS 的高通量自动化替代方案，用于筛选抗体产品质量属性，包括定量、片段化和纯度分析。该实验可快速获取（41 秒/样品）高精度（ $RSD < 1\%$ ）的结果，在 8 – 2000  $\mu\text{g/mL}$  的浓度范围具有良好的线性，并可以 9:1 的信噪比检出低含量杂质。

## 参考文献

1. Rathore A. S. and Winkle H., Quality by design for biopharmaceuticals, *Nature Biotechnology* 2009, 27, 26-34.
2. Chen X. et. al. Microchip assays for screening monoclonal antibody product quality. *Electrophoresis* 2008, 29, 4993-5002.
3. Swalley S. E. et. al., Screening Factors Effecting a Response in soluble protein expression: formalized approach using design of experiments. *Analytical Biochemistry*, 2006, 351, 122-127.
4. Bousse L. et. al., Protein sizing on a microchip. *Anal. Chem.* 2001, 73, 1207-1212.



## 在高通量QbD实验中采用微流体技术进行抗体分析

### 摘要

当前对工艺分析技术 (Process Analytical Technology, PAT) 和质量源于设计 (Quality by Design, QbD) 的积极性对识别和彻底弄清关键工艺参数 (Critical Process Parameters, CPP) 与关键质量属性 (Critical Quality Attributes, CQA) 之间的关系提出了更高的需求<sup>1</sup>。

实验设计 (Design of Experiment, DOE) 研究所产生的样品数量之大，已远远超出了现代分析实验室的容量，无论是用于测试细胞培养条件改变对单克隆抗体 (monoclonal antibodies, MAb) 的翻译后修饰的影响，还是监测其纯化工艺。随之而来的，则是对具有出色精度、高度自动化且易于使用的高通量分析平台的需求。

本文中，我们将介绍使用 LabChip® 微流体平台分析抗体，展示此方法在测定样品纯度和定量时的精度、线性范围及解析低丰度杂质的能力。抗体在还原和非还原条件下，通过可重复使用的微流体芯片，以自动化的高通量模式进行分析，每个样品的分析耗时仅为 41 秒。



图 1. LabChip GXII Touch 系统。

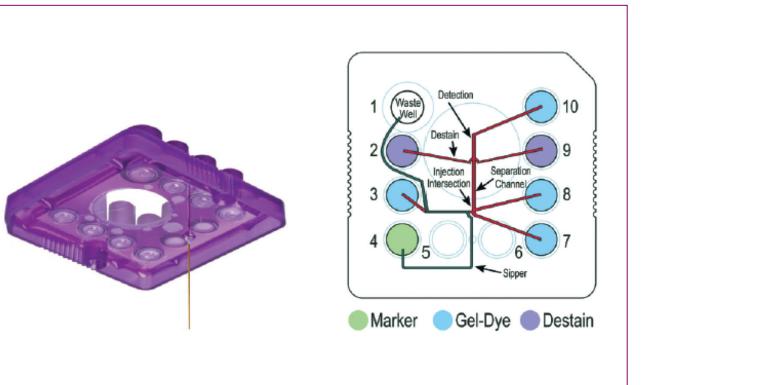


图 2. 带有进样针的LabChip GXII Touch 蛋白芯片的图像 (左) 和微流体通道构造的俯视图 (右)

## 简介

单克隆抗体产品由于发酵过程中常常发生翻译后修饰，而具有固有的异质性。所以，为评估其CQA，需要对 MAb 产品进行全方位的指征检定。在工艺开发的早期阶段，为了从工艺参数的可变范围内设定工艺设计空间，实验人员常通过 DOE 或因子实验设计 (Factorial Experimental Design, FED) 实验来理解工艺参数和产品质量之间的关系。在这类细胞培养条件或纯化工艺的 DOE 研究中，需要考察的变量越多，则产生的需要分析处理的样品数量就越大。目前，监测蛋白质产品质量的方法包括 SDS-PAGE 和 HPLC。SDS-PAGE 劳动强度大，且难以实现自动化，在现代分析实验室中已被基于 CE 的分离法代替。CE 和 HPLC 分析需要 15-60 分钟/样品的分离时间，这会限制 DOE 研究。

在过去的几年中，基于微流体的检测方法广泛应用于蛋白质的大小测定、定量和纯度评估，因为它们有效解决了 SDS-PAGE、HPLC 和 CE 方法的局限性<sup>2,3</sup>。Chen 等人<sup>2</sup>对使用 LabChip 技术筛选 MAb 产品质量属性进行了研究。他们在还原和非还原条件下分析了来自 CHO 细胞培养物上清粗提液的 MAb 和纯化产物，所得分辨率和灵敏度与采用 20 cm 毛细管的常规 CE-SDS 相似，但分析速率要快大约 70 倍 (41 秒 vs. 50 分钟/样品)。

LabChip GXII Touch 是一个高度自动化的平台，适用于蛋白质和核酸的快速分析。LabChip GXII Touch 直接从 96 孔板或 384 孔板采样，使用方便且长时间无人值守。每个样品可在 41 秒或更短时间内完成分析，一块 96 孔板的分析耗时仅略多于 1 小时 (图 1)。

微流体芯片 (图2) 上整合有一维 SDS-PAGE 的主要特性：包括分离、染色、脱色和检测步骤，从而实现蛋白质大小测定。变性的蛋白质直接从微孔板通过毛细管进样针转移到芯片上，电动上载并注入 14 mm 长的分离通道，通道中含有聚合物溶液形成的低粘度基质。样品中的蛋白质-SDS 复合物和游离 SDS 胶团立即会被存在于筛选基质中的染料染色。在分离通道的末端，样品将被稀释，使 SDS 浓度降至低于其临界微团浓度，从而降低背景荧光，使蛋白质-SDS- 染料复合物可被检出。

这种基于集成式微芯片的检测实验只需最少的手动样品制备操作即可达成对单克隆抗体及其片段，包括粗制品的分离和定量。本应用资料中还将通过图示介绍实验的可重复性、分辨率、线性、定量和灵敏度结果。

## 实验结果和讨论

所有实验均根据用户指南的描述，在 LabChip GXII Touch 系统 (Revity) 上采用 HT Antibody Analysis 200 检测法完成。

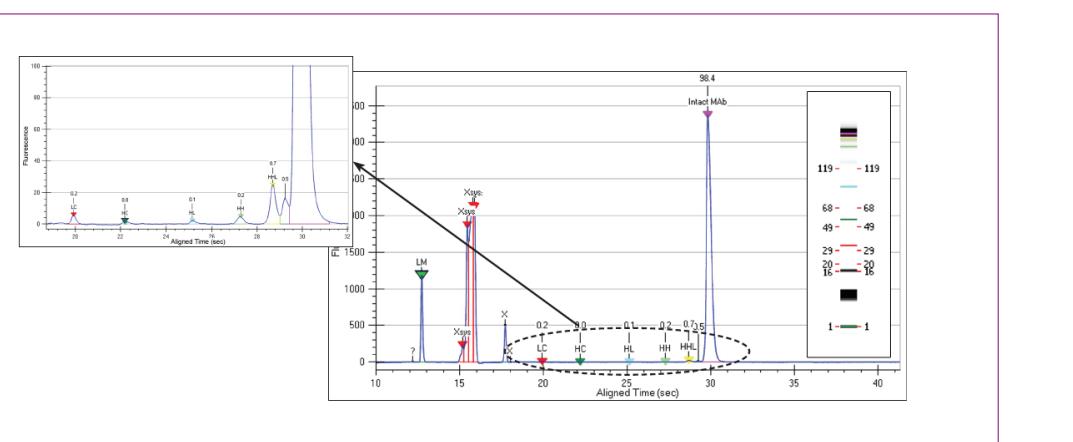


图 3. 非还原 MAb 电泳图，显示有片段和完整 MAb 的 % 纯度。位于大约 17.5 秒处标记为 X 的峰是加入抗体中用作内标物的溶菌酶。LM 是内标，Xsys 是系统峰。

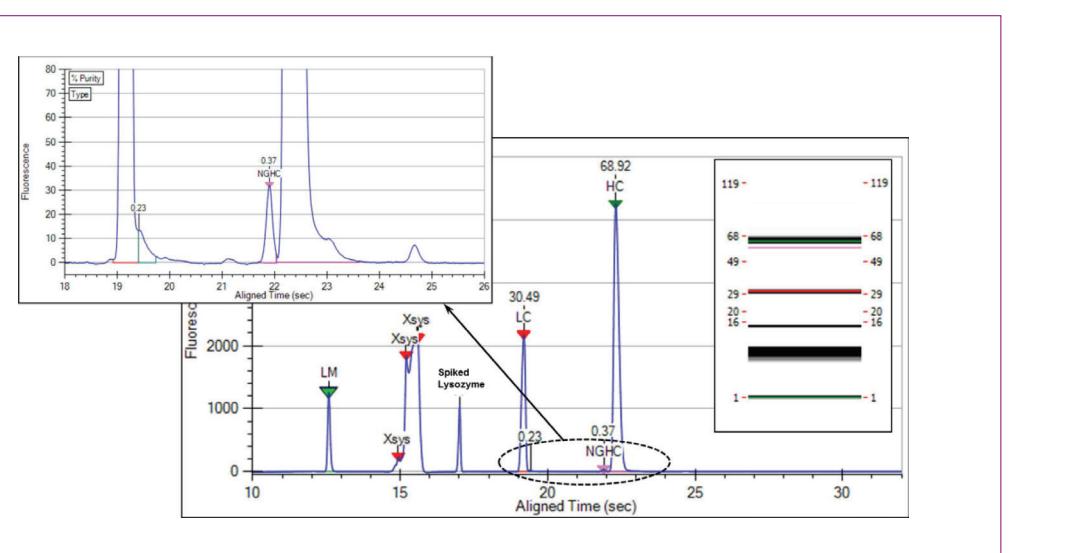


图 4. 还原 MAb 电泳图谱

## 电泳图谱分析

图 3 展示了浓度为 1 mg/mL 的非还原 MAb 的电泳图谱示例。左侧插图可见低含量片段，例如轻链、重链、重-轻链、重-重链、重-轻链和完整 MAb 均实现良好分离。还原 MAb 的电泳图谱如图 4 所示，图中可见非糖基化重链 (NGHC) 与重链之间具有足够的分辨率，可进行准确定量。Chen 等人<sup>2</sup>使用 HT Protein Express 实验对粗样品中的 NGHC 进行定量，以测定高甘露糖的相对含量。他们最终得出结论该实验可为早期细胞培养筛选提供有价值的反馈。

## 检测线性

通过对 8 - 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内的 MAb 稀释液进行非还原条件下的分析，测试了该实验的检测线性。每个浓度重复测试 8 次。积分的时间修正面积 vs. 预期浓度的线性曲线  $R^2$  值为 0.9997 (图 5)。

3 个数量级的线性动态范围提示该检测法具有用于浓度测定的潜力。

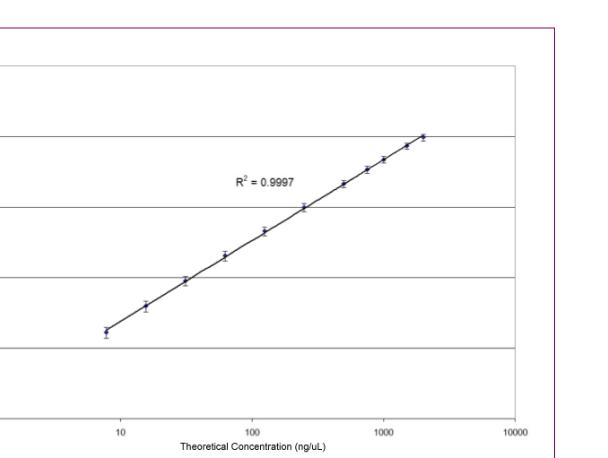


图 5. 线性动态范围：8 至 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内的时间修正面积 vs. 理论 MAb 浓度

## 检测精度

实验间的精度通过计算完整 MAb、轻链、重链和 NGHC 纯度 % 的相对标准差 (relative standard deviation, RSD) 进行确定。3 位不同的操作者在还原和非还原条件下对每个 MAb 进行了 8 遍样品制备。然后每位操作者在不同的芯片和仪器上对样品进行检测。表 1 总结了来自 3 位操作者的综合结果 (每个 MAb 总共 24 次样品制备)。完整 MAb 的 RSD < 0.5%，重链的 RSD < 2%，轻链和 NGHC 的 RSD < 4%。

## 实验定量能力

为确定非还原样品中的样品浓度，实验采用 8 - 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内的 MAb 生成了标准化修正面积 vs. 预期浓度的标准曲线。溶菌酶用作内标物并以 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的浓度加入样品缓冲液。每个样品中抗体峰的时间修正面积均参照溶菌酶峰的时间修正面积进行了归一化。然后使用标准曲线计算 3 个不同 MAb 的浓度。每个 MAb 被稀释到 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的预期浓度。与确定实验精度时一样，3 位操作者进行了 8 次样品制备并在不同的芯片和仪器上完成样品检测。表 2a 所示为每位操作者的 MAb3 平均计算浓度和 RSD。表 2b 所示为全部 3 位操作者所得每个 MAb 的综合值。MAb1 和 MAb3 定量结果的 RSD < 2%，MAb2 定量结果的 RSD < 5%。

## 低含量杂质检测

为详细展示低含量杂质的检测能力，样品中加入了相当总蛋白浓度为 1% 的溶菌酶。在还原条件下检测 1 mg/mL 浓度的 MAb。图 6 所示为溶菌酶峰的分辨率，其信噪比为 9:1。

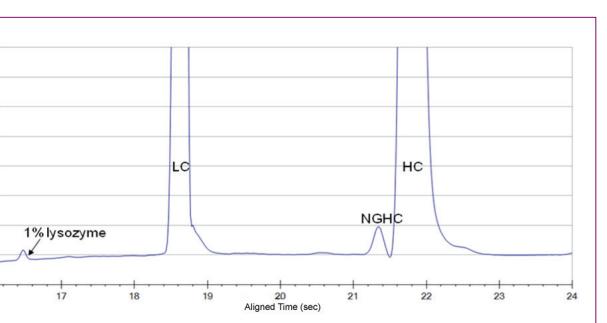


图 6. 检测以总蛋白浓度 1% 加入的溶菌酶

## 中性多糖的高通量筛选

ProfilerPro Glycan Profiling 实验为 IgG 和相关蛋白的主要糖型评估提供了一种更快、更高效的方法。Revity 提供包括样品制备板和微流体检测组分在内的全套筛选试剂盒，可实现快速消化学、染色和重组单克隆抗体 (MAb) Fc 区域中主要糖型 (N-糖) 的识别。

ProfilerPro Glycan Profiling 筛选实验相比竞争技术在速度上快 60-70%，成本上低 10-60%。短短半天时间内，即可完成 96 个样品的分析。

	% 完整 MAb		% LC		% HC		% NGHC	
	平均	RSD (%)	平均	RSD (%)	Average	RSD (%)	平均	RSD
MAb1	98.13	0.18	29.38	3.61	69.69	1.67	69.69	1.32
MAb2	95.48	0.51	29.04	3.39	69.15	1.43	69.15	3.72
MAb3	98.53	0.32	29.59	3.27	69.70	1.46	69.70	4.04

表 1. 非还原和还原 MAb 样品的检测间精度。

MAb3	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{uL}$ )	RSD (%)	MAb1	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{uL}$ )	RSD (%)
操作者 1	1046	1.91			
操作者 2	1052	2.19			
操作者 3	1036	1.76			
MAb2			1039	1.68	
MAb2			1007	5.39	
MAb3			1046	1.92	

表 2a. 各操作者的 MAb3 计算浓度。

MAb3	浓度 ( $\mu\text{g}/\text{uL}$ )	RSD (%)
操作者 1	1046	1.91
操作者 2	1052	2.19
操作者 3	1036	1.76
MAb1	1039	1.68
MAb2	1007	5.39
MAb3	1046	1.92

表 2b. 总体计算浓度。