

自动化多属性监测流程用于生物治疗药物的在线监测

P. Nikki Sitasuwan, Todd Mullis, Caleb Schlacter, Sunil Hwang, L. Andrew Lee*
Integrated Micro-Chromatography Systems, Inc. Columbia, SC



简介

蛋白质纯化是一个多步骤过程，结合了各种树脂和耗材以达到所需的结果。例如，重组蛋白纯化通常使用诸如 Ni-NTA 之类的亲和树脂来实现，随后进行缓冲液交换以去除多余的盐。其他基于亲和力的纯化方法也类似，因为用 Protein A/G 纯化的 IgG 使用碱性缓冲液来中和酸性洗脱液，但最终储存缓冲液可能需要不同的配方。在这里，我们将 Hamilton Microlab STAR 自动化液体处理系统与 IMCStips 整合，以实现高通量蛋白质纯化，随后进行多个工作流程步骤，从而避免在每个步骤之间切换设备或耗材。第一个工作流程是通过 Ni-NTA 纯化重组蛋白，随后在 SizeX₁₅₀ 上进行缓冲液交换以去除多余的咪唑盐。然后将纯化的蛋白分装用于蛋白质定量。该工作流程展示了从细胞裂解液到定量、纯化蛋白的便捷方法，每批次可在不到 2 小时内完成。第二个工作流程是 Protein A 纯化后对 IgG 进行表征，随后进行变性、还原、烷基化、在 SizeX 上进行缓冲液交换，随后进行胰蛋白酶消化，用于多属性监测。第三个工作流程是在单一工作流程中进行反相肽脱盐和磷酸肽富集。最后一个工作流程是在移液枪头内使用链霉亲和素珠捕获生物素化抗 Fc 抗体，随后从小鼠血清中下拉 Avastin。然后将洗脱的样品进行还原、烷基化和胰蛋白酶消化，用于定量小鼠血清中的生物治疗抗体。这些与 IMCStips 整合的工作流程展示了使用不同 Intip™ 化学试剂纯化不同蛋白质，以及 Hamilton Microlab STAR 在单一平台上实现多种过程的灵活性，从而以最少的人工干预实现高通量工作流程。

材料与 方法

这些自动化工作流程是通用模板，适用于多种不同的 Intip 化学试剂，以纯化不同类型的目标物，范围从带标签的重组蛋白到免疫球蛋白，随后使用 SizeX IMCStips™ 进行缓冲液交换。IMCStips 可配备不同的亲和树脂（用于 his 标签蛋白的 Ni-IMAC、用于免疫球蛋白的 Protein A/G、用于生物素化靶标的链霉亲和素）以靶向特定的目标蛋白。此处展示的台面布局是通用模板之一，作为在 Hamilton Microlab STAR 上进行亲和纯化的“即用型”工作流程。图形用户界面中的选项可以提供优化的工作流程，并在最大回收率与用于快速定性分析的快速纯化工作流程之间提供灵活性。最终，这一自动化工作流程提供了一致性，但仍具有一定的额外灵活性，可调整工作流程（吸液/排液循环）和洗涤步骤，以针对特定目标定制每个工作流程。



图1. 用于控制吸液和排液循环的图形用户界面，以及用于亲和纯化后缓冲液交换的典型台面布局。

结果

重组蛋白纯化

A. 使用 IMCStips 进行亲和纯化



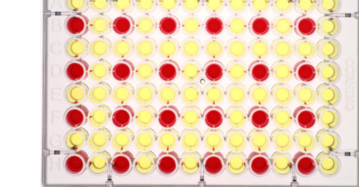
使用 SizeX 进行缓冲液置换



B. 使用 SizeX 进行缓冲液置换



C. 使用 SizeX 进行缓冲液置换



	Average	Stdev	% CV
β-GUS (n=8)	0.397	0.052	13.3
SULF (n=24)	0.123	0.017	14.5
Blank (n=24)	0.024	0.006	27.9

表 I. 使用 IMCStips Ni-IMAC 纯化的 his 标签 β-葡萄糖醛酸酶 (β-GUS) 和硫酸酯酶 (SULF) 的蛋白质定量 (Bradford 法)。重组蛋白在大肠杆菌中表达。蛋白质定量显示了 IMCStips Ni-IMAC 高通量纯化的重现性和一致性。

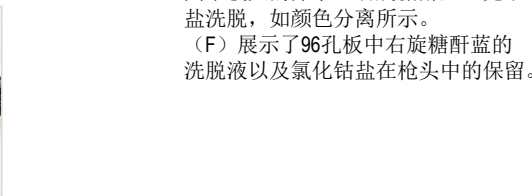
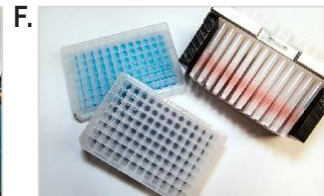
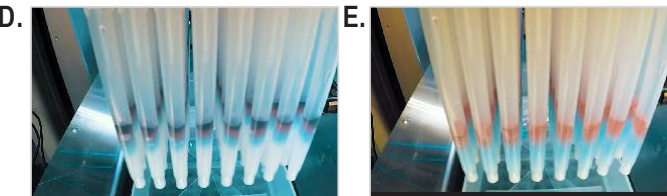


图2. (A) 使用 Ni-IMAC 亲和树脂纯化重组蛋白的 Intip 化学工作流程。(B) 含重组蛋白的粗裂解液、流穿液、两种洗涤溶液和最终洗脱液的 SDS-PAGE。(C) 使用对硝基邻苯二酚硫酸酯酶量的 his 标签硫酸酯酶的酶活性测定。每个第四个象限含有纯化的硫酸酯酶，可将底物转化为红色溶液。细胞裂解液以 96 孔板形式纯化和洗脱，随后进行缓冲液交换。活性测定表明工作流程中没有交叉污染。黄色溶液表示无硫酸酯酶活性。(D) 含右旋糖酐蓝和氯化钴盐溶液的 SizeX 枪头侧视图，二者混合时呈紫色。该溶液用于示例样品溶液。右旋糖酐蓝约为 20 kDa，而氯化钴是一种盐，呈粉红色。(E) 两种化合物的分离小于尺寸，其中较大的分子（右旋糖酐蓝）先于盐洗脱，如颜色分离所示。(F) 展示了 96 孔板中右旋糖酐蓝的洗脱液以及氯化钴盐在枪头中的保留。

在线多属性监测

A. Protein A IMCStips

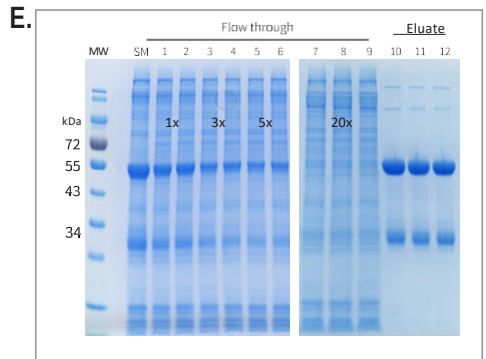
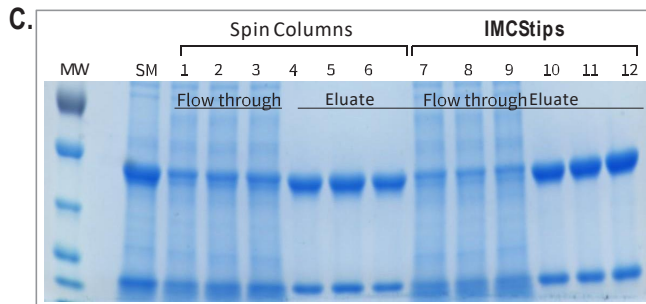
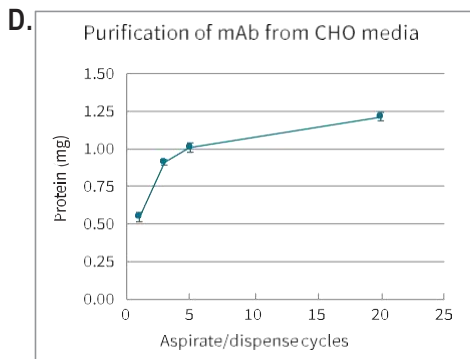
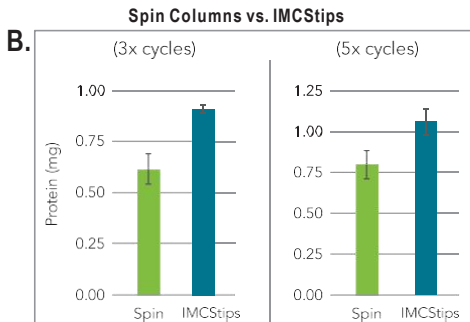
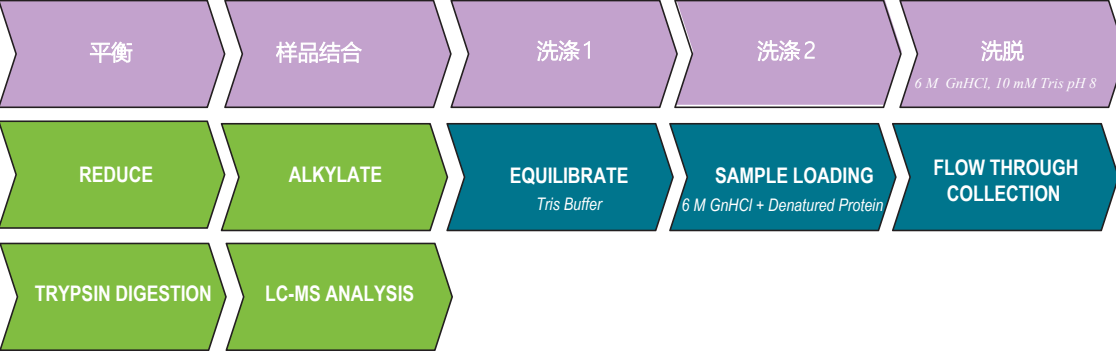


图3. (A) 在 Hamilton 平台上进行在线多属性监测的工作流程方案，该方案结合使用 Protein A IMCStips 从细胞上清液中纯化抗体，随后依次加入试剂，如还原剂和烷基化剂。变性后的抗体随后使用 SizeX（一种体积排阻色谱枪头）进行脱盐，随后进行胰蛋白酶消化，用于最终的 LC-MS 进样和分析。(B, C) 使用 MabSelect SuRe LX 树脂通过离心 (spin) 和 IMCStips™ 对单批次 CHO 细胞发酵液进行纯化。为进行比较，离心方法使用 100 x g RCF 离心 5 分钟，并将流穿样品重新施加到柱上 3 次或 5 次，与枪头形式类似。离心形式的重复性产生的 mAb 少于枪头形式，如 UV-Vis 测量 (Abs@280 nm) 和 SDS-PAGE 所示。增加吸液/排液循环可提高 IgG 的产率，如通过 UV-Vis 进行蛋白质定量所示。(D, E) 并且如流穿介质中重链和轻链的减少所示。洗脱液是在 20 次吸液/排液循环后获得的，最终洗脱体积为 400 μL，使用 pH 3.5 的 NaOAc。样品用 1/10 体积的 1 M Tris pH 8 中和。每个循环均为重复运行，除了最终的 20 次流穿和洗脱液为三重复。

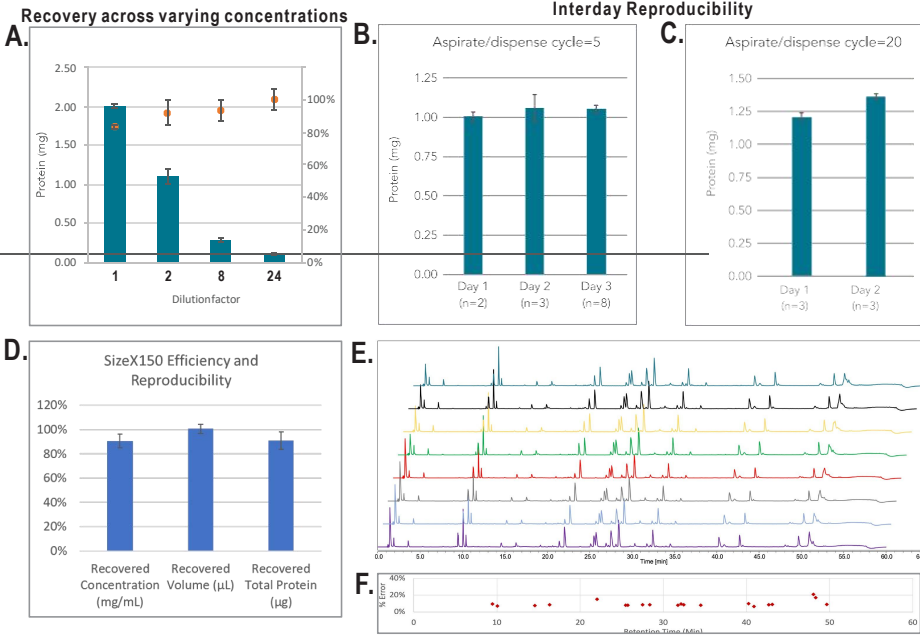


图4. (A) 使用 0.1% BSA 的 1x PBS (pH 7.4) 制备 CHO 培养基的系列稀释液，以评估不同浓度下的结合容量和回收率。(B, C) 在 3 天内使用不同数量的枪头和两种不同的吸液/排液循环，测试了从不同细胞培养基中富集 mAb 的效果。将最终浓度为 1 mg/mL 的单克隆抗体使用 6 M 盐酸胍变性。随后，分别用二硫苏糖醇还原并用碘乙酸烷基化。将 100 μL 抗体加载到 IMCStips SizeX100 上，以去除变性剂，用于后续的胰蛋白酶消化。(D) 回收抗体浓度、体积和抗体总量的平均百分比 (n=20)。误差棒显示 ± 1 S.D. (E) 消化后，样品在 HPLC-UV 上进行分析。叠加显示了 8 个代表性 A280 色谱图。(F) 8 个重复进样的面积积分百分比误差。

反相和磷酸肽

该方法的关联台面布局将脱盐和磷酸肽富集方法结合在一起，并包含多个洗涤步骤（图 5）。程序从胰蛋白酶消化后的样品组开始，这些样品是在使用丙酮沉淀细胞裂解液中的蛋白质之后获得的。



图5. 用于脱盐和磷酸肽富集自动化方法的 Microlab STAR 台面布局

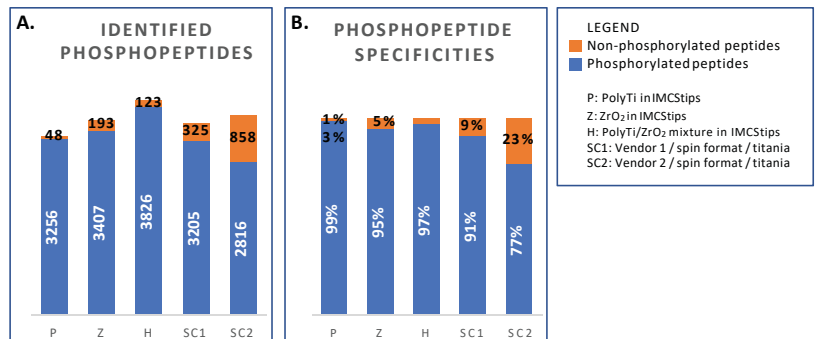


图6. (A) 富集后鉴定到的磷酸肽总数 (B) 其在不同树脂类型以及自动化/手动工作流程中的相应特异性。P、Z 和 H 使用 IMCStip 并通过自动化磷酸肽富集方法进行处理。SC1 和 SC2 按照供应商的方案进行处理。所有样品均进行双重重复处理。所示数字为双重重复运行的平均值。

链霉亲和素

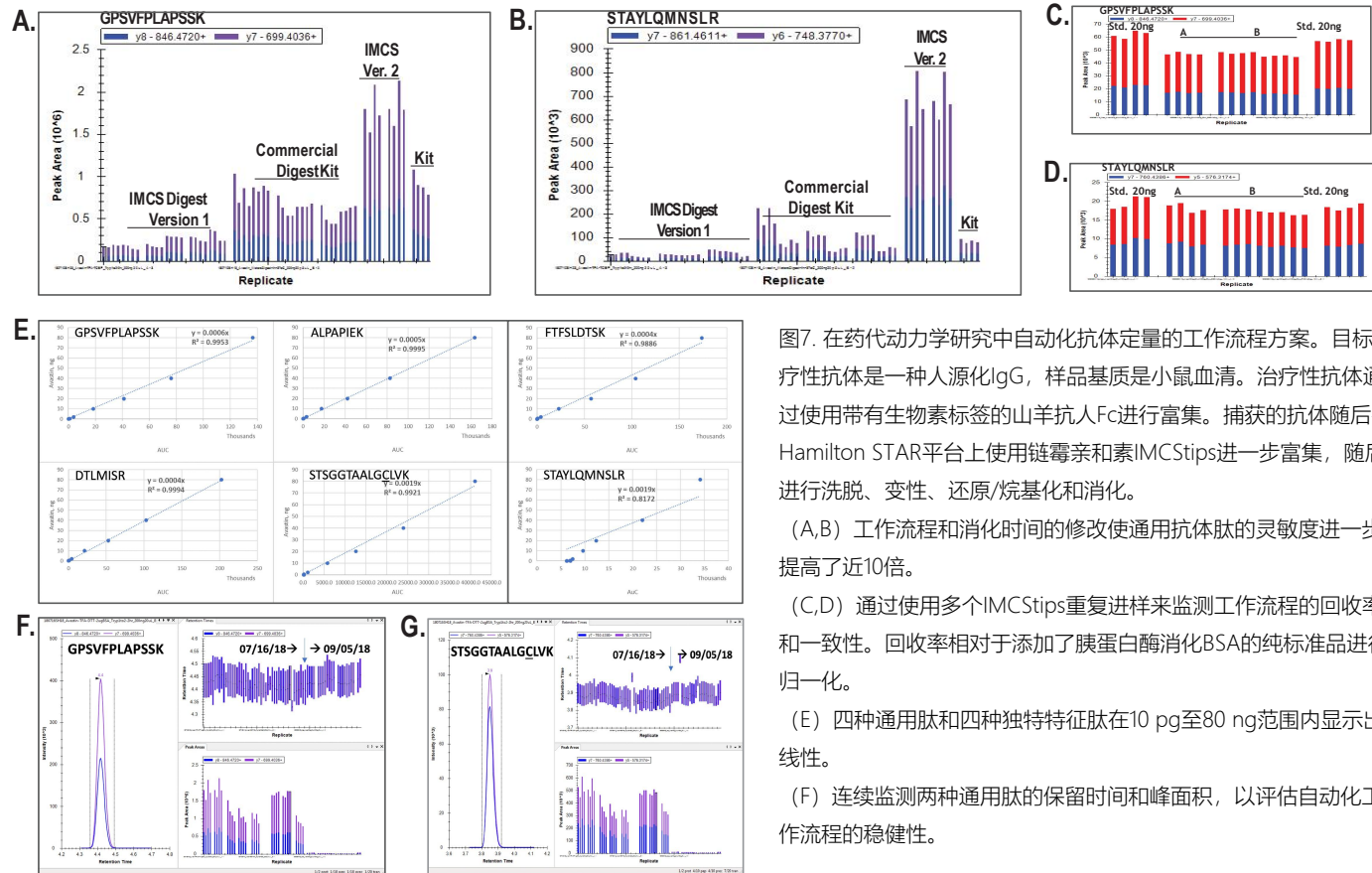
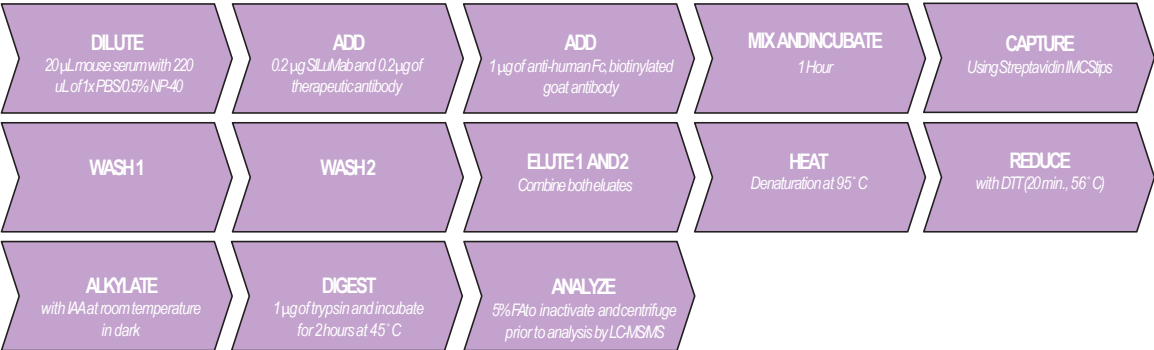


图7. 在药代动力学研究中自动化抗体定量的工作流程方案。目标治疗性抗体是一种人源化 IgG，样品基质是小鼠血清。治疗性抗体通过使用带有生物素标签的山羊抗人 Fc 进行富集。捕获的抗体随后在 Hamilton STAR 平台上使用链霉亲和素 IMCStips 进一步富集，随后进行洗脱、变性、还原/烷基化和消化。(A, B) 工作流程和消化时间的修改使通用抗体的灵敏度进一步提高了近 10 倍。(C, D) 通过使用多个 IMCStips 重复进样来监测工作流程的回收率和一致性。回收率相对于添加了胰蛋白酶消化 BSA 的纯标准品进行归一化。(E) 四种通用肽和四种独特特征肽在 10 pg 至 80 ng 范围内显示出线性。(F) 连续监测两种通用肽的保留时间和峰面积，以评估自动化工作流程的稳健性。

结论

各种目标分析物的亲和富集是一个常规过程，贯穿于从早期到后期的研究阶段。此处展示的工作基于自动化和高通量纯化，但仍为调整流程提供了灵活性，以适应不同数量的样品、不同的亲和力，并耦合多个工作流程过程，例如亲和纯化后的缓冲液交换。在实施这些工作流程时，高一致性和灵活性是关键点，无论是使用 Ni-IMAC 纯化带标签蛋白、使用 Protein A 固定化树脂从细胞培养基中纯化免疫球蛋白、使用链霉亲和素珠下拉生物素化靶标，还是使用体积排阻色谱自动化缓冲液交换过程。最终，IMCStips 与 Hamilton Microlab STAR 自动化液体处理系统耦合具有多种模式，可随着科学家需求的变化提供灵活性、一致性和演进兼容性。

致谢

我们感谢南卡罗来纳大学哥伦比亚分校的 Mike Walla 和 Bill Cotham 在 LC-ESI-qTOF 上对胰蛋白酶/LysC 消化的人 IgG 样品进行分析。