



自动化生物制药特征肽定量方法

采用Biomek FX[®] 实验室自动化工作站的SCIEX BioBA解决方案

Ian Moore¹, Michael Kowalski²

¹SCIEX, 安大略省, 加拿大; ²Beckman Coulter, 印第安纳波利斯, 美国印第安纳州

生物制药定量分析的主要挑战:

- ELISA试验中存在线性动态范围限制和部分情况下抗体缺乏选择性的问题;
- 特征肽段MRM定量分析方法的选择性高并且线性动态范围和特异性俱佳, 但样品前处理过程相对复杂;
- 试验过程中多次移液操作需要耗费大量人力;
- 能否在一个批次中和几个批次之间获得一致性结果是生物制药定量分析面临的一大问题。

SCIEX 自动化 BioBA 解决方案的主要特点:

- 自动化生物药的免疫-亲和和样品前处理完整解决方案 (图1);
 - BioBA 试剂盒提供了从高容量链霉素和素磁珠到酶切处理所需要的全部试剂;
 - Biomek FX[®] 工作站使全部过程自动化;
- 同时处理96个样品;
- 重复性好, 单抗样品从血浆中富集并酶解后总CV值小于10%;
- 易于使用的软件界面适用于常规检测。



图1. Biomek FX[®] 工作站, BioBA 试剂盒和SCIEX 6500 QTRAP系统。

引言

生物药物在制药公司的研发链中所占的比例不断增加。对新药分子的研发来说, 稳定可靠的生物分析方法是不可或缺的。由于LC-MS方法的高灵敏度和特异性, 常用于蛋白质定量时, 特征肽段的测定。结合免疫亲和策略进一步富集样品并去除基质干扰, 可进一步增加方法的灵敏度和选择性。不过在免疫亲和的过程中有大量的移液和孵育过程, 会消耗大量的时间和人力。相比于小分子工作流程, 生物药物样品前处理成为了分析过程的新瓶颈。可重现的样品前处理是建立稳定的临床前和一至四期临床分析方法的关键。

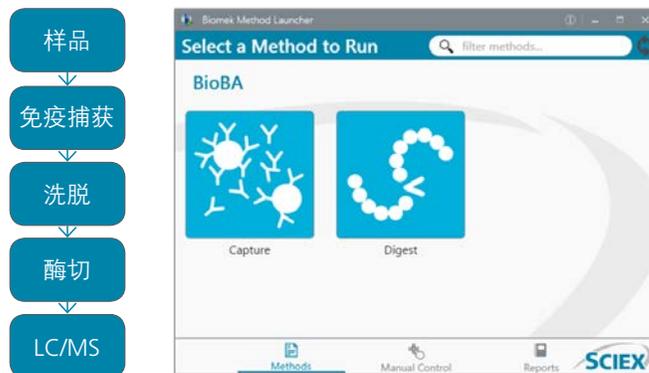


图2. SCIEX BioBA 自动化工作流程和Biomek FX[®] 方法启动工作区。

采用磁珠进行免疫亲和富集的优势包括:操作容易,样品处理量可放大,回收率有所提高,可通过采用磁力架批量处理样品并且可通过采用机械臂增加通量。采用自动化设备进行样品前处理可有效降低批间和日间变异。同时可以将科学家从繁重的重复劳动中解放出来,使他们更加专注于研究工作本身。在本文中,我们成功地使用Biomek FX工作站自动化完成BioBA试剂盒的样品前处理流程,在分析实际样品时得到了稳定可靠的结果。

方法

给药研究: 对四只雄性大鼠进行皮下利妥昔单抗给药,分别在注射前,0.5、2、6和24小时,第2、3、6、8、10、14、17、21、24和28天采集血清样本并冷冻保存。部分样品在5倍或10倍预稀释后由QPS采用已通过认证的ELISA方法在100 - 10000 ng/mL范围内进行分析,其他样品由位于加拿大安大略省的SCIEX公司采用免疫-亲和 LC-MS 进行分析。

在100 - 10000 ng/mL范围内建立校准标准,质量控制样品为300、3250和75000 ng/mL。由于样品体积偏低,以下样品在分析前采用空白鼠血浆进行5倍稀释:大鼠1、2:2天,大鼠3:0.5小时、2天、14天,大鼠4:0.5h、2天、14天。根据下文概述的步骤,在体积均为 25 μ L 的标准样品、质控样品和实际样品中添加1.0 μ g/mL SILuMab (Sigma-Aldrich) 内标。

自动化样品前处理: 图2 中展示了采用Biomek FX工作站自动进行SCIEX BioBA样品前处理的工作流程,该流程一次可处理96个样品。Biomek FX工作站配置了适用于深孔板的Peltier加热器、MagnaBot[®] 96 磁分离装置和轨道摇床。移液方法经过优化,确保每一步中都能完全转移所有液体。

该方法分为两个工作流程: 富集和酶解。软件中包括用于选择工作流程的仪表盘工作区(图2)。当工作方法启动后,通过 Guided Labware Setup界面(图3)可引导使用者详细地进行设置以避免错误安装,界面中还含有每次分析所需试剂量的信息。工作方法启动后,使用者可通过Milestone View查看实验室设备的当前状态、整体进度和完成实验所需的时间。将Biomek 工作站联网后,还可通过标准网络浏览器查看以上信息,从而实现系统的远程控制。

在富集过程中,我们在Biomek FX工作站的平台上分别装载了固定了相应抗体的链霉素亲和素修饰磁珠,同位素标记的内标,富集/清洗缓冲液,洗脱缓冲液和中和缓冲液。实验前我们先将样品板放置在工作站操作平台上,样品板上分别装有25-200微升标准品,质控样品,空白,双空白对照以及相应样品。首先,Biomek Biomek FX[®] 工作站将两倍样品体积的内标(1.0 μ g/mL SILuMAB)添加到样品盘中,并加入25 μ L磁珠富集分析物和内标。1小时的孵育后,取上清液并转移到存储盘中,用缓冲液洗脱磁珠三次,再用50 μ L洗脱液(0.1% TFA)孵育10分钟,最后将酸性上层清液转移至干净的洗脱盘中并加入中和缓冲液(500 mM 碳酸氢铵)。洗脱盘中的分析物可用于后续酶解实验。

富集结束后,Biomek FX的工作台被换上酶解所需的套件。酶解试剂(TCEP、碘乙酰胺(IAM)、阴离子表面活性剂和胰蛋白酶/胞内蛋白酶)被置于2 mL样品管中,甲酸和水分别置于不同储液器中。酶解所需试剂采用Span-8吸头移入尖底96孔板中。特定体积的洗脱缓冲液通过96道吸头移取。为防止小体积溶液蒸发,我们酶解试剂的移取时间进行了精确控制。同时使用Span-8吸头和96道吸头可在最大程度上降低移液过程中的时间浪费,从而实现同时处理96个样品。自动化酶解实验的第一步是加入还原剂(100 mM TCEP),随后洗脱盘在50 摄氏度下孵育1小时。然后加入烷基化试剂(100 mM IAM),室温混合30分钟,接下来依次加入质谱兼容的阴离子表面活性剂和胰蛋白酶-LysC混合酶,37

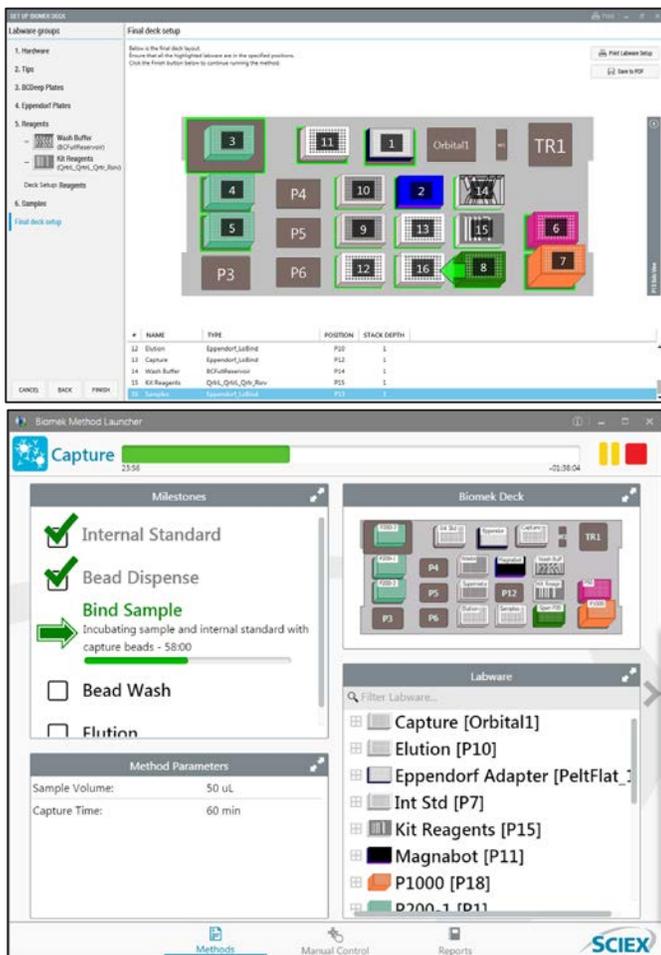


图3. BioBA解决方案中Biomek方法启动软件的Guided Labware Setup和Milestone View界面。

摄氏度条件下孵育3小时。最后，加入3 μL 甲酸终止酶解过程。最后，用50微升水稀释样品，移取75微升稀释后的样品到干净的96孔液相进样板中待用。

色谱条件：本文采用Shimadzu LC-20系统分离酶解肽段，该系统包括：CBM-20A 系统控制器、两台LC-20AD 等度泵、SIL-20AC 自动进样器和使用Phenomenex 2.6 μm Kinetex C18色谱柱（50 \times 2.1 mm）以及CTO-20AC柱温箱（柱温50 摄氏度）。采用短梯度分离（见表1），进样体积5 μL 。

表1. 液相条件。

步骤	总时间 (min)	%B**	流速 ($\mu\text{L}/\text{min}$)
1	0.00	10	400
2	4.00	40	400
3	4.25	95	400
4	5.50	95	400
5	5.60	10	400
6	6.30	10	400

*流动相A: 0.1%甲酸水溶液（体积比）

**流动相B: 0.1%甲酸乙腈溶液（体积比）

质谱：采用配置IonDrive™ Turbo V离子源的SCIEX QTRAP® 6500液质系统进行MRM分析，离子源/气流参数如下所示：IS 5500，CUR 25 psi，TEM 500 $^{\circ}\text{C}$ ，GS1 85 psi，GS2 80 psi，CAD High。表2列出了待分析多肽的MRM信息，相应多肽选择Rituximab和SIGMAMAB的Fc段。

表2. MRM参数。

Q1	Q3	Dwell	DP	CE	CXP	保留时间 (min)	肽段
560.1	708.8	25	60	22	28	2.1	Sig Peptide 1_1
560.1	615.7	25	60	23	15	2.1	Sig Peptide 1_2
562.9	713.3	25	50	23	28	2.1	Heavy Sig Peptide 1_1

数据处理：采用MultiQuant进行积分，制作标准曲线，计算未知样品和QC样品的浓度。

结果：

为验证酶解方法的重现性，我们采用SILuLite（Sigma-Aldrich）抗体标准样品和SILuMAB 内标（3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）作为验证样品，所有样品溶于50 mM碳酸氢铵缓冲液中。孔板的第1、4、6、9和11列中SILuLite含量为540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，第2、5、7、10和12列中SILuLite含量为180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，第3和8列为空白缓冲液。采用三个通用特征肽段峰面积比来验证重现性。图4中展示了肽段DTLMISR的实验结果，40个含量为540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品的CV值为 5.9%，含量为180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 样品的CV值为 4.4%。对于其他两个通用特征肽段（未列出数据），低含量样品的CV值分别为8.2%和5.4%，高含量样品的CV值分别为5.2%和4.1%。第3列和第8列空白样品中未出现特征肽段MRM响应，说明在液相操作过程中没有出现交叉污染。

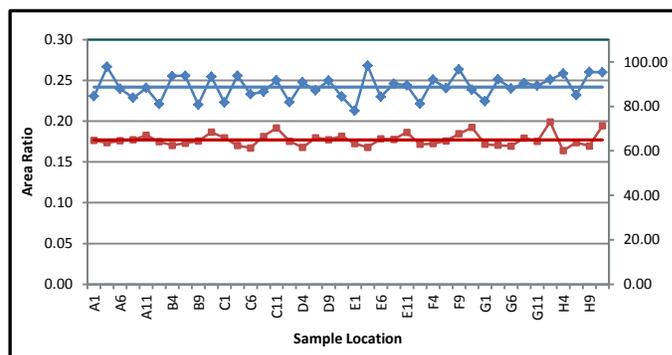


图4. 以DTLMISR/DTLMISR*峰面积比衡量的酶解重现性结果，红色是浓度为180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品，蓝色是浓度为540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品。

接下来我们考察了整个工作流程的重现性，准备鼠血浆中rituximab浓度为 3.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的大体积QC样品，在96孔板中的94孔中，分别加入50 μL 的QC样品。图5中结果是不同孔位中某一段特征肽段和相应的同位素标记肽段的峰面积比数据。所有孔中提取后样品测得的结果%CV值为8.7%。

最后，为了验证该自动化方法的实用性，我们采用实际样品，而不仅仅是质控样进行了进一步验证。动物给药实验委托QPS公司进行。采集的样品首先由QPS公司采用ELISA方法进行检测，线性范围为100-10000 ng/mL。样品在分析前经过稀释。经过ELISA分析后的样品由SCIEX进行后续MRM分析。

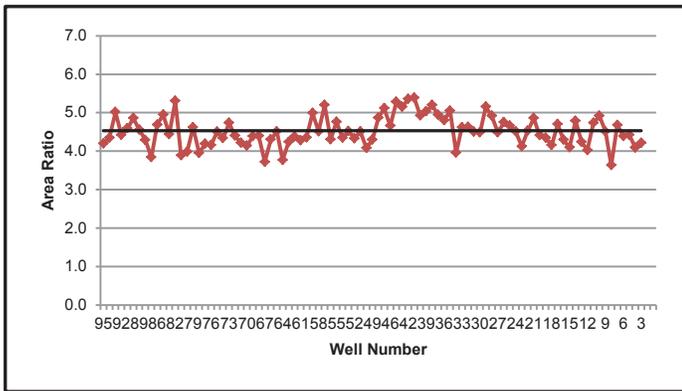


图5. 采用鼠血浆样品特征肽段峰面积比测定自动化BioBA方法的重现性 (在96孔板的94孔中加入3.25 µg/mL溶于血浆的rituximab样品。)

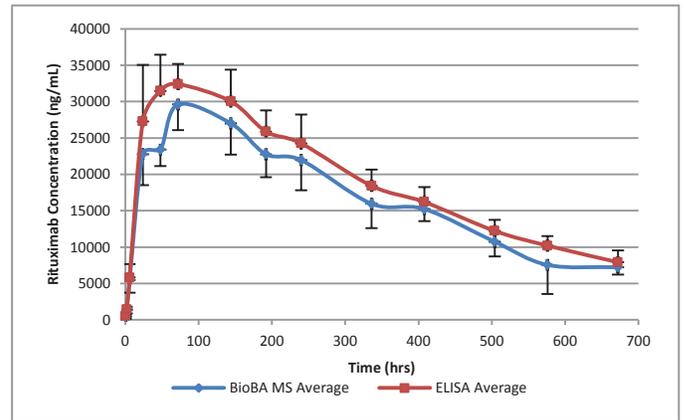


图8. 采用ELISA试验 (QPS) 和BioBA自动化样品处理方法测定的rituximab的平均浓度变化趋势 (四只大鼠)。

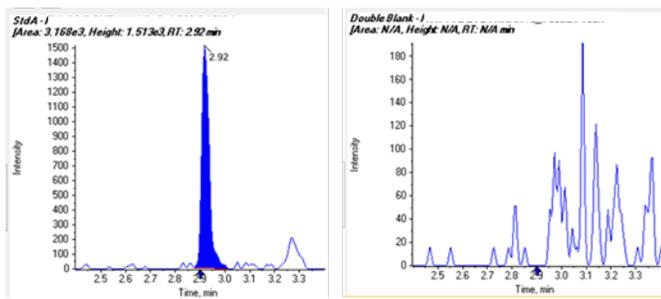


图6. 自动化BioBA方法分析LLOQ标准样品和双空白样品的谱图示例。

图6所示为LLOQ标准样品和双空白样品的谱峰，信噪比为95，说明灵敏度优异。图7所示为不同批次样品的标准曲线和统计数据。准确度为92.4-108%，CV值0.8-12.6%。标准曲线的r值为0.9985，线性良好。

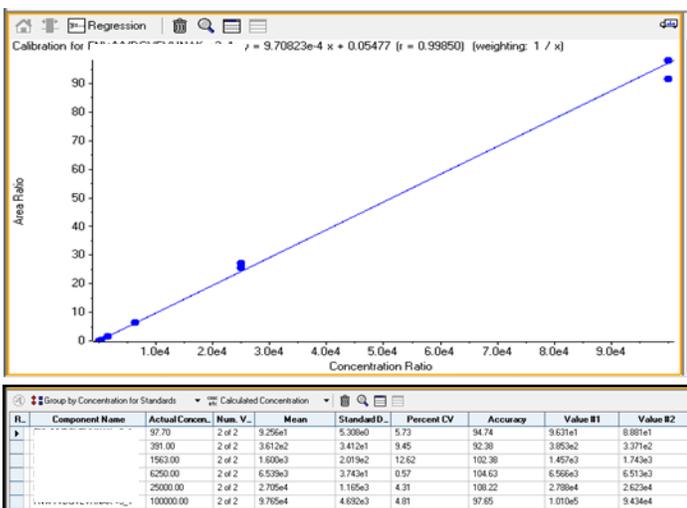


图7. 各批次大鼠给药实验的标准曲线和标准曲线结果统计。

图8为采用两种检测方法测定各个时间点的平均血药浓度 (四只大鼠)。大鼠给药研究表明两种分析方法的结果具有出色的一致性 (小于15%)。实验结果表明，免疫亲和LC-MS方法的结果与ELISA结果良好吻合，同时，免疫亲和LC-MS方法具有线性范围宽，无需提前稀释样品的优势。另外，虽然本实验中没有涉及，但是LC-MS方法还具有可以同时测定同一样品中多个抗体药物的能力。

总结

全自动样品前处理对于减小用于特征肽段定量的免疫亲和样品前处理方法的瓶颈非常重要。自动化方法不只能改善多步骤操作的日间重现性和不同操作者间的重现性，还能帮助科学家节省精力，使他们更专注于实验的关键点和数据分析。

本文介绍了一种全自动免疫亲和样品前处理和特征肽段定量工作流程，并成功应用于单抗药物的给药实验中。实验结果表现出了高灵敏度，高准确性和高精密度。采用ELISA和免疫亲和LC-MS方法同时分析实际给药实验样品的结果具有很高的 consistency，差别小于15%。该结果表明自动化BioBA方案是一种耐用且准确的单抗定量方法。BioBA方案包括Biomek FX自动化流程和可即时使用的BioBA耗材试剂盒，该方法可以提高通量，加速生物药开发流程。

致谢

我们非常感谢QPS在动物给药研究、样品采集和ELISA试验中给予的帮助。

仅用于科研，不用于诊断过程。



Answers for Science. Knowledge for Life.™

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2015 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-4372-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-24197200

传真：021-24197333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市体育西路109号
高盛大厦15C

电话：020-85100200

传真：020-38760835

微博：@SCIEX