

## 监测Sartorius Ambr 250高通量生物反应器系统样品中的完整分子量糖谱和消耗培养基代谢物，为上游工艺开发提供支持

---

Yun Alelyunas, Charles Prochaska, Clint Kukla, Caitlin Dunning, Caitlin Hanna, Mark Wrona

Waters Corporation, Sartorius Stedim

---

### 摘要

本应用纪要详细介绍了如何使用BioAccord™ LC-MS直接分析完整单克隆抗体(mAb)、细胞培养基(CCM)营养成分，以及消耗培养基的代谢物谱。细胞培养物样品采集自一项培养基和补料优化研究中使用的Ambr® 250高通量系统。样品前处理操作包括过滤和蛋白A纯化，使用Andrew+™移液机器人和OneLab™自动化工作流程完成。通过报告每个样品的主要糖型产品质量属性和详细的代谢物谱，提供了生物反应器的全面概览，这是传统分析仪无法实现的。

### 优势

- 在同一个分析平台上即可快速测定完整游离寡糖分布及监测细胞培养基营养成分和代谢物
- 完整mAb和细胞培养基代谢物LC-MS分析的样品前处理均可采用自动化的一步方案快速完成
- 符合法规要求的单一信息学套装，支持数据采集、数据审查、未知物解析、多变量数据分析和自定义报告

### 简介

---

监测Sartorius Ambr 250高通量生物反应器系统样品中的完整分子量糖谱和消耗培养基代谢物，为上游工艺开发提供支持

在蛋白治疗药物的生产过程中，我们需要常规监测多项关键质量属性(CQA)，例如蛋白质浓度（以IgG效价(g/L)表示）和蛋白质翻译后修饰（PTM，以修饰百分比表示）。除此之外，还可以对营养成分和代谢物进行常规监测，因为它们对蛋白质生产、细胞活力和生长非常重要，有助于我们理解和制定关键工艺参数(CPP)。CQA和CPP分析通常采用不同的分析仪器通过单独的LC-MS运行分别完成。本应用纪要介绍了使用Andrew+移液机器人通用、快速且简单的样品前处理方案，结合BioAccord LC-MS系统的精简分析步骤，同步完成这两种分析的优势。分析流程概览如图1所示。本文总结了代表性的样品数据，样品采集自一项使用Sartorius Ambr 250高通量多并行生物反应器平台进行的优化实验。各个工作流程的详细信息可参见沃特世之前发布的应用纪要<sup>1,2</sup>。

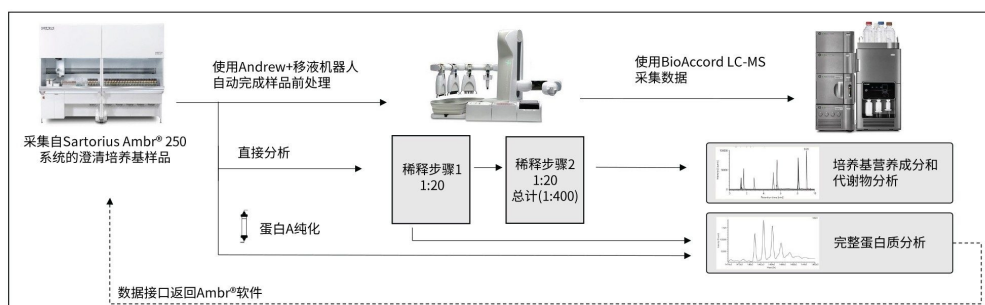


图1.分析完整蛋白质、细胞培养基营养成分和消耗培养基代谢物的自动化样品前处理和BioAccord LC-MS分析流程示意图

## 实验

### 样品前处理

使用Ambr 250高通量多并行生物反应器系统（美国赛多利斯）实施用CHO细胞生产mAb的工艺优化实验。并行监测起始培养基、补料和接种密度都不相同的5个生物反应器，在培养的第4、6、8、10和12天采集样品（图2）。







					
	生物反应器1	生物反应器2	生物反应器5	生物反应器8	生物反应器10
接种	低	高	低	低	低
培养基	A	A	A	B	B
补料计划	1	1	2	1	2

图2.完整蛋白质和培养基监测研究的采样实验条件汇总

细胞培养基样品采样后立即离心分离，然后使用0.22 μm针式过滤器（Sartorius Minisart® PES 15 mm, P/N: 1776D-Q）过滤。使用Andrew+移液机器人（美国沃特世公司），在350 μL 96孔板中将澄清的样品按1:20 (V/V)连续稀释，供完整蛋白质分析使用，再按1:20进一步稀释（总共1:400 (V/V)），供培养基消耗分析使用。所用稀释剂为含有0.1 μM 3-氯酪氨酸内标的0.1%甲酸(FA)。使用完整蛋白质分析工作流程分析最初按1:20 (V/V)稀释的样品。随后使用细胞培养基筛选工作流程分析按1:400稀释的样品。制备蛋白A纯化样品时，额外取120 μL样品至Andrew+移液机器人，上样至经过清洗和活化的蛋白A树脂。使用Andrew Extraction+设备先清洗样品，然后用100 mM甘氨酸洗脱<sup>3</sup>。分析前按1:20 (V/V)进一步稀释样品。

## 方法条件

下表所列的LC-MS参数采用相同的流动相运行完整蛋白质分析和细胞培养基分析的反相色谱方法，大大简化了LC-MS系统的日常操作和维护。

## 完整蛋白质分析的LC-MS条件

LC-MS系统	装配ACQUITY Premier BSM的BioAccord™ LC-MS系统				
色谱柱	ACQUITY Premier™ BEH C4蛋白分析专用柱, 300 Å, 1.7 µm, 2.1 x 50 mm (P/N 176005107)				
柱温	80 °C				
样品温度	10 °C				
进样体积	2 µL				
TUV波长	280 nm				
流速	0.4 mL/min				
流动相A	0.1% FA水溶液				
流动相B	90% ACN/10% IPA/0.1% FA				
梯度表	<b>时间 (min)</b>	<b>流速 (mL/min)</b>	<b>%A</b>	<b>%B</b>	<b>曲线</b>
	0	0.4	95	5	6
	1.0	0.4	95	5	6
	3.5	0.4	15	85	6
	3.7	0.4	5	95	6
	4.3	0.4	5	95	6
	4.5	0.4	95	5	6
	5.0	0.4	95	5	6
电离模式	全扫描				
质量范围	高(400~7000 m/z)				
极性	正离子				
锥孔电压	70 V				
毛细管电压	1.5 kV				
扫描速率	5 Hz				
脱溶剂气温度	550 °C				
智能数据捕获	关				
锁定质量数校正模式	标准				
MS事件表	0~0.8 min, 3.5 min转移至废液				
LC-MS软件	waters_connect 3.1或更高版本				
信息学软件	Intact Mass应用程序和UNIFI应用程序				

## 培养基营养成分和代谢物分析的LC-MS条件

LC-MS系统	装配ACQUITY Premier BSM的BioAccord LC-MS系统				
色谱柱	ACQUITY Premier HSS T3色谱柱, 1.8 $\mu\text{m}$ , 2.1 x 150 mm (P/N 186009469)				
柱温	40 °C				
样品温度	10 °C				
进样体积	2 $\mu\text{L}$				
流速	0.25 mL/min				
流动相A	0.1% FA水溶液				
流动相B	90%ACN/10%IPA/0.1%FA				
梯度表	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
	0	0.25	100	0	6
	1.5	0.25	100	0	6
	6	0.25	95	5	6
	9	0.25	60	40	6
	14	0.25	5	95	6
	17	0.25	5	95	6
	17.1	0.25	100	0	6
	20	0.25	100	0	6
模式:	全扫描*				
质量范围	小分子(50~800 m/z)				
扫描速率	5 Hz				
极性	正离子				
	锥孔电压	20 V			
	裂解锥孔电压	60~80 V			
	毛细管电压	1.00 kV			
极性	负离子				
	锥孔电压	15 V			
	裂解锥孔电压	50~70 V			
	毛细管电压	0.8 kV			
脱溶剂气温度	550 °C				
智能数据捕获	开				
锁定质量数校正模式	标准				
采集时间窗口	开始时间 = 0 min, 结束时间 = 14 min				
MS事件表	0~0.8 min, 14 min转移至废液				
LC-MS软件	waters_connect 3.1或更高版本				
信息学软件	UNIFI - 使用细胞培养基筛选工作流程进行精确质量数筛查				

\*还可选用包括碎片的全扫描模式，这在表征新的周期时非常有用。

## 结果与讨论

### 第I部分. 完整蛋白质分析

#### 1. 测定澄清细胞培养基的游离寡糖分布

使用高通量LC-MS方法直接分析蛋白质修饰和游离寡糖分布，分析前无需对样品进行任何亲和纯化处理。所用的有机流动相含有10% IPA，与细胞培养基代谢物分析所用的流动相相同，简化了在同一系统上进行完整蛋白质分析和培养基分析时的流动相制备工作。经对比，使用100% ACN和90% ACN/10% IPA流动相得到的色谱结果相似（见附录）。图3A为使用完整蛋白质分析方法分析代表性培养基样品得到的总离子流色谱图(TIC)，图中可见轻链峰、完整mAb峰和一个比较宽的基质峰。提取离子流色谱图(XIC)显示完整mAb的峰特征明确，且后洗脱基质干扰非常小，实测 $m/z < 1500$  Da（图3A）。图B~D中的质谱图与通常观察到的轻链和完整mAb电荷峰簇一致。

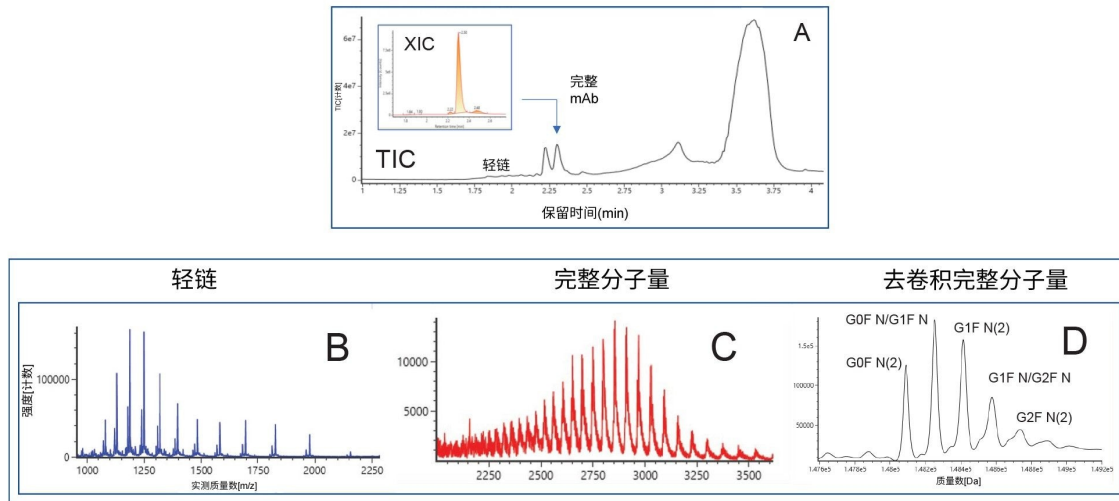


图3.(A) 直接对细胞培养基样品进行完整蛋白质分析得到的代表性质谱图。插图为完整mAb  $m/z$  2000~4000 Da范围内的XIC。(B)轻链的实测质谱图，(C)完整mAb的实测质谱图，以及(D)标记了主要糖型的完整mAb去卷积质谱图。

采用MaxEnt1去卷积算法计算分子的平均质量数，如图3D所示。根据用户输入的完整mAb预期质量数( $m/z$ )和可能的修饰列表，从去卷积质谱图中鉴定出了几种糖基修饰。对于本研究的mAb产物，共检测到5种主要糖型：G0F N(2)、G0F N/G1F N、G1F N(2)、G1F N/G2F N和G2F N(2)。图4显示了每个样品中每种游离寡糖所占百分比的叠加条形图。该信息被导回了Ambr<sup>®</sup>软件，以便使用数据接口对mAb产物进行快速产品质量评估。Ambr软件中的数据界面示例见附录B。

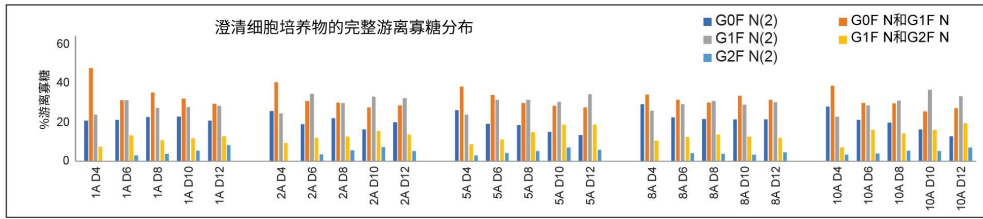


图4.分析澄清细胞培养基样品后确定的游离寡糖百分比，图中显示了不同生物反应器中每种游离寡糖随时间推移而变化的叠加条形图。

## 2. 测定蛋白A纯化样品的游离寡糖分布

本研究还测定了采用蛋白A纯化方法制备的样品的蛋白质修饰和游离寡糖分布。蛋白A纯化处理去除了基质离子和大部分工艺相关杂质，得到“纯”mAb供分析使用。总离子流色谱图和UV色谱图中都只观察到一个比较大的mAb峰（图5）。基于MaxEnt1去卷积结果确定蛋白质修饰和游离寡糖分布。图5所示的游离寡糖分布(%)与经过澄清处理但未经蛋白A纯化的样品（图4）测得的结果相似。以上数据表明，使用澄清培养基样品直接测定糖谱是可行的，有助于简化样品前处理工作、降低成本和节约时间，进而提高整个过程的效率。

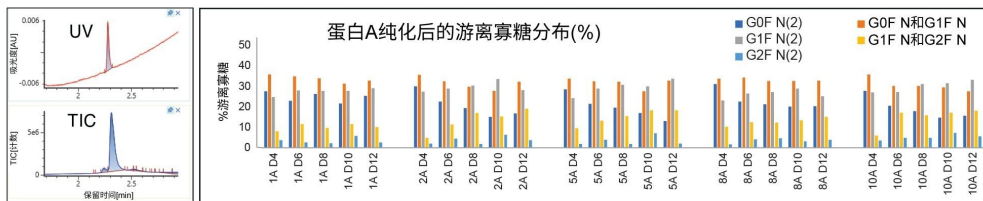


图5.（左图）经蛋白A纯化处理的培养基样品的代表性UV色谱图和MS TIC色谱图。（右图）分析经蛋白A纯化处理的样品后确定的游离寡糖百分比，图中显示了不同生物反应器中每种游离寡糖随时间推移而变化的叠加条形图。

## 3. MS/UV响应值与Cedex Bio HT测量值的相关性

我们将实验测得的UV和MS响应与Cedex Bio HT仪器测得的mAb效价互相关联。UV响应基于280 nm波长下的峰面积计算。MS响应通过加总实测质谱图中9种丰度最高的电荷态的XIC信号来计算。有关完整蛋白质定量分析的详细信息，请参阅沃特世应用纪要<sup>4</sup>。图6显示了UV和MS响应随生物反应器和采样天数变化的趋势图。UV和MS响应



图的数据趋势类似，说明在有可用标准品的情况下，这两种响应均可用于效价评估。与效价测定结果的相关性分析显示，基于MS响应的相关系数 $R^2=0.954$ ，基于UV吸光度的相关系数 $R^2=0.902$ 。MS数据的相关系数稍好一些，似乎是由于MS的选择性尽可能减少了基质和其他干扰，因此方法专属性更高（尤其是在低效价下）。总体而言，BioAccord的UV和MS响应与测得的IgG效价呈高度相关性，可以纳入糖谱分析结果。采用该条件可实现快速分析，表明这种LC-MS方法能够支持工艺监测所需的通量。

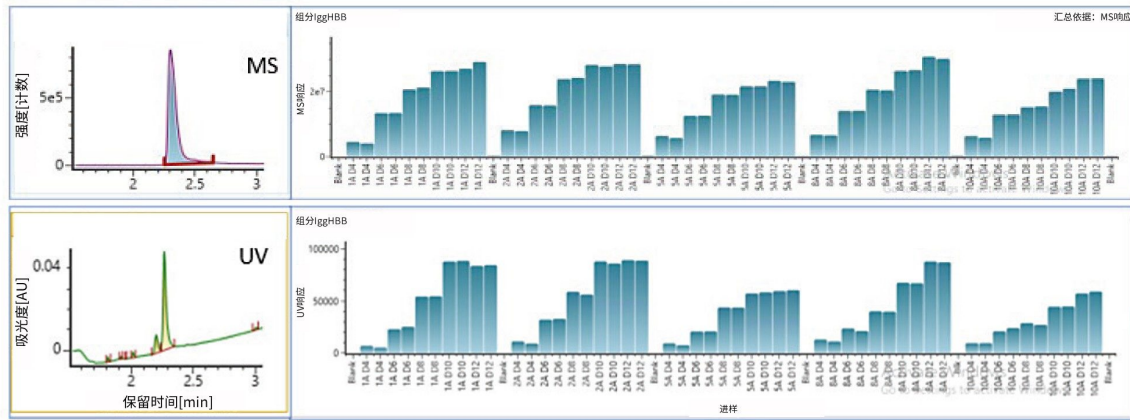


图6.不同生物反应器的MS响应或UV吸光度随时间推移而变化的叠加条形图。每个样品重复分析两次，总体重复性<5%。

## 第II部分.细胞培养基营养成分和代谢物分析

本研究还应用培养基消耗分析工作流程分析了生物反应器样品。该工作流程的详细介绍请参阅我们之前的一篇应用纪要<sup>2</sup>。该分析采用最近提出的小摩尔质量采集范围(50~800  $m/z$ )，与之前的方法相比，正离子和负离子采集的检测器灵敏度均提高了5~10倍。总共检测到约100种营养成分和代谢物。在这些样品中鉴定出的化合物分布按化合物类别分了组，如图7所示。图8中的代表性趋势图显示了不同生物反应器中的培养基随时间的变化。在本研究中，所有氨基酸都使用AA细胞培养物标准品溶液（沃特世P/N：186009300 <<https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186009300-amino-acid-cell-culture-standard-kit.html>>）进行了校准，因此测得的氨基酸浓度以mM为单位报告（见图8上图的色氨酸示例）。对于检出的所有其他化合物，均计算了相对响应值用于分析趋势（图8下图）。如果需要，还可以绘制适当的标准曲线来定量其他组分。所有数据均可导出用于其他报告。



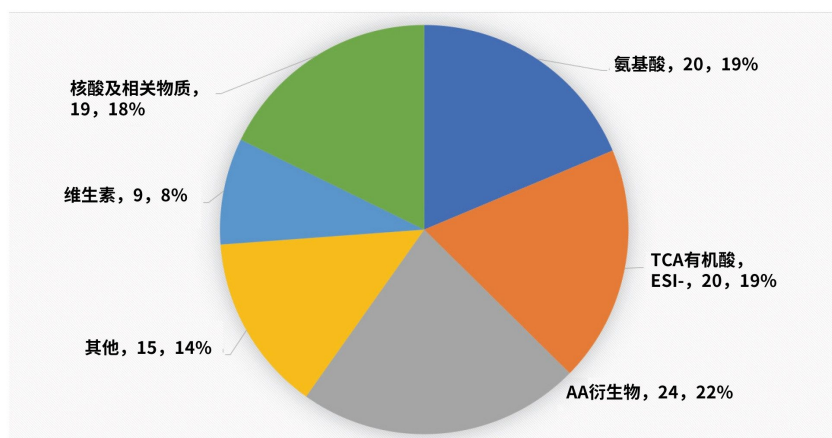
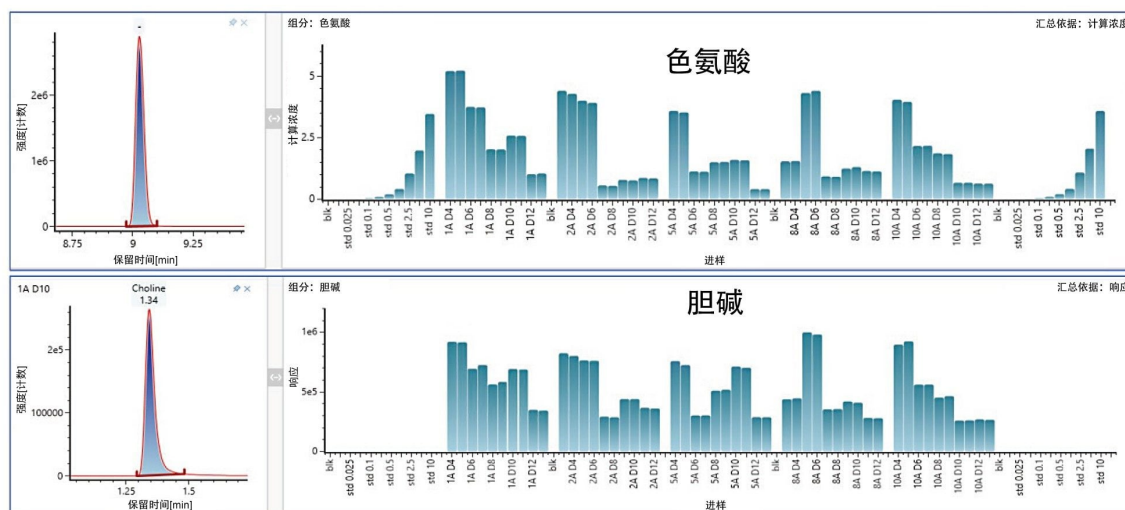


图7.消耗培养基中观察到的化合物，表示为检测到的化合物的分布百分比和数量，按化合物类别分组。



---

## 结论

本文介绍了一套自动化样品前处理方案和一种LC-MS分析方法，可用于分析完整蛋白质、效价、细胞培养基营养成分和消耗培养基中的代谢物。BioAccord LC-MS系统与Andrew+移液机器人相结合，能够快速处理采集自Ambr 250高通量多并行生物反应器的PD样品，并提供高质量结果。该方法的亮点和功能包括：

- 使用Andrew+移液机器人自动完成完整mAb分析和消耗培养基组分分析的样品前处理
- 完整mAb分析中的IgG滴度测定和糖谱分析既可以直接使用澄清的细胞培养物样品，也可以使用经蛋白A纯化处理的样品
- 采集自生物反应器的细胞培养基经澄清处理后可直接用于培养基营养成分分析和代谢物分析
- waters\_connect数据接口可建立连接，将糖谱分析结果无缝传回Ambr软件
- BioAccord LC-MS系统简单易操作、设计紧凑，可提供质量出色的数据，充分满足实验室的通量需求

BioAccord LC-MS系统有助于工艺开发实验室开发高水准的工艺监测和产品质量控制分析方法，适时为工艺优化提供支持。

---

## 参考资料

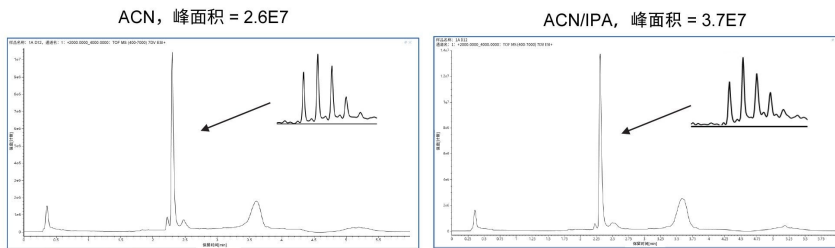
1. H Shion, P Boyce, SJ Berger, YQ Yu. INTACT Mass™ - 一款用于生物治疗药物快速质量数确认和纯度评估的通用waters\_connect™应用程序. 沃特世应用纪要. [720007547ZH](#). 2022.
2. YW Alelyunas, MD Wrona, W Chen. 使用搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统监测生物工艺开发所用细胞培养基中的营养成分及代谢物. 沃特世应用纪要. [720007359ZH](#). 2021.
3. SM Koza, CM Hanna AHW Jiang, YQ Yu. 使用生产级的蛋白A亲和色谱树脂进行自动化高通量分析级单克隆抗体纯化. 沃特世应用纪要. [720007861ZH](#). 2023.
4. YW Alelyunas, H Shion, MD Wrona. High Sensitivity Intact Monoclonal Antibody (mAb) HRMS Quantification. Waters Application Note. [720006222](#). 2018.

---

## 附录

### A. 使用100% ACN与90% ACN/10% IPA得到的完整蛋白质色谱图比较。

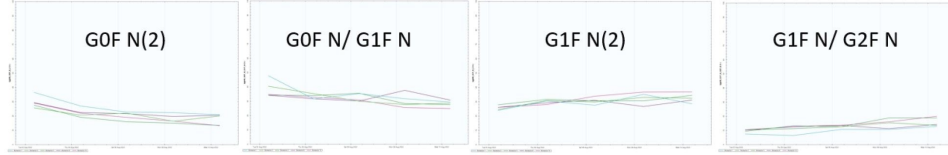
在本研究的完整蛋白质分析方法中，LC-MS有机流动相B由90%乙腈(ACN)和10%异丙醇(IPA)组成，细胞培养基营养成分分析和代谢物分析也使用这种流动相。传统的完整蛋白质分析通常使用仅由100% ACN组成的有机流动相B。我们比较了在ACN中添加10% IPA作为流动相B与使用100% ACN作为流动相B对分离的影响。图A中的结果表明，添加10% IPA对色谱性能和实测质谱图的影响非常小。峰面积比较表明，加入IPA可使被分析样品的峰面积增加30%以上，对数据质量可能有利。峰面积增加可能是由于IPA有提高电离效率的潜力。综上，本研究选择了90% ACN/10% IPA进行完整蛋白质分析，以简化LC-MS系统的日常操作和维护。



图A.使用100% ACN（左图）和90% ACN/10% IPA（右图）作为有机流动相B，对澄清的细胞培养基样品进行完整mAb分析得到的提取离子流色谱图比较。

### B.使用数据接口输出得到的Ambr软件数据界面示例

使用Intact Mass应用程序采集数据后，可以将所得糖型数据导出至Ambr软件。图B是一个示例，显示了不同生物反应器中的糖型百分比随培养时间（天）的关系图的叠加图。



图B.不同生物反应器中主要糖基修饰百分比随时间变化的叠加图的数据接口界面。

## 特色产品

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

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

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

UNIFI筛查平台解决方案 <<https://www.waters.com/134682903>>

waters\_connect <[https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters\\_connect.html](https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters_connect.html)>

<https://www.andrewalliance.com/>

Andrew+移液机器人 >

720008042ZH, 2023年9月



© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

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