

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

Yun Alelyunas, Mark Wrona, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

在生物治疗药物工艺开发中，细胞正常生长和生物治疗药物生产所需的必要构件和营养成分由细胞培养基溶液提供。监测培养基成分及代谢物可提供有关细胞生长、生物治疗药物滴度和产品质量的信息。BioAccord LC-MS系统在产品质量分析中早有应用，例如完整蛋白分析、Peptide MAM、游离寡糖分析以及寡核苷酸分子量确认。本应用将利用BioAccord系统监测细胞培养基中的营养成分及代谢物。方法包的内容为：全面的反相LC-MS方法、含有200多种化合物的数据库；用于数据审查的简单、分步工作流程（包括趋势图）；一套未知物筛选工具；多变量数据分析工具；报告模板。该方法已在克隆选择和工艺优化的培养基分析中有所使用。

优势

- 色谱柱和UPLC系统硬件均采用ACQUITY Premier技术，色谱性能出色
- BioAccord LC-MS系统简单易用，轻松获取丰富的全扫描HRMS数据
- 结合包含200多种化合物的数据库，包括氨基酸、维生素、核酸/碱基、核苷酸、代谢物以及生物工艺开发中关注的其他化合物

- 精简的功能和分门别类的工作流程，有利于实施分步数据审查
- 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、报告模板和多变量数据分析

简介

在生物治疗药物工艺开发中，细胞正常生长和生物治疗药物生产所需的必要构件和营养成分由细胞培养基溶液提供。培养基溶液是包含数百种化合物的复杂混合物，其中包括起始化学物质以及在生产周期中形成的代谢物。培养基的组成在细胞生长周期中不断变化。已有研究表明，监测培养基成分及代谢物并确保这些物质保持在合理范围内，对于细胞生长、生物治疗药物滴度和产品质量都有影响¹。常规监测选定的关键培养基成分，已成为生物工艺流程的一部分。生物制造行业的生物工艺开发和优化领域对全面监测培养基中存在的所有成分及代谢物有越来越高的需求。

本应用纪要介绍了一种详细的反相LC-MS方法和全面的工作流程，用于监测细胞培养基中的化合物（图示1）。该研究采用搭载ACQUITY Premier技术的BioAccord系统，这是一套紧凑、具有自动优化功能的LC-HRMS平台，拓展了LC-MS技术的易用性，无论是LC-MS专家还是新用户，都能获得一致的高质量结果。HRMS可提供丰富的全扫描数据集用于分析物研究，并且不需要像三重四极杆MS²一样优化母离子-子离子通道，方法开发更简单。

ACQUITY Premier液相色谱平台由低吸附UPLC系统和采用MaxPeak高性能表面(HPS)的色谱柱组成³。近期的文献表明，ACQUITY Premier液相色谱系统有助于改善细胞培养基中多种化合物的峰对称性并增强其信号，例如TCA酸⁴、维生素⁵、核酸/碱基和核苷酸⁶。本文所述工作流程包括：含200多种化合物的数据库、用于数据审查的分步指南、未知物的结构解析、多变量数据分析/批次比较和报告。本文介绍了工作流程中各步骤的详细信息以及细胞培养基分析示例。

实验

样品描述

商购的培养基溶液用水按1:100 (V/V)的比例稀释。培养基溶液用水或含0.1%甲酸的水溶液按1:200 (V/V)的比例稀释。

数据管理

LC-MS软件:	waters_connect
信息学软件:	waters_connect基础软件包, 搭载UNIFI 1.9 SR13

结果与讨论

一般方法讨论

使用搭载ACQUITY Premier液相色谱系统和HSS T3色谱柱的BioAccord LC-MS开发细胞培养基化合物分析应用。该系统具有优异的色谱性能, 使不同类别的化合物中均可获得窄而对称的峰。图1为利用该方法在正离子数据采集模式下得到的化合物提取离子流色谱图(XIC)叠加图。各代表性化合物的XIC见附录。图1还显示了同分异构体化合物亮氨酸/异亮氨酸以及柠檬酸/异柠檬酸之间优异的基线分离。采用全扫描或碎裂模式下的全扫描数据采集模式分析样品, 全扫描建议在常规监测中使用, 尤其是分析大量样品时。其他情况首选碎裂模式下的全扫描, 有助于解析化合物并减少外部ChemSpider数据库搜索中的假阳性结果。

根据基底细胞培养基溶液IMDM (ext.Sigma Aldrich) 100倍稀释浓度的6次重复进样结果评估系统性能。表1汇总了整个洗脱时间窗口内代表性化合物的保留时间、质量数误差和峰响应的重现性。结果表明, 保留时间(漂移<0.02 min)、质量数误差(<5 ppm)和峰响应(<5%)具有优异的重现性, 这些参数均与化合物洗脱时间无关。该系统还具有出色的灵敏度, 检测限范围低至亚ng/mL至ng/mL级。良好的灵敏度和重现性以及其它属性使BioAccord系统成为细胞培养基化合物监测的合适平台。

化合物数据库

创建一个包含200多种化合物的UNIFI数据库, 以便在分析中鉴定和跟踪这些化合物。使用确证化合物标准品推导并确认各化合物的保留时间和碎片离子数据。每种化合物在数据库中按照以下亚类进行标记: 氨基酸、氨基酸衍生物、有机酸、维生素、核酸/碱基和核苷酸等。还标记出每种化合物的首选电离模式, 即ESI⁺或ESI⁻。标记信息

可用于在数据库搜索、将化合物导入分析方法和/或在建立工作流程步骤时创建筛选器的过程中检索化合物亚类（见下文）。化合物类别的分布及数据库条目示例如图2所示。

工作流程引导的数据审查

生物工艺开发项目通常会生成许多需要分析的细胞培养基样品。在每个样品中，生物工艺工程师想要获取信息以供审查的化合物种类可能会超过100种。因此，必须拥有一个精简的数据审查流程，轻松提取所需信息，以加快开发过程。UNIFI信息学系统中提供的工作流程功能旨在根据功能、类别和/或其他标准对处理后的数据进行直接审查和分步审查。细胞培养基分析的缺省数据审查工作流程如图3所示。创建涵盖样品运行列表、化合物类别和样品间比较的几个关键步骤，以展示如何在UNIFI中采集并显示信息。化合物审查可通过进样间趋势图、叠加图和/或列表信息来管理。还可自定义工作流程，轻松添加特定步骤以涵盖目标化合物、关键化合物对和/或特定的转化途径。缺省工作流程中包括胆碱途径示例，其中显示了三种相关化合物：胆碱、磷酸胆碱和甘油磷酸胆碱。这些化合物随培养时间和不同生物反应器的变化通过叠加的趋势图一览无余。“未知化合物”步骤是所有未鉴定化合物的集合，有助于合并值得进一步研究/解析的化合物数据。工作流程可以导出或导入，以便与其他waters_connect平台/数据处理工作站共享。

细胞培养基分析结果图展示

图4为市售基底细胞培养基溶液DMEM (ext.Sigma Aldrich)的叠加色谱图。DMEM包含浓度范围为 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 级至 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 级的氨基酸和维生素。该分析将培养基样品用水稀释100倍，进样 $2 \mu\text{L}$ 。利用该系统获得了优异的色谱性能，检出了所有化合物。该样品对于优化LC-MS分离条件非常有用。

在分析来自上游工艺开发中生物反应器的培养基溶液时，跟踪培养基中特定成分随培养时间和/或不同生物反应器的丰度变化很有用。在长达12天内以6个时间点采集来自12个生物反应器的样品组，并利用本方法进行分析。图5显示了来自所有生物反应器和所有采样日期的胆碱的总体趋势图。下面每个分组趋势图的柱形图分别代表一个生物反应器的时程。通过该视图可以清楚观察到工艺开发过程中细胞培养基成分的变化。

未知物解析

生物工艺过程中细胞培养基营养成分代谢是一个复杂的过程。在生物治疗药物生产过程中形成但未能通过数据库

匹配鉴定的代谢物仍然值得关注，尤其是当它们关系到产品滴度、产品质量属性或工艺参数时。图6显示了细胞培养基中一种未知化合物的结构解析示例。该示例在 m/z 427.0950处检测到丰度最高的未知化合物。ChemSpider数据库搜索返回了几个匹配结果，包括目标化合物半胱氨酸-谷胱甘肽二硫化物（图6）。随后使用半胱氨酸-谷胱甘肽二硫化物的确证标准品确认了该化合物的鉴定结果。然后将该化合物添加至分析方法的组分表中以备将来应用。添加该化合物后重新处理数据，得到的结果揭示了整个时程中该化合物在不同生物反应器内的丰度变化。最后，建议采用“碎裂模式下的全扫描”进行采集，以同时采集母离子数据和碎片离子数据。通过这种方式采集的碎片离子数据将有助于鉴定并减少数据库搜索中的假阳性结果。

多变量数据分析，揭示细胞培养基样品之间的差异

UNIFI信息学系统中提供另一种基于Umetrics EZ-info软件的多变量数据分析工具。EZ-info拥有一种强大的方法来分析和执行大量数据集的批量比较。例如，用于比较具有相同/不同细胞系的多个生物反应器的数据集、用于比较同一生物反应器中早期培养时间与晚期培养时间的培养基成分的数据集，或用于比较相同培养时间点不同生物反应器的数据集，以及用于许多其他比较的数据集。图7显示了对多天采集自12个生物反应器的样品进行多变量数据分析后的两个示例输出。根据质量范围、保留时间和响应进行初始化合物选择后，选定的化合物将自动传输至EZ-info。PCA图提供了不同生物反应器和不同培养基采样日期之间差异的总体视图。可生成得分图或S-plot以显示一对数据集之间的差异，本例显示所有生物反应器第0天和第16天的差异。然后可以选择第16天下调的化合物并将其发送回UNIFI进行化合物鉴定。这种数据处理方法使用户可以快速确定与样品间差异相关联的生物标志物。

报告

提供缺省报告模板，便于汇总和展示细胞培养基分析结果。报告模板大大缩短了与合作者或样品提供方交流分析结果所需的时间。报告由以表格(.xls)格式导出的数据和以PDF/XPS格式导出的文本/图形组成。文本/图形报告包含的信息包括文件名、LC-MS方法详细信息、样品运行列表、以单个化合物或多种化合物叠加显示的柱形图或折线图。还可以添加公司徽标图片。可通过用户友好的报告模板工具自定义或编辑报告，并可通过修改现有报告或添加额外的报告对象来生成新的报告模板。

结论

本研究开发出基于BioAccord系统和UNIFI信息学平台的综合LC-MS工作流程用于非靶向细胞培养基分析。BioAccord LC-MS系统具有易于设置、长期性能稳定性出色和操作简便的优势。该平台使LC-MS经验有限的生物工艺工程师能够快速、轻松地运行和处理大量细胞培养基样品，并为他们提供有关培养基添加剂以及在生物工艺开发过程中所形成代谢物的丰富、深入的信息。所述方法基于反相分离原理开发，可涵盖细胞培养基中存在的大多数成分。Waters ACQUITY Premier产品（液相色谱系统和色谱柱）所采用的MaxPeak HPS技术可为各种化合物类别提供更高的色谱性能。此外，将Premier技术和化合物数据库纳入分析方法中，得到了一种高性能平台和端到端工作流程，涵盖细胞培养基分析所需的关键步骤，有利于LC-MS技术在生物工艺开发领域的应用。该方法已成功用于分析起始培养基溶液以及来自上游工艺开发和优化中生物反应器的废培养基样品。

参考资料

1. Traustason, B.*et.al.*Amino Acid Requirements of the Chinese Hamster Ovary Cell Metabolism during Recombinant Protein Production, doi: <https://doi.org/10.1101/796490> <
<https://doi.org/10.1101/796490>> .
2. Wang, X.; Liu, Y.; Wang, H.; Jia, Z. Targeted Quantification of Cell Culture Media Components by LC-MS, Waters Application Brief, [720006759EN](#), 2019.
3. Lauber, M.; Walter, T. H.; DeLano, M.; Gilar, M.; Boissel, C.; Smith, K.; Birdsall, R.; Rainville, P.; Belanger, J.; Wyndham, K. Low Adsorption HPLC Columns Based on MaxPeak High Performance Surfaces.Waters White Paper, [720006930EN](#) <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006930en.pdf>> , 2020.
4. Smith, K. M.; Rainville, P. 利用MaxPeak高性能表面提高三羧酸循环相关分析物的分离效果和回收率.沃特世应用纪要, [720006727ZH](#), 2020年修订.
5. Yang.J.; Rainville, P. D. Rainville.应用MaxPeak高性能表面技术改进B族维生素的LC-MS/MS分析, 沃特世应用纪要, [720007264ZH](#), 2021. <<https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2021/720007264/720007264-en.pdf>>
6. Berthelette, K.D.; Shiner, S.; Walter, T.H.; Nguyen, J.M.; Turner, J.E. Improved Separation of RNA Nucleotides, Nucleosides, and Nucleobases on Atlantis Premier BEH Z-HILIC Columns, Waters Application Note, [720007324EN](#), 2021.

致谢

本文作者由衷感谢以下沃特世同事在本应用纪要的开发和写作过程中所做的贡献：XiaoXia Wang、Kerry Smith、Giorgis Isaac、Jinchuan Yang、Jeff Goshawk、Andy Baker、Steven Lai、Gitte Barknowitz、Steve Preece、Guillaume Bechade、Xiao Dong、Heidi Gastall等。

附录

数据库中的化合物提取离子色谱图(XIC)示例。

特色产品

搭载ACQUITY Premier的BioAccord LC-MS系统 <

<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135087537>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

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

720007359ZH, 2021年9月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.