

生物工艺中的LC-MS分析：自动化驱动的产品质量属性分析和营养成分监测

Mark Wrona, Yun Alelyunas, Lindsay Collins, Elizabeth Embrey, Guillaume Mignard, Andrea Nardinocchi, Adrien Pegaz-Blanc, Jurgen Sanes, Caitlyn Da Costa

Waters Corporation

摘要

集成和改进自动化有助于工艺团队及早获取重要的PQA信息，以及通过培养基监测改变工艺的相关信息。沃特世最近更新了生物工艺Walk-Up解决方案¹，旨在帮助生物工艺团队更快获取更多分析信息。采用Portal的生物工艺Walk-Up解决方案包含以下主要功能和更新：

- 简化样品处理流程：自动化流程加快了样品前处理，减少了人工工作量和潜在错误。快速处理样品，直接供LC或LC-MS分析。
- 提高灵活性：一体化平台提供了自动化样品前处理、数据采集和报告功能。硬件方面的最新改进包括LC和LC-MS直接进样功能、自动化样品板密封，以及添加蛋白A和过滤自动化方案。
- 软件更新：waters_connect™信息学解决方案现在可以分析并报告低分子量物质和高分子量物质（LMWS/HMWS/聚集体）的百分比，还包括多项专为生物工艺客户打造的其他更新。
- 在工艺流程早期改进分析方法，找出理想的细胞系和条件，就能确保治疗药物生产的安全性、有效性和一致性，更快获得结果并缩短上市时间。

优势

- 高通量：使用Andrew+™移液机器人直接进样至由OneLab™软件协调的BioAccord™ LC-MS系统中，自动完成样品前处理
- 结果一致：支持蛋白A、澄清和稀释功能、自动样品板密封以及立即将样品板加载到冷却的样品管理器中，可以减少误差和差异性，并缩短分析运行时间
- 互联报告：改进了糖型、LMWS、HMWS或其他汇总计算的报告功能，现支持自动报告至Ambr®生物反应器系统²

简介

自动化在提高生物工艺产品质量属性(PQA) LC-MS分析的效率和准确度方面发挥着关键作用。在生物制药生产中，PQA测定至关重要，因为它们可确保治疗产品的安全性、有效性和一致性。将自动化集成到LC-MS工作流程中，可以在工艺流程早期获取关键PQA信息。各种LC和LC-MS分析的样品前处理流程不仅非常耗时、需要培训，并且常常成为推广应用的限制因素。增加自动化功能后，可快速处理样品并直接供LC或LC-MS分析，大幅减少人为干预，减少可能在数据生成过程中出现的误差和差异性。

本应用纪要介绍了生物工艺Walk-Up解决方案在既往系统更新的基础上引入的改进和总体功能¹。本应用纪要概述了以下内容：

- 硬件改进：样品板密封；将制备好的样品/样品板直接插入LC或LC-MS系统；能够执行萃取/过滤。
- 方案优化：使用Magnet+模块进行基于磁珠的捕获和释放，完成蛋白A (ProA)净化；使用Extraction+真空过滤模块澄清样品；所有方案中均可使用新增的样品板密封功能。
- 工艺流程团队的软件更新：能够在SEC分析中报告LMWS、HMWS物质；能够在电荷异构体LC-MS分析中报告酸性/碱性物质；利用方法设置改进自动化处理流程。
- LC-MS方法更新：全新的九分钟快速细胞培养基方法，数据库全面更新。
- 数据集成/可视化改进：可视化工具，支持外部数据包和控制软件。



图1.带密封和过滤功能的Andrew+移液机器人与BioAccord LC-MS系统通过ACQUITY™ Automation Portal样品板装置连接的系统概览。还支持其他Andrew+组件，包括Andrew+ BenchHub、Andrew+活动旋转系统(ARS)和Plate Sealer+。

综上所述，这些自动化和平台功能可在所需的样品前处理结束时自动完成更多分析、解析和报告工作，从而减少分析人员的交互，更快获得结果。

实验

LC和LC-MS方法的详细实验信息可参见配套的应用纪要，其中概述了各PQA或细胞培养基代谢物分析的具体信息^{3,4,5}。

Andrew+移液机器人系统详细信息

如需Domino和消耗品的完整/最新列表，请参阅系统解决方案文档和OneLab数据库方案（[OneLab方案：完整质量数和细胞培养基工作流程 <https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/GK6ovDkA/library/intact-mass-and-cell-culture-media-workflows-X5nPLgng>](https://onelab.andrewalliance.com/app/lab/GK6ovDkA/library/intact-mass-and-cell-culture-media-workflows-X5nPLgng)）。以下列表包含生物工艺Walk-Up解决方案在本次更新中支持的新配件/消耗品。

关键消耗品

P/N

Magne®蛋白A磁珠：	G8781 (Promega)
透明热封膜：	4ti-0540 (Azenta)
AcroPrep细胞澄清和无菌过滤板，24孔，7 mL：	97026 (Cytiva, Pall Life Sciences)
96孔twin.tec PCR板，带裙边，200 µL/孔：	951020443 (Eppendorf)

LC-MS系统详情

LC详情：	配备Automation Portal的ACQUITY Premier BSM
MS详情：	BioAccord LC-MS系统

数据管理

色谱软件：	waters_connect 3.3版
MS软件应用程序：	Intact Mass 1.8, UNIFI™ 1.9.4
信息学软件：	OneLab 1.20.3版

结果与讨论

蛋白A方案与分析

该解决方案既能够处理和运行收获的原始样品（经澄清/稀释），也能处理和运行经蛋白A纯化（使用基于磁珠的净化）的样品，然后进样至BioAccord系统进行LC-MS分析。这两种操作模式都能为用户提供有用信息，但各有不同。原始样品分析在之前的应用纪要（参考资料）中已有介绍，它能够以非常少的样品处理工作实现快速、轻松的糖型分析和轻链估算。增加ProA纯化功能以提取Fc片段的治疗药物，可实现理想的分析准确度，非常适用于需

要测定较低浓度(<1g/L)效价和/或用作其他分析（例如SEC、IEX、亚基分析、肽图分析）先决要求的情况。

图2所示为运行稀释方案或蛋白A方案后第10天的典型结果对比。图2a)为收获的原始样品经澄清和1/20稀释步骤之后的分析结果，图2b)为经蛋白A纯化后的样品分析结果。两种样品均使用相同的Intact Mass LC-MS采集方法进行分析。根据项目需求，快速获取IgG糖谱分析、轻链评估和/或蛋白A纯化数据并进行报告。

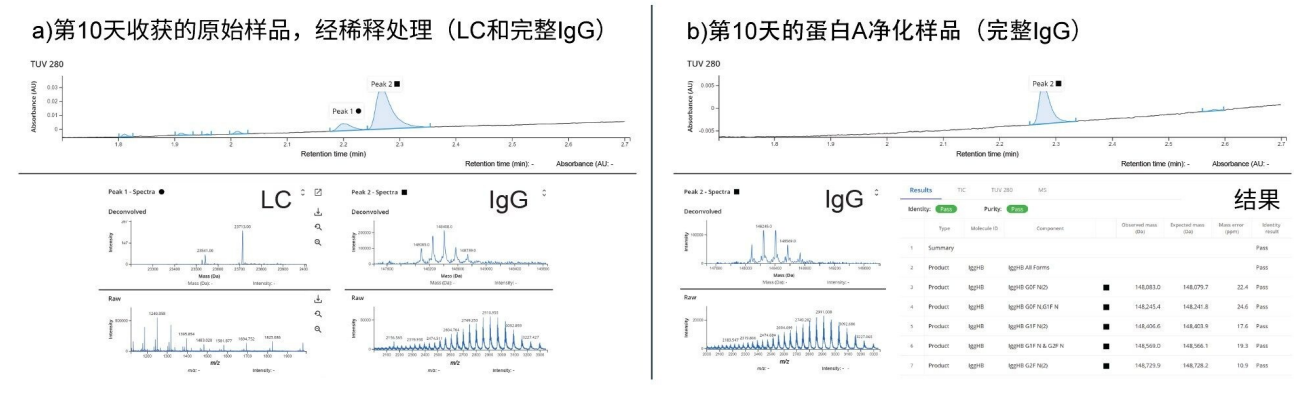


图2.左图(a)：第10天收获的样品，轻链和IgG主峰的UV色谱图及质谱图。右图(b)：第10天的蛋白A纯化样品，显示了IgG的结果。

澄清方案

快速有效地去除细胞碎片，对于通过限制降解来保持治疗药物的完整性，以及在运用某些分析方法（例如LC-MS）之前澄清样品而言，都具有重要意义。本研究测试了使用两级24孔AcroPrep™ (Cytiva)板的过滤方案。使用Andrew Extraction+模块过滤样品，代表性谱图见图3，并且可以根据剪切敏感性更强或更弱的细胞类型进行调整。通过测量各种过滤（和离心）方法前后的细胞计数来比较样品，结果汇总于表1中。样品离心条件是在800 g下离心5 min，然后过滤(1.25 μm)。使用Vi-CELL计数器(Beckman Coulter)测定细胞计数。通过使用1:1 PBS缓冲液预稀释收获的样品找到理想条件。*

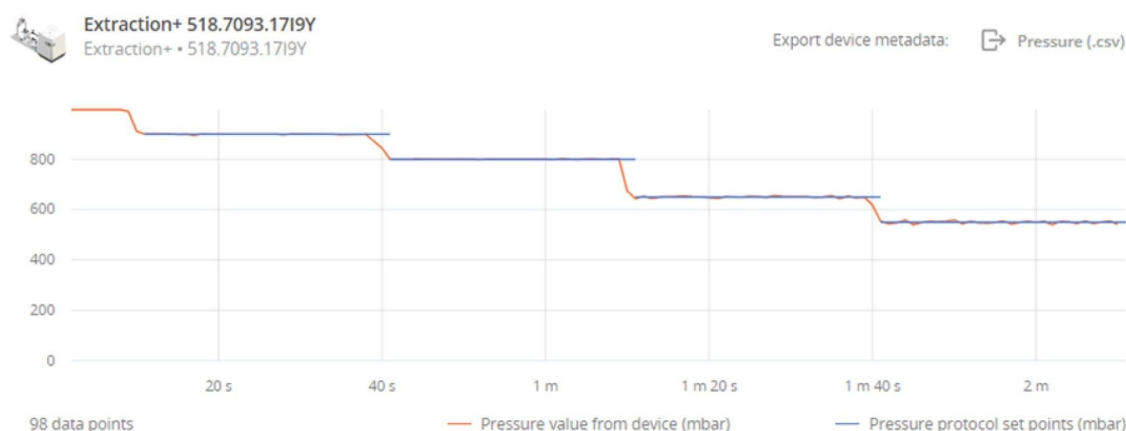


图3.真空曲线示例，显示了分级过滤压力（方案执行期间的预期压力与实测压力），确保了完整、可重现且有效的样品处理。

样品	样品前处理	细胞计数	细胞去除率
2,400万计数	收获样品	24.9×10^6	
(批次补料)	离心并经 $1.25 \mu\text{m}$ 过滤	0.56×10^6	98%
	AcroPrep 过滤	0.0047×10^6	>99%
+1亿计数	收获样品	$\sim 110 \times 10^6$	
(灌注)	AcroPrep 过滤	0.0047×10^6	>99%

表1.用Andrew+移液机器人上的Extraction+进行AcroPrep过滤后，报告分批补料（中等密度）和灌注样品（高密度）的细胞计数。

*注：为获得理想且一致的分析结果，应尽可能去除细胞碎片和培养基基质。如果不能立即运行样品，仍需要在收获后迅速离心，以快速去除细胞碎片。

SEC分析和报告

蛋白A纯化样品的分析既可以使用RP方法（见上文），也可以使用SEC条件，以进一步分离mAb与低分子量和高分子量物质，评估聚集体和碎片。Intact Mass 1.8中的新增功能改进还能够自动报告单一LMWS和HMWS的百分比，简化了报告过程。这些值也与Sartorius Ambr®数据接口兼容，如前文所述。图4所示为Intact Mass应用程序中报告的SEC分析示例。

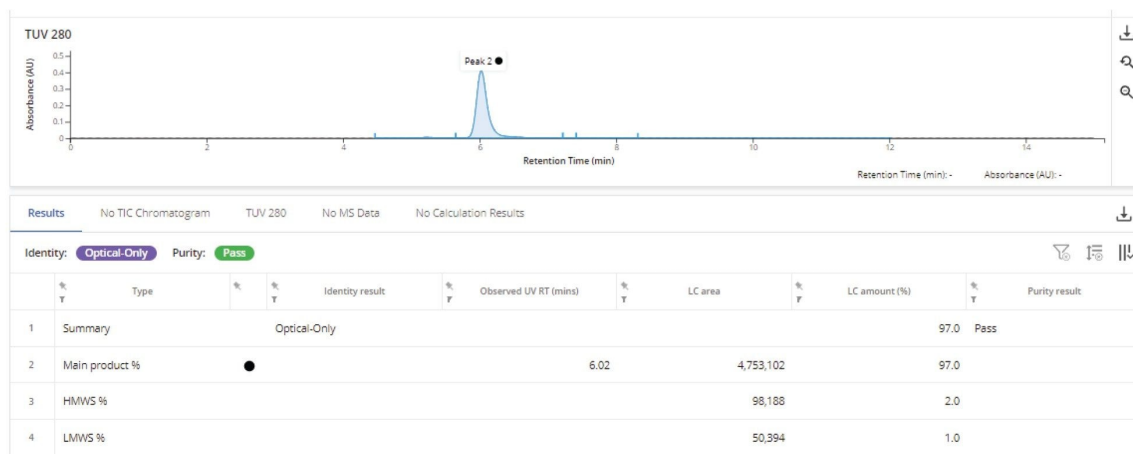


图4.使用Intact Mass应用程序的mAb SEC分析示例，表中计算了HMWS%和LMWS%。

*注：首选兼容SEC-MS的方法，确保非挥发性缓冲液不会进入质谱仪。如果所需的SEC方法仅兼容LC（即，含磷酸盐的缓冲液），用户必须将MS液流导至废液。

数据可视化

当以多个变量（克隆、条件）运行多个生物反应器时，生成多个PQA数据集并全面审查多个生物反应器、条件和/或时间点的数据，对用户而言是一项挑战。对于BioAccord采集的数据，沃特世支持多种数据导出策略，可以满足各种客户需求及应用场景。沃特世近期还开发了一款基于MS Excel的简单宏工具，可自动显示代谢物和/或糖型的叠加图，从而能够快速生成代谢物叠加图，以比较生物反应器条件和时程。

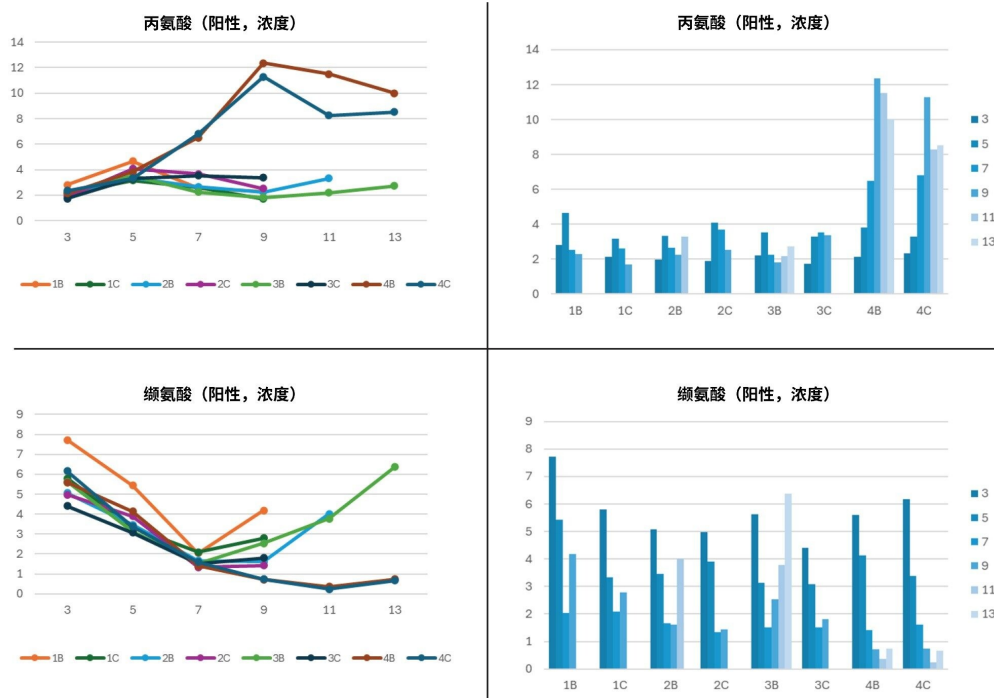


图5.使用Excel响应分析工具将生物反应器条件的差异可视化。图中显示了氨基酸（丙氨酸）和支链氨基酸（缬氨酸）的报告浓度(mM)。左图（折线图）显示八个生物反应器条件的叠加图，右图（条形图）显示不同时间程。

此外，所有工作流程均可使用简单的.CSV报告，支持导入到各种软件包（如JMP、SIMCA、Spotfire、EZinfo等）中。

结论

沃特世解决方案旨在帮助生物工艺团队在各步骤中更加轻松、自动化且更快地获得高质量LC和LC-MS数据，以低样品量通过更快速的LC和LC-MS分析测定PQA。这有助于团队更快地生成信息，指导细胞系选择、细胞系开发分类步骤以及工艺开发优化步骤。

参考资料

1. Alelyunas YA, Embrey E, Collins L, Pegaz-Blanc A, Mignard G, Wrona MD.利用沃特世生物工艺Walk-Up解决方案简化生物反应器过程监控流程.沃特世应用纪要, [720008062ZH](#), 2023年.
2. Alelyunas YA, Prochaska C, Kukla K, Dunning C, Hanna C, Wrona MD.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.沃特世应用纪要, [720008042ZH](#), 2023年.
3. Alelyunas YA, Gray J, Wrona MD, Boyce P. 沃特世推出快速高通量LC-MS方法分析细胞培养基营养成分和代谢物, 为上游生物工艺提供支持.沃特世应用纪要, [720008170ZH](#), 2024年.
4. Shion H, Boyce P, Berger SJ, Yu YQ.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年.
5. Koza SM, Jiang AHW, Yu YQ.使用乙酸铵流动相对单克隆抗体进行快速的SEC-UV分析.沃特世应用纪要, [720007852ZH](#), 2022年.

特色产品

BioAccord LC-MS系统 <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/mass-spectrometry/mass-spectrometry-systems/bioaccord-lc-ms-system.html>>

Automation Portal <<https://www.waters.com/nextgen/global/products/laboratory-automation-and-equipment/automation-portal.html>>

生物工艺Walk-Up解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135124488>>

waters_connect软件解决方案 <https://www.waters.com/nextgen/global/products/informatics-and-software/waters_connect.html>

720008487ZH, 2024年9月



© 2025 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [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](#)