

### 使用 LC-MS/MS 和生物分析仪对生产抗体的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系统进行细胞培养分析

 Tianhua Wang<sup>1</sup>; Junjie Desmond Lin<sup>2</sup>; Si Yin Lim<sup>1</sup>; John Goh<sup>1</sup>; Zhaoqi Zhan<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> 新加坡理工大学, 新加坡 <sup>2</sup> 岛津新加坡

#### 特点描述

- ◆ 利用 LC-MS/MS 细胞培养分析方法包, 可同时对细胞培养基中多达 125 种目标营养成分和代谢物进行分析。
- ◆ 通过受检目标物的含量变化趋势图, 可以直接查看代谢物浓度随细胞培养时间的变化。
- ◆ 使用 LC-MS/MS 法得出的代谢物变化趋势与使用 CEDEX Bio 分析仪观察到的趋势高度相关。

#### 引言

中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞广泛应用于生物制药行业, 是用于生产包括单克隆抗体 (mAb) 在内的治疗性重组蛋白类药物的主要工具。由于细胞生长和蛋白产物质量会受到关键营养成分消耗或细胞代谢副产物蓄积的影响, 因此通过监测 CHO 细胞培养过程中营养成分和代谢物的丰度, 能够深入了解工艺性能。所以, 有必要对细胞培养基进行全面分析, 因为这些信息有助于开发均衡的培养基处方和优化生物制药生产补料策略<sup>[1, 2]</sup>。

使用生物反应器或独立生物分析仪上的常规传感器, 在单个分析批中最多只能监测 10 种代谢物。此外, 可能需要使用昂贵的试剂盒, 并且其中一些试剂盒在开启后的保质期很短。这对实验计划和资源分配造成额外压力。本文中, 我们使用岛津细胞培养分析方法包<sup>[3]</sup>通过 LC-MS/MS 方法监测 mAb 生产中的细胞培养工艺, 该方法包能够在单个分析批中同时分析 125 种培养基组分。

#### 实验

##### CHO 细胞培养和生物分析仪监测

在 Gibco™ CD CHO 培养基和一种混合培养基中维持 CHO 细胞生产 mAb 的过程, 该混合培养基由含有 2 g/L 碳酸氢钠的 HyClone™ PF CHO 多粉末系统和 CD CHO 以 1:1 的比例混合而成。每 3 天进行一次细胞传代, 并通过 Vi-CELL XR 细胞活力分析仪 (Beckman Coulter) 监测细胞活力和密度。一周后, 扩大细胞培养物规模, 然后使其在摇瓶中生长 5 天, 每天 (第 0 天到第 5 天) 进行采样<sup>[2]</sup>。

使用 CEDEX Bio 分析仪 (Roche) 测量细胞培养样品, 该分析仪通常用于使用专有检测试剂盒 (分别为 Glucose Bio、Lactate Bio 和 Glutamine V2 Bio) 检查包括葡萄糖、乳酸和谷氨酰胺在内的重要细胞培养代谢物水平<sup>[2]</sup>。

表 1 细胞培养分析方法包在 LCMS-8050 上的分析条件

LC 条件 (Nexera UHPLC)	
色谱柱	: Shim-Pack™ GIST PFPP 色谱柱 (2.1 x 150 mm, 3µm)
流速	: 0.3 mL/min
流动相	: A: 0.1% 甲酸水溶液 B: 含 0.1% 甲酸的乙腈溶液
洗脱方式	: 梯度洗脱, 20 分钟
柱温	: 40°C
进样体积	: 1.0 µL
MS 条件 (LCMS-8050)	
离子源	: ESI, 正负离子同时扫描
接口温度	: 300°C
DL 温度	: 250°C
加热模块温度	: 400°C
雾化气	: 3 L/min
加热气体流量	: 10 L/min
干燥气流量	: 10 L/min
扫描模式	: MRM

##### 通过 LC-MS/MS 法监测 CHO 细胞培养

使用由岛津开发的细胞培养分析方法包 (第 2 版) 监测培养基组分和代谢物<sup>[3]</sup>。使用 Shim-Pack GIST PFPP 色谱柱 (2.1 x 150 mm, 3 µm) 对该即用型方法的分析条件 (表 1) 进行了优化。每种化合物包含两个 MRM 通道, 作为定量离子和参比离子。向每份培养基样品中加入内标 (2- 异丙基苹果酸), 用于确保分析可靠性并获得每种受检组分随细胞培养时间 (第 1 天至第 5 天) 的相对定量值 (面积比)。

### LC-MS/MS 分析前的样品预处理

根据细胞培养分析方法包的说明手册<sup>[3]</sup>，按照图 1 中所示的程序对 5 个不同实验日采集的培养基样品等分试样进行预处理。在室温下以 3,000 rpm 的转速对采集的培养基样品进行 5 分钟快速离心。将上清液转移至新的 1.5 mL 离心管中并储存在 -20° C 下直至上机分析。采集完所有样品后，按照步骤 3 至步骤 8（图 1）对样品进行进一步预处理，以用于 LC-MS/MS 批分析。

- 1) 向 1.5 mL 离心管中分装 500  $\mu$ L 细胞培养基，并在室温下以 3,000 rpm 的转速离心 5 分钟
- 2) 将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中并储存在 -20° C 下直至进行 LC-MS/MS 分析
- 3) 向新的 1.5 mL 离心管中分装 50  $\mu$ L 上述上清液，并用 150  $\mu$ L Milli-Q 水稀释
- 4) 添加 20  $\mu$ L 的 0.5 mM 2- 异丙基苹果酸 (ISTD)
- 5) 向混合物中加入 200  $\mu$ L 乙腈，涡旋 1 分钟
- 6) 在室温下以 15,000 rpm 的转速离心样品 15 分钟。
- 7) 取 100  $\mu$ L 样品上清液转移至 1.5 mL 样品瓶中，用 900  $\mu$ L Milli-Q 水稀释
- 8) LC-MS/MS 上机分析

图 1 用于 LC-MS/MS 分析的细胞培养基样品采集和预处理程序

## 结果和讨论

### 使用 CCP 方法进行组分检测

将两组重复细胞培养物在培养基 CD CHO 和培养基 CD/PF CHO (1:1) 中进行 5 天维持培养。于 CD/PF CHO (1:1) 培养基中生长的细胞在 6 天内的细胞密度曲线如图 2 所示 [2]。针对这两组细胞培养物，在 LCMS-8050 上使用 CCP 方法首先分析第 0 天（开始细胞培养之前）和第 5 天采集的样品。这是因为第 0 天培养基所含的营养成分（葡萄糖、吡哆醇和谷氨酸等）浓度最高。而在第 5 天培养基中，所产生的代谢物（脱氧胞苷、甲硫氨酸亚砷和苹果酸等）浓度可能最高。针对 CCP 方法包中提供的 125 种目标分析物进行筛选，在 CD/PF CHO 培养基样品中共检出 52 种组分，而在 CD CHO 样品中检出 48 种组分。后者缺少的四种组分是牛磺酸、乌头酸、枸橼酸和 2- 氨基丁酸。第 4 天 CD CHO 培养基的代表性色谱图如图 3 所示。请注意，首次在 LC-MS/MS 系统上分析样品时仔细进行色谱峰验证和保留时间调整。

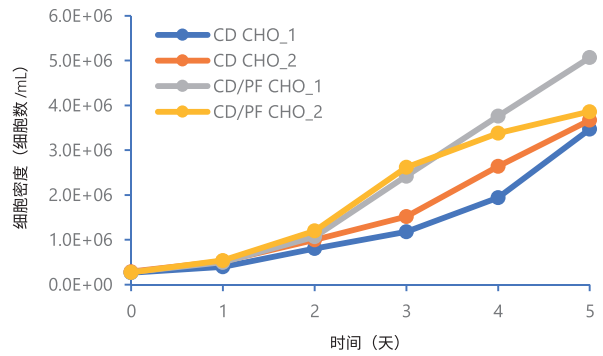


图 2: 于细胞培养基 CD CHO 和 CD/PF CHO (1:1) 中生长的 CHO 细胞在 5 天内的活细胞密度曲线。

### 细胞培养期间受检分析物的趋势

对于这两组分析结果（CD 和 CD/PF CHO [1:1]），均使用岛津多组学分析包在 GARUDA 平台上导出并绘制成条形图 [4]。观察到受检分析物呈现三种不同趋势，即 (a) 分析物浓度随培养时间而降低，(b) 分析物浓度随培养时间而增加以及 (c) 分析物浓度在整个期间波动。为方便起见，根据在 CD CHO 中观察到的趋势（红色趋势线）显示出结果，见图 4a~4c。

例如，丙氨酸和乳酸随时间呈现增加趋势（图 4a）。谷氨酰胺和己糖呈降低趋势（图 4b）。例如，脯氨酸和 2- 氨基丁酸保持波动（图 4c），而吡哆醇和 2- 氨基乙醇随时间而完全耗尽（图 4b）。总体而言，两种不同培养基中的代谢物趋势相似，但也存在在一些例外，如乳酸和腐胺。

### LC-MS/MS 与生物分析仪测量值之间的相关性

基于 LC-MS/MS 的细胞培养分析方法是一种旨在同时测量细胞培养过程中营养成分和代谢物变化趋势的新方法。对于葡萄糖（己糖）、乳酸和谷氨酰胺水平，还使用专有测定试剂盒（分别为 Glucose Bio、Lactate Bio 和 Glutamine V2 Bio）通过 CEDEX Bio 分析仪进行检查。虽然由于检测原理差异而直接比较测量值并无实际用途，但非常重要的一点是针对受检的细胞培养样品，验证通过这两种方法报告的趋势是否彼此几乎完全匹配。

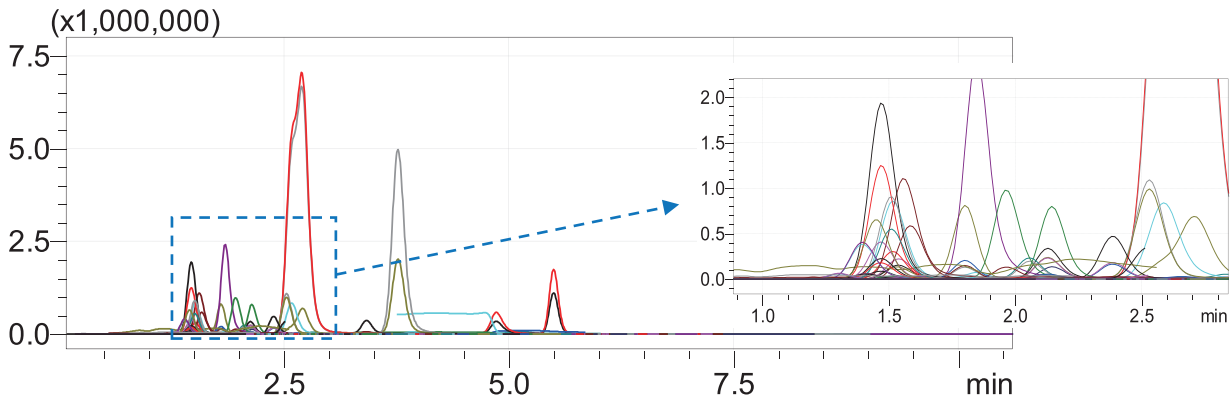


图 3: 在第 4 天细胞培养基 (CD CHO) 样品中检出的 48 种组分的 MRM 色谱图

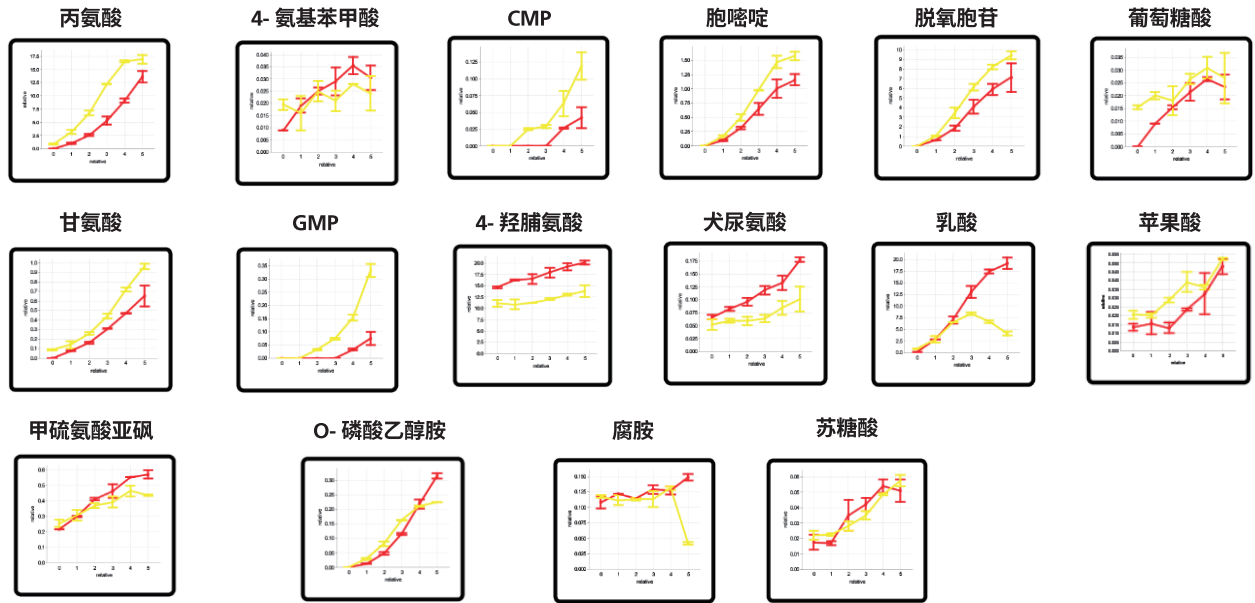


图 4a: 在 CD CHO 培养基中, 有 16 种分析物随时间呈现增加趋势 (红色趋势线)。黄色趋势线表示 CD/PF CHO 培养基中分析物的浓度变化。

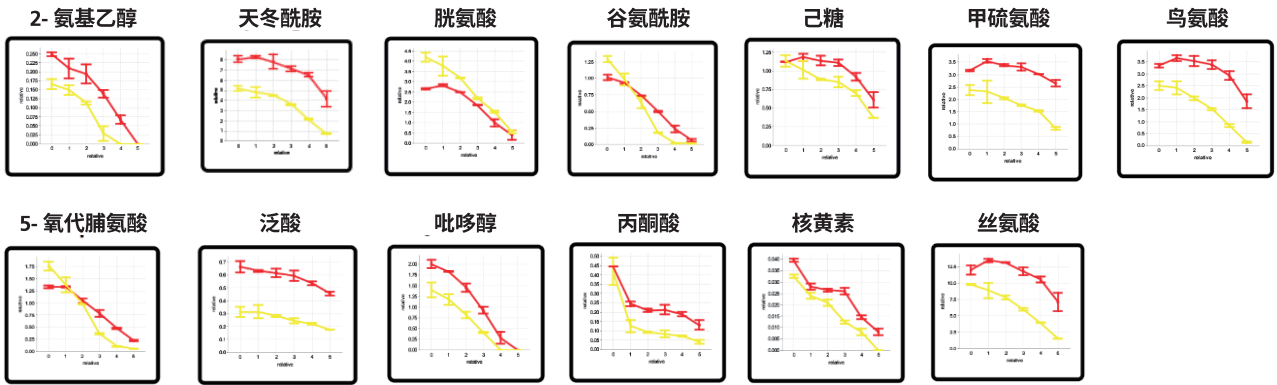


图 4b: 在 CD CHO 培养基中, 有 13 种分析物随时间呈现降低趋势 (红色趋势线)。黄色趋势线表示 CD/PF CHO 培养基中分析物的浓度变化。

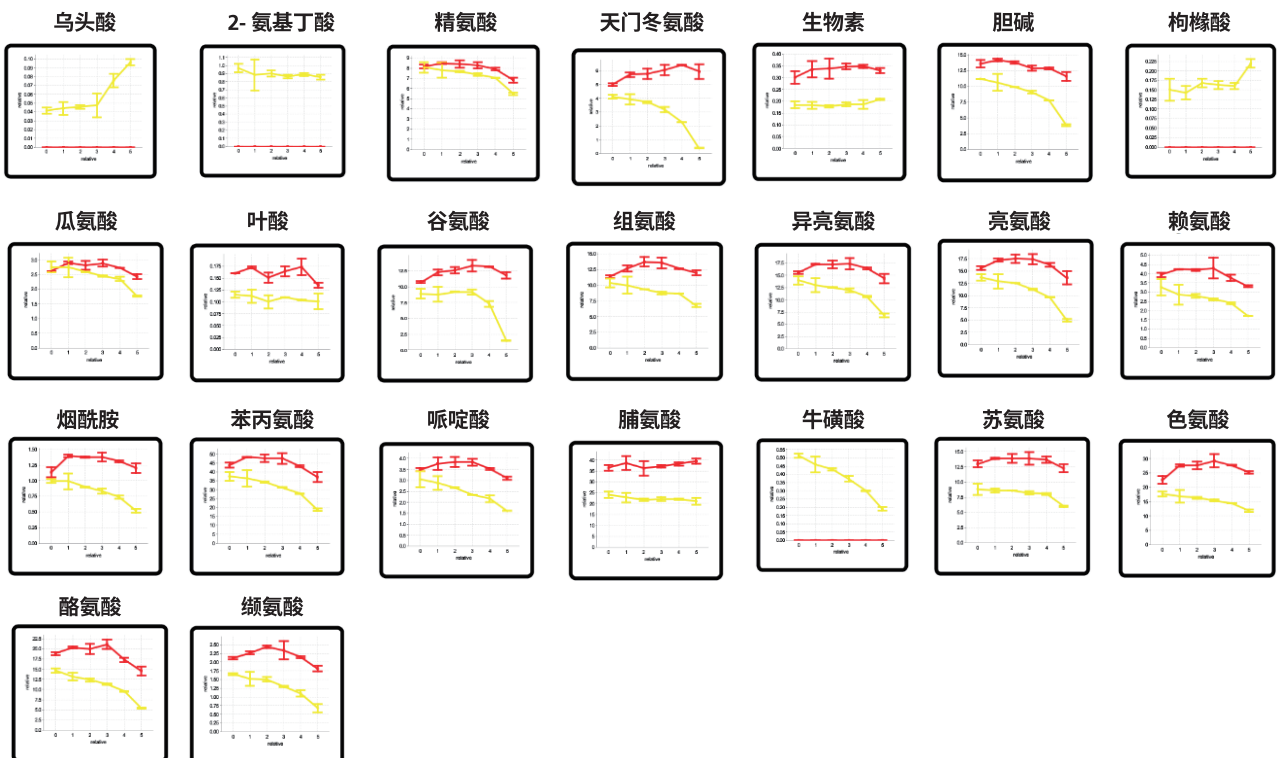


图 4c: 在 CD CHO 培养基中, 有 12 种分析物呈现波动趋势而有 4 种分析物未被检出 (红色趋势线)。黄色趋势线表示 CD/PF CHO 培养基中分析物的浓度变化。

表 2 计算并报告了使用 LC-MS/MS 和 CEDEX-Bio 分析仪独立获取的两组数据之间的相关系数。结果得出葡萄糖、谷氨酰胺和乳酸具有高度相关性，这为使用细胞培养分析方法包在 LC-MS/MS 上测得的趋势提供了高可信度。

表 2 在 2 个细胞培养过程（重复）中通过 LC-MS/MS 和 CEDEX-Bio 分析仪获得的葡萄糖、谷氨酰胺和乳酸测量值（第 0 天至第 5 天）的相关系数

细胞培养基	葡萄糖（己糖）	谷氨酰胺	乳酸
CD CHO_1	0.95	1.00	1.00
CD CHO_2	0.97	1.00	1.00
CD/PF CHO_1	0.99	1.00	1.00
CD/PF CHO_2	0.98	1.00	1.00

### 采用火山图进行生物统计分析

使用多组学分析包对第 0 天至第 4 天之间的浓度变化进行生物统计分析。火山图 [4, 5] 如图 5 所示，其中  $p < 0.05$  且涵盖 2 倍变化。对于 CD CHO 培养基，鉴别出 3 种化合物（5-氧代脯氨酸、核黄素、谷氨酰胺）显著降低，而四种化合物（犬尿氨酸、甲硫氨酸亚砷、丙氨酸和乳酸）显著增加。这些结果与图 4 中的趋势线基本一致。对于图 5 (b) 所示的 CD/PF CHO 培养基，显著降低的化合物包括 5-氧代脯氨酸、谷氨酰胺和丝氨酸等。显著增加的化合物包括丙氨酸、乳酸和甘氨酸。此外，两种培养基中的 5-氧代脯氨酸和谷氨酰胺浓度均显著降低，这表明它们可能是细胞生长所需的重要营养成分。两种培养基中的乳酸和丙氨酸浓度显著增加，它们可能是分泌产物。

## 结论

使用 LC-MS/MS 细胞培养分析方法包分析用于 mAb 生产的 CHO 细胞培养基中的营养成分和代谢物在 5 天内的变化趋势。在 CD CHO 培养基和 CD/PF CHO 培养基中分别共检出 48 种和 52 种组分，并对其相对浓度进行了定量。使用可向用户直接呈现组分变化的多组学分析包，观察这些组分的浓度随时间呈现不同变化趋势。对于葡萄糖、谷氨酰胺和乳酸，LC-MS/MS 结果与 CEDEX Bio 分析仪的测量结果具有高度相关性。此外，针对在 CD CHO 和 CD/PF CHO 培养基中检出的化合物，构建了第 0 天至第 4 天的火山图。

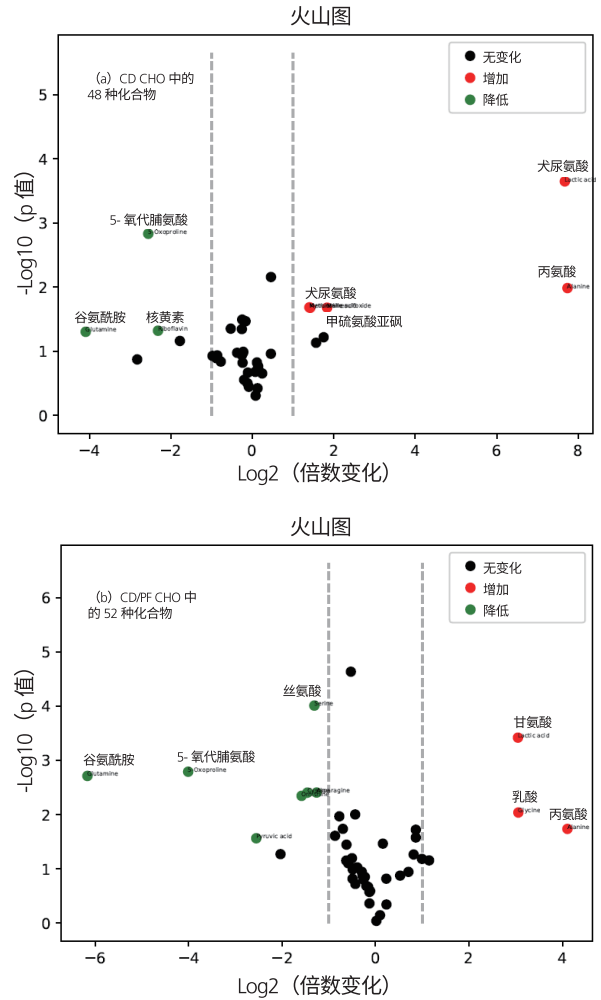


图 5：在 (a) CD CHO 培养基和 (b) CD/PF CHO 培养基中检出的化合物的生物统计分析火山图（包含 95% 置信区间与 2 倍浓度变化）。

结果显示，5-氧代脯氨酸和谷氨酰胺随时间显著降低；而在细胞培养过程中，两种培养基中的乳酸和丙氨酸浓度显著增加。

## 参考文献

- Zhiyuan Sun, Qinqin Ji, Adam R Evans, Michael J Lewis, Jingjie Mo, Ping Hu; "High-throughput LC-MS quantitation of cell culture metabolites", *Biologicals*. 2019 Sep; 61: 44-51
- Si Yin Lim, Singapore Institute of Technology, Bachelor's Thesis, "Metabolites Profiling Study for Biopharma Production" (2022)
- Shimadzu, LC/MS/MS Method Package for Cell Culture Profiling Ver. 2 C146-E408 (2020)
- Shimadzu, Multi-omics Analysis Package C146-E385B (2019) and <http://www.garuda-alliance.org/gadgetpack/shimadzu/>
- Toyoda, H. Kuroda, T. Suzuki, Shimadzu Application News C209, Evaluation of Undifferentiated State of Human iPS Cells Using C2MAP™ Cell Culture Media Analysis Platform (2020)

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2022 年 12 月