

LC-MS在生物制品质量控制中的应用

生物制品质控检查中常用的蛋白检测方法，除了经典的 ELISA 外，液相色谱串联质谱法（Liquid Chromatograph Mass Spectrometer，简称 LC-MS）是正交检测蛋白的主要方法之一。LC-MS 法结合了液相色谱的分离技术和质谱仪高分辨率，高灵敏度的分析特点，使其在生物制品蛋白相关各类杂质鉴定中具有更高的精度和准确性。与传统 ELISA 检测方法相比，LC-MS 法可以为研究者提供更多的待测物信息和数据，为当前各类生物制品如单克隆抗体，融合蛋白等的分析开辟了一系列新的可能性。

01 包被抗体、检测抗体筛选；反应体系优化

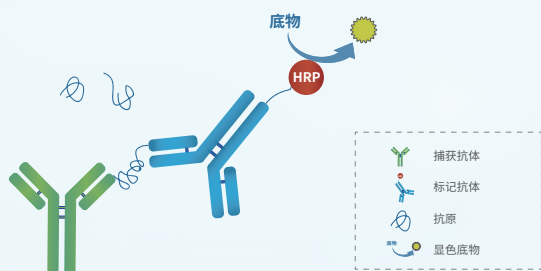


图1 HZSKBio® ELISA检测流程

ELISA方法灵敏度高，检测限可达1ppm，在分析实验中容易执行且稳定，满足GMP要求并用于生物制品的日常放行检验。在HCP检测中，ELISA方法主要局限缺乏对单个HCP的识别和量化，及缺少针对无免疫活性HCPs的检测；此外，ELISA方法对制备的抗体依赖性较强，不同工艺所带来的参考品不一样等。

LC-MS法检测生物制品中HCPs原理不同于ELISA的抗原抗体结合(图1)，LC-MS法通过分析肽段母离子的精确质量数和碎片离子的信息来确定肽段序列，依靠对比蛋白数据库，最终对蛋白进行定量(LC-MS检测大致步骤如图2)。因此，通过LC-MS定量分析方法就能够对鉴定到的各个HCPs进行定量，并且不受ELISA方法抗体覆盖率限制。

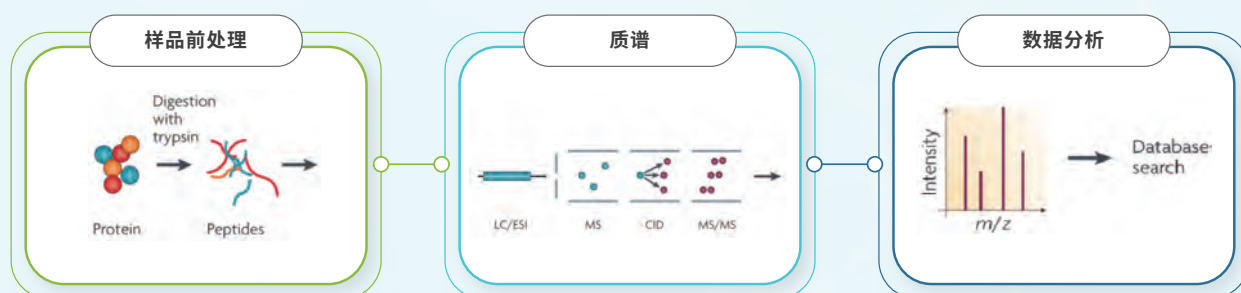


图2 LC-MS HCPs检测流程^[1]

作为新出现的检测方法，LC-MS法也存在一些自身的局限性，如：不同实验人员操作存在差异，使得实验结果批间可重复性差；不同类型生物制品中HCPs提取效率可能不同；相对ELISA检测，对复杂基质样本的抗干扰能力也存在挑战；质谱后数据生信分析缺少QC监控；这些都有可能最后检测结果的一致性和稳定性无法保证。因此，目前市场上LC-MS法检测HCPs尚无标准检测流程。

湖州申科专注于生物制品质量控制检测技术的研发，建立了针对生物制品质量安全检测的HZSKBio®LC-MS检测平台。





硬件设备



超高效液相UPLC串联超高分辨质谱Orbitrap QExactive HF



SpectraMax M2多功能酶标仪



Savant SpeedVac 集成真空浓缩仪



专业、高质量、符合法规的GMP-Like HZSKBio® LC-MS检测

完整的生信分析

- 基于机器学习算法, 涵盖不同原理的检测软件分析组合
- 人工智能结合DDA与DIA数据特点精准判别质谱数据优劣
- 自主研发生信流程和质控, 降低背景噪音减少干扰
- 全面验证生信分析流程, 保证真实的检测结果

完善的数据管理

- 数据完整, 满足FDA 21 CFR Part 11要求
- 建立样品数据库, 全面记录建库过程及数据
- 可视化平台随时展示分析结果
- 记录生信分析流程演进的代码管理系统

稳定的前处理流程

适合各种来源的蛋白样品前处理流程:

- 自研的自动化前处理方法, 稳定高效
- 针对特定样品, 优化处理

严格的质控体系

质控

- 严选内/外标准蛋白
- 过程质控和全流程质控

严格的中间质控参数

- Bradford/WB等多种方法测定
- 设立分步质控参数标准

全面验证的检测流程

- 多方法学验证
- 多中心验证

专业的生物制品质控蛋白数据库

自主构建适用于生物制品不同
工程宿主细胞不同工艺的蛋白数据库

- 包含中国药典及国内外法规、药典规定的不同工程细胞
- 包含不同工程宿主细胞不同工艺下的蛋白库
- 生信分析对蛋白数据库的去重存正



生物制品在生产和纯化过程中由于不同的宿主工程细胞和不同生产工艺会造成不同HCPs残留的差异。HZSKBio® LC-MS平台对于不同类型的生物制品与宿主来源，针对性的开发了蛋白前处理流程，生物制品中常用工程宿主细胞蛋白数据库(表1)，生信分析流程等，从而实现不同宿主工程细胞以及不同阶段(图3)工艺样品中存在的HCPs残留的监控。

表1 HZSKBio® 不同宿主蛋白数据库列表

样本类型	宿主	来源
工程细胞	CHO-K1、CHO-S	Cricetulus griseus (中国仓鼠)
	Vero	Mus musculus (小鼠)
	HEK293、293T	Homo sapiens (人)
	MDCK	Chlorocebus sabarus (非洲绿猴)
	Sf9	Spodoptera frugiperda (草地贪夜蛾)
	BHK	Cricetulus Mesocricetus (叙利亚仓鼠)
工程菌株	E.coil、毕赤酵母、S. cerevisiae	
	高危蛋白数据库	

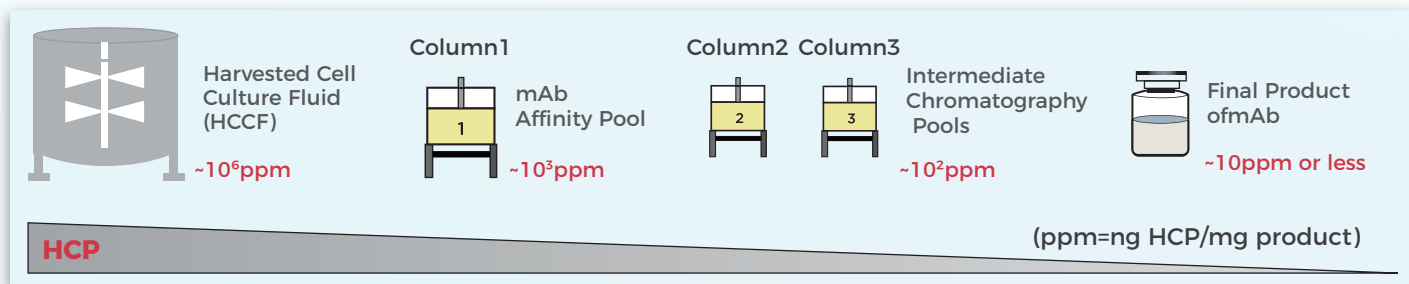


图3 不同工艺阶段HCPs监控^[2]

HZSKBio®LC-MS法分析HCPs的主要流程(图4)，具体包含了生物制品中HCPs的酶解前处理，液相高分辨质谱检测分析和蛋白数据库搜库鉴定及生信分析，最后整合出具报告。



图4 HZSKBio® LC-MS HCPs检测流程

Imbs®-LC-MS相结合的抗体覆盖率检测流程

通过偶联在磁珠上的HCP多克隆抗体亲和捕获样品中HCPs, 结合高分辨质谱对HCPs蛋白进行鉴定, 除了检测覆盖率还可以获得具体HCPs的信息, 包括蛋白质的分子量, pI等(图5), 评估ELISA检测中抗体、抗原性能, 并提高ELISA检测方法的性能。

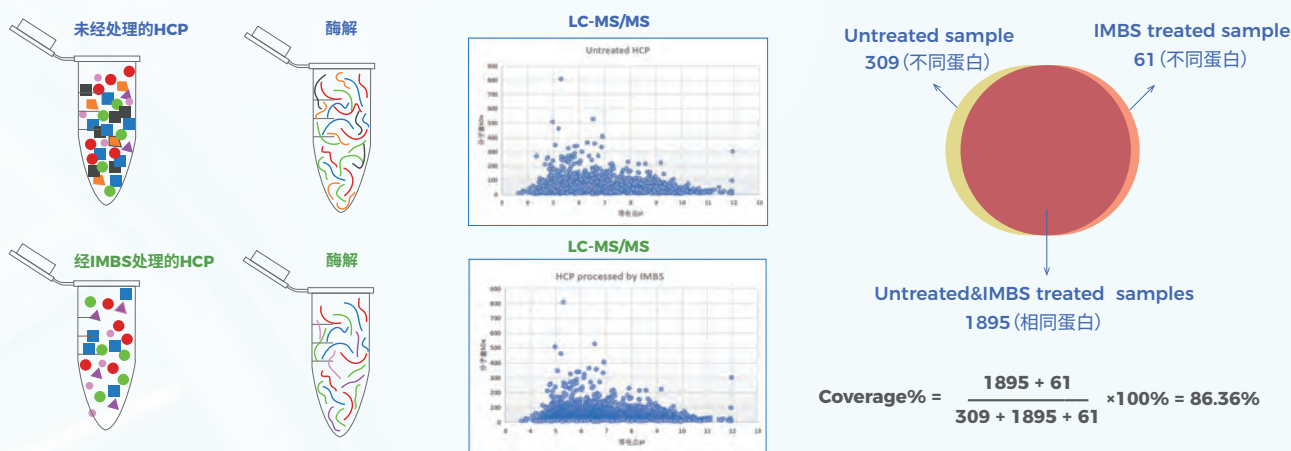


图5 HZSKBio® imbs-LC-MS相结合的抗体覆盖率检测流程

结合ELISA试剂盒对高风险HCPs蛋白靶向定量定制服务

HZSKBio® LC-MS平台使用PRM技术、蛋白标准品以及高风险HCPs蛋白数据库(表2)对高风险HCPs蛋白定量分析;同时结合免疫平台优势, 开发特殊高风险HCPs蛋白ELISA试剂盒, 为追踪分析特殊高风险HCPs蛋白工艺残留变化及终产品放行提供完整解决方案。

表2 HZSKBio® 高风险HCPs蛋白数据库列表

Identified HCP(Abbreviation)	IdentifiedHCP (Abbreviation)	78 kDa glucose regulated protein(GRP78,BiP)	UniProt Accession No.	No.of amino acids
40S ribosomal protein SA (RPSA)	High risk HCP	Yes	G3HQX0	179
60S acidic ribosomal protein P0	MW(kDa)	72.4	G3HKC9	280
78 kDa glucose regulated protein (GRP78,BiP)	pI	5.1	G318R9	654
Actin,cytoplasmic 1(ACTB)	UniProt Accession No.	G318R9	P48975	375
Alpha-enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	No.of amino acids	654	G310W1	139
Annexin A2	Function		G3IC05	244
Annexin A5	Impact		G3ISA4	321
C-C motif chemokine	Type of impact		G3GTT2	143
C-X-C motif chemokine 3(CXCL3)	Status	Aboulaich et al.,2014;Albrecht et al.,2018b;Chiverton et al.,2016;Falkenberg et al.,2019;Kreimeret al.,2017;Liu et al.,2019;Migani et al.,2017 Zhang et al.,2014;Joucla et al.,2013;Levy et al.,2016	A4URF0	101
Calmodulin(CaM)			A0A061HUH1	149

蛋白种属鉴定服务

蛋白种属鉴定利用LC-MS测定物种特异性肽段标记从而评估蛋白种属来源, HZSKBio®采用母离子的精确质量和碎片离子的信息来确定肽段序列, 数据非依赖型采集模式 (DIA)、蛋白库以及符合生物制品质量控制的生信分析流程。

参考文献

- [1] Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. Nat Rev Genet. 2009;10(9):617-27. Epub 2009/08/19. doi: 10.1038/nrg2633. PubMed PMID: 19687803.
- [2] Walker DE, Yang F, Carver J, Joe K, Michels DA, Yu XC. A modular and adaptive mass spectrometry-based platform for support of bioprocess development toward optimal host cell protein clearance. MAbs. 2017;9(4):654-63. Epub 2017/03/28. doi: 10.1080/19420862.2017.1303023. PubMed PMID: 28346045; PubMed Central PMCID: PMC5419088.
- [3] Jones M, Palackal N, Wang F, Gaza - Bulsec G, Hurkmans K, Zhao Y, et al. "High - risk" host cell proteins (HCPs): A multi - company collaborative view. Biotechnology and Bioengineering. 2021;118(8):2870-85. doi: 10.1002/bit.27808.