

生物检定

单抗类药物低丰度宿主细胞残留蛋白液相色谱串联质谱检测分析

余捷婧², 李炎¹, 马全刚², 豆敏华², 邵宇皓², 杨志行^{2*}, 曾实^{1*}

(1. 四川省药品检验研究院 四川省药品监督管理局生物制品质量监测与风险评估重点实验室, 成都 611731;

2. 湖州申科生物技术股份有限公司, 湖州 313000)

摘要 目的: 建立单抗类药物低丰度宿主细胞蛋白(HCPs)残留质谱检测方法, 以支持单抗类药物的质量控制。方法: 通过非变性酶解结合脱氧胆酸钠变性酶解的方法处理单抗样品, 使用纳升液相色谱-串联高分辨质谱(nanoLC-ESI-Orbitrap)对处理后的样品检测。采用 Acclaim PepMap RSLC C₁₈(75 μm × 25 cm, 2 μm)色谱柱, Acclaim PepMap 100 C₁₈(100 Å, 75 μm × 15 cm, 3 μm)Trap柱, 以0.1%甲酸水(A)-0.1%甲酸乙腈(B)为流动相, 以数据依赖采集的质谱扫描为采集模式, 对建立方法的检测限、精密度、重现性等进行考察, 并应用于单抗样品的HCPs残留检测, 高风险蛋白注释, 同时引入内标蛋白回收率作为校正因子, 以相对定量的方式分析HCPs残留量。结果: 应用建立的单抗类药物低丰度HCPs残留蛋白液相色谱串联质谱检测方法, 对26个单抗样品进行检测, 样品中HCPs残留量在47.0~103.5 ng·mg⁻¹。鉴定到高风险蛋白磷脂酶B样蛋白, 残留量在41.9~100.3 ng·mg⁻¹, 约占HCPs总残留量的90%。结论: 本研究建立的LC-MS分析方法稳定性及精密度好, 方法可靠, 适用于单抗类药物低丰度HCPs残留检测。

关键词: 宿主细胞蛋白; 单抗类药物; 液相色谱-串联质谱; 低丰度蛋白; 高风险残留蛋白

中国分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2025)12-2097-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1110

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of low-abundance host cell protein residues in monoclonal antibody drugs

YU Jie-jing², LI Yan¹, MA Quan-gang², DOU Min-hua²,
SHAO Yu-hao², YANG Zhi-xing^{2*}, ZENG Shi^{1*}

(1. Sichuan Institute for Drug Control, Key Laboratory for Quality Monitoring and Risk Assessment of Biological Products of Sichuan Medical Products Administration, Chengdu 611731, China; 2. Huzhou Shenke Biotechnology Co., Ltd., Huzhou 313000, China)

Abstract **Objective:** To develop a mass spectrometry-based detection method for low-abundance host cell protein (HCPs) residues in monoclonal antibody drugs, thereby supporting their quality control. **Methods:** Monoclonal antibody samples underwent enzymatic hydrolysis using a sequential approach: non-denaturing enzymatic hydrolysis followed by denaturing enzymatic hydrolysis utilizing sodium deoxycholate. Subsequently, the samples were analyzed by

* 通信作者 曾实 Tel: 13608013163; E-mail: shi.zeng@scsyjs.org
杨志行 Tel: 13916624594; E-mail: zhixingy@shenkebio.com
第一作者 余捷婧 Tel: 18616826263; E-mail: jiejingy@shenkebio.com
李炎 Tel: 13981836750; E-mail: 34904523@qq.com

nanoliter liquid chromatography coupled with electrospray ionization–Orbitrap tandem mass spectrometry (nanoLC–ESI–Orbitrap). The chromatographic separation was performed on an Acclaim PepMap RSLC C₁₈ column (75 μm × 25 cm, 2 μm) and an Acclaim PepMap 100 C₁₈ trap column (100 Å, 75 μm × 15 cm, 3 μm). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water (A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (B). Mass spectrometric data were acquired in data-dependent acquisition mode. The established method underwent validation for key parameters, including limit of detection, precision, and reproducibility. Furthermore, it was utilized for the detection of HCPs residues in monoclonal antibody samples. High-risk proteins were annotated, and the internal standard protein recovery rates were incorporated as correction factors to enable relative quantification of HCPs residues. **Results:** The method utilizing liquid chromatography–tandem mass spectrometry for analyzing low-abundance HCPs residues in monoclonal antibody drugs was applied to evaluate 26 monoclonal antibody samples. The residual HCPs levels in these samples ranged from 47.0 to 103.5 ng · mg⁻¹. The high-risk protein phospholipase B-like protein was identified, with residual levels ranging from 41.9 to 100.3 ng · mg⁻¹, constituting approximately 90% of the total HCPs residual quantity. **Conclusion:** The LC–MS/MS analysis method established in this study exhibits robust stability, precision, and reliability. It is well-suited for detecting low-abundance HCPs residues in monoclonal antibody drugs.

Keywords: host cell protein; monoclonal antibody drug; liquid chromatography–tandem mass spectrometry; low-abundance protein; high-risk protein residue

生物制品(如抗体药物、重组蛋白药物等)的制备是通过工程细胞表达生产,通过多种纯化工艺可有效去除来自工程细胞的相关杂质,如宿主细胞蛋白(host cell proteins, HCPs),但最终制品中仍然可能会残留微量的HCPs。抗体药物中残留的HCPs是关键工艺相关杂质之一。HCPs作为外源蛋白可能在不同程度上引发机体的免疫应答,导致过敏或其他不良反应^[1-2]。随着液态生物制剂的普遍使用,具有蛋白酶、糖苷酶或脂肪酶活性的HCPs,即使在含量极低的情况下,也有可能引起产品辅料成分的降解,影响药物的稳定性。这些能够诱发免疫反应,对药物安全性或有效性产生不利影响的HCPs被称为高风险宿主细胞残留蛋白^[3]。因此,抗体药物中HCPs的定性、定量检测尤为重要。酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法是生物制品开发和质量控制中检测HCPs的常用方法,但抗体对HCPs的覆盖和具体识别仍有局限性^[4],ELISA法使用的多克隆抗体无法有效识别无免疫原性或免疫原性较低的HCPs。高分辨质谱作为一种高精密度、高准确性的检测方法,对HCPs检测无偏倚性,已被应用于单克隆抗体药物生产工艺中HCPs的监测,与ELISA法形成互补^[5-7]。为提高单抗药物低丰度HCPs检测灵敏度,常采用非变性酶解的方式使未被消化的单抗蛋白沉淀,以减少宿主蛋白单抗对检测的影响^[8];或者采

用反相肽分离技术,通过复杂肽的正交肽分离提高质谱分析的蛋白鉴定^[9]。虽然这些方法能够提升低丰度蛋白的检出,但是却无法保证适用于这些蛋白的相对定量。因此,本研究建立了基于高分辨质谱灵敏且稳定的单抗药物低丰度HCPs的检测方法。采用非变性酶解结合脱氧胆酸钠变性酶解的样品前处理,引入内标蛋白回收率校正因子用于计算蛋白含量,提升定量准确性,用于评估单抗药物中HCPs的残留量。

1 仪器与试药

1.1 试剂

1 mol · L⁻¹ Tris 缓冲液(pH 8.0, 批号 91221415)、质谱级胰蛋白酶(批号 20230808C), 来自北京生夏蛋白技术有限公司; 二硫苏糖醇(DTT, 批号 SLCM6245)、碘乙酰胺(IAA, 批号 SLCL4705)、脱氧胆酸钠(批号 BCCK0642)、三氟乙酸(TFA, 批号 STBK6505)、牛血清白蛋白(批号 WXBFS040V), 均来自西格玛奥德里奇公司; 甲醇(批号 221157)、乙腈(批号 226101)、甲酸(批号 220622), 色谱纯, 均来自赛默飞世尔科技公司。

30 kD 超滤管(批号 0000186797), 默克密理博公司; C₁₈ 脱盐柱(批号 340166D), 北京莱伯泰科股份有限公司; Acclaim PepMap RSLC C₁₈ 色谱柱(批号 2765105), Acclaim PepMap 100 C₁₈ Trap 柱(批号 2726780), 定量肽检测试剂盒(货号 23275), 赛默飞

世尔科技公司。

单抗注射液,共26批次样品,由四川省药品检验研究院提供。*E.coli* 校准品(批号 24030401)为大肠杆菌混合蛋白,来源于湖州申科生物技术股份有限公司。

1.2 蛋白标准品

本实验中用到了6种蛋白标准品作为内标蛋白:细胞色素c(来源:马;UniProt登记号:P00004;批号 SLCL7912); α -乳蛋白(来源:人;UniProt登记号:P00709;批号 SLCP3207);C反应蛋白(来源:人;UniProt登记号:P02741;批号 SLCK3864);硫氧还蛋白1(来源:大肠杆菌;UniProt登记号:P0AA25;批号 0000222615);肌红蛋白(来源:马;UniProt登记号:P68082;批号 SLCL3317);血红蛋白S(来源:人;UniProt登记号:P68871;批号 SLCC7764),均购自Sigma公司。

1.3 仪器

纳升液相色谱-超高分辨 Orbitrap 质谱联用仪(配有 Vanquish neo 纳升液相色谱仪,以及 Q Exactive HF 质谱仪)、SpeedVac 挥干仪(型号 SPD2030),均来自 Thermo Fisher Scientific 公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Acclaim PepMap RSLC C₁₈(75 $\mu\text{m} \times 25 \text{ cm}$, 2 μm)色谱柱,Acclaim PepMap 100 C₁₈(100 \AA , 75 $\mu\text{m} \times 15 \text{ cm}$, 3 μm)Trap 柱,以 0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B)为流动相,柱温 55 $^{\circ}\text{C}$;液相洗脱梯度见表 1。

表 1 液相洗脱梯度

Tab. 1 Mobile phase gradient

t/min	流速 (flow rate)/($\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$)	流动相 B (mobile phase B)/%
0~4.5	0.7	3
4.5~5.0	0.7→0.3	3
5.0~120.0	0.3	3→25
120.0~140.0	0.3	25→35
140.0~145.0	0.3	35→50
145.0~145.5	0.3→0.7	50→90
145.5~160.0	0.7	90

2.2 质谱条件

离子源喷雾电压:2.0 kV;毛细管温度:275 $^{\circ}\text{C}$ 。质谱扫描采集模式:数据依赖采集(DDA)。一级分辨率:60 000,扫描范围 *m/z* 400~1 600,目标自动增

益控制值: 3e^6 ,最大注入时间:50 ms;二级分辨率:30 000,扫描范围 *m/z* 110 起始,目标自动增益控制值: 2e^5 ,最大注入时间:100 ms;动态排除:20 s,最强离子数为 20。

2.3 样品制备

精密称取硫氧还蛋白 1,用 25 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液配制得到质量浓度为 2 mg·mL⁻¹ 的母液;其余各内标蛋白采用相同方法配制得到质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ 的母液;样品制备时,再用 25 mmol·L⁻¹ Tris 溶液将各内标蛋白母液稀释至 0.01 mg·mL⁻¹ 作为内标蛋白工作液。

向 30 kD 超滤管中加入超纯水,14 000 g 离心 10 min,去除超滤管中少量的甘油;加入单抗样品,14 000 g 离心 20 min;加入 25 mmol·L⁻¹ Tris 缓冲液置换;对置换后的单抗样品进行蛋白定量。

用 0.2 mg·mL⁻¹ 牛血清白蛋白对后续实验的离心管进行预饱和,使用前弃去管中的溶液;向经过预饱和的离心管中加入 0.5 mg 蛋白量的单抗样品,并加入内标蛋白工作液,即按 0.5 mg 单抗蛋白量加入 10 ng·mg⁻¹ 的硫氧还蛋白 1 5 ng、15 ng·mg⁻¹ 的肌红蛋白 7.5 ng、20 ng·mg⁻¹ 的细胞色素 c 10 ng、40 ng·mg⁻¹ 的血红蛋白 S 20 ng、50 ng·mg⁻¹ 的 α -乳蛋白和 C 反应蛋白作为内标蛋白 25 ng。加 25 mmol·L⁻¹ Tris 补足体积至 100 μL ,混匀;按酶与蛋白的质量比为 1:400 加入质谱级胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 2 h;加入 DTT 使其终浓度为 5 mmol·L⁻¹,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,14 000 g 离心 15 min,取上清液;加入 10% (g·mL⁻¹) 脱氧胆酸钠,使其在上清液中终浓度为 1%;加入 DTT 使其终浓度为 5 mmol·L⁻¹,95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min,冷却至室温;加入 IAA 使其终浓度为 10 mmol·L⁻¹,避光反应 30 min;加入质谱级胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切过夜 16 h;加入 10% 甲酸使其终浓度为 1%,混匀,14 000 g 离心 15 min,取上清;用 C₁₈ 脱盐柱进行脱盐后,挥干仪去除溶剂;50 μL 0.1% 甲酸水复溶,14 000 g 离心 10 min,取上清,采用定量肽检测试剂盒进行肽段定量,转移至进样瓶。

2.4 蛋白组学数据分析方法

采用蛋白组学数据处理软件 Proteome Discoverer 3.0 进行数据分析。数据库来源 UniProt, taxonomy: *Cricetulus griseus* (中国仓鼠卵巢细胞, CHO, taxonomy ID 10029, 20231009); *Escherichia coli* (大肠杆菌, *E.coli*, taxonomy ID 562, 20230704)。

具体分析参数如下: 固定修饰: carbamidomethyl (C); 酶: trypsin; 漏切位点: 2; 一级质谱误差: 1×10^{-5} ; 二级质谱误差: 0.02 Da。

2.5 方法学验证

2.5.1 方法重现性 取 500 μg 单抗样品, 按“2.3”项样品制备方法加入内标蛋白, 在非变性条件下进行酶

解, 取上清, 进行脱氧胆酸钠变性酶解, 后使用高分辨质谱进行检测, 其特征总离子流图见图 1, 其肽段色谱峰形及响应良好。鉴定到的肽段的保留时间整体呈正态分布。肽段的相对分子质量与理论分子质量的偏差基本在 1×10^{-5} 以内, 说明高分辨质谱质量轴稳定, 鉴定结果良好可靠。

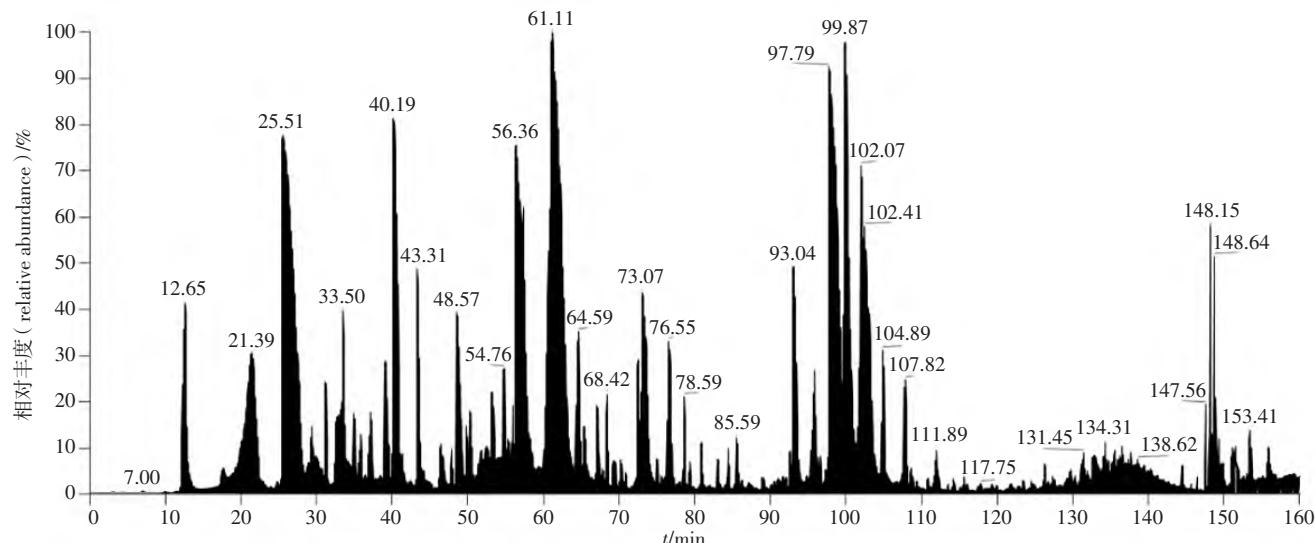


图 1 单抗注射液非变性酶解结合脱氧胆酸钠变性酶解的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of monoclonal antibody injection by non-denaturing digestion combined with sodium deoxycholate denaturing digestion

采集到的数据使用 Proteome Discoverer 3.0 蛋白组学数据处理软件进行分析, 选择 *Cricetulus griseus* 蛋白数据库, 库中包含了 83 455 条蛋白序列信息。对 3 个平行制备的样品中鉴定到的蛋白进行对比, 以特征肽段 ≥ 2 为筛选条件, 3 个样品分别鉴定到的蛋白数量为 9、10 和 9, 同时鉴定到的蛋白共 8 个, 其平均重现率为 85.9%。同样, 对满足特征肽段 ≥ 2 筛选条件的蛋白所对应的肽段进行统计, 3 个样品分别鉴定到的肽段数量为 40、40 和 43, 同时鉴定到的肽段共 34 个, 其平均重现率为 91.1%。结果表明, 本方法处理分析鉴定到的蛋白和肽段重现性良好。

2.5.2 检测限 单抗样品中加入 100 ng · mg⁻¹ 外源性 *E.coli* 混合蛋白, 按照“2.3”项样品制备方法, 进行非变性酶解, 取上清, 再进行脱氧胆酸钠变性酶解, 除盐后进行质谱分析。数据用蛋白组学数据处理软件进行分析, 选择 *Escherichia coli* 数据库, 以特征肽段 ≥ 2 为筛选条件, 符合条件的外源性蛋白有 10 个。采用相同方法, 制备 *E.coli* 参考品样品进行质谱检

测, 用蛋白组学数据处理软件 Proteome Discoverer 3.0 进行分析, 得到每个蛋白响应最高的 3 条肽段的响应之和, 作为该蛋白的响应, 通过公式(1)计算, 得到该单个蛋白在 *E.coli* 参考品中的相对含量。根据 *E.coli* 参考品的加入量与计算得到的各蛋白质量百分比, 得到蛋白的相对含量, 再根据单抗样品蛋白量, 通过公式(2)可计算得到 *E.coli* 蛋白在单抗样品中的质量浓度, 蛋白定性和定量信息见图 2, 能够鉴定到的含量最低的外源性蛋白的质量浓度约为 0.3 ng · mg⁻¹, 可作为本方法的检测限。

E.coli 参考品中蛋白*i*质量百分比 =

$$\frac{\text{蛋白响应} \times \text{蛋白}i\text{摩尔质量}}{\sum_{i=1}^n (\text{蛋白响应} \times \text{蛋白}i\text{摩尔质量})} \% \quad (1)$$

单抗中 *E.coli* 蛋白*i*质量浓度 =

$$\frac{\text{E.coli参考品蛋白量} \times \text{参考品中蛋白}i\text{质量百分比}}{\text{单抗蛋白量}} \quad (2)$$

式中: 蛋白*i* 为参考品中鉴定到的单个 *E.coli* 蛋白, *n* 表示参考品中鉴定到的全部 *E.coli* 蛋白。

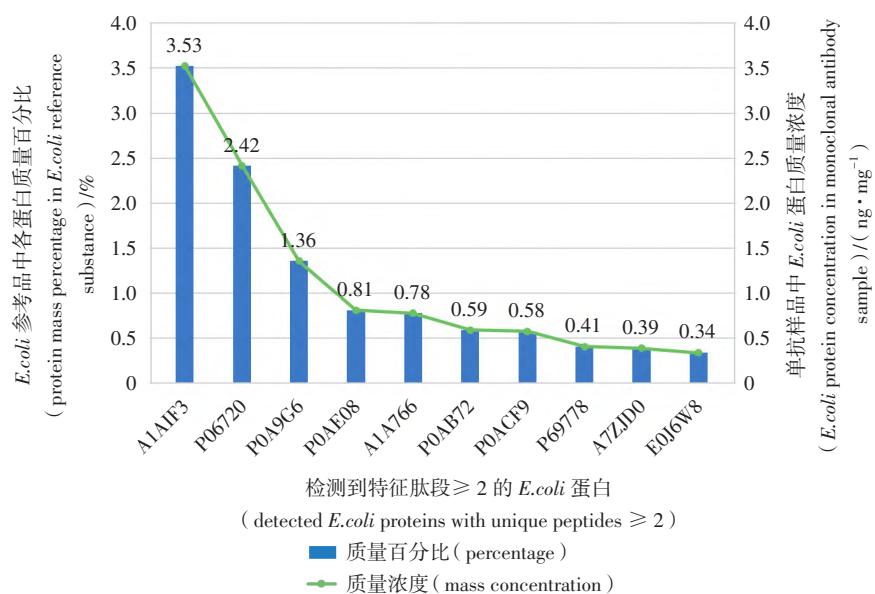


图 2 蛋白检测限

Fig. 2 Limit of protein detection

2.5.3 精密度 单抗样品中按“2.3”项样品制备方法加入内标蛋白,平行制备6份(S1~S6),计算内标

蛋白在平行样品间的响应,其RSD均低于15%,见表2,结果表明本项目建立的质谱分析方法精密度良好。

表 2 内标蛋白精密度

Tab. 2 Precision of internal standard proteins

UniProt 登记号 (UniProt accession)	蛋白名称 (description)	标准化丰度 (abundances (scaled))						RSD/%
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	
P00004	细胞色素 c (cytochrome c)	99.1	91.9	111.3	93.5	97.6	106.6	7.6
P00709	α- 乳蛋白 (α-lactalbumin)	108.7	87.5	103.9	103.6	88.3	108.0	9.6
P02741	C 反应蛋白 (C-reaction protein)	103.5	92.4	104.6	106.9	84.3	108.4	9.5
POAA25	硫氧还蛋白 1 (thioredoxin 1)	110.3	85.9	103.2	105.8	87.8	106.9	10
P68082	肌红蛋白 (myoglobin)	98.4	102.8	95.0	92.7	114.2	96.9	7.7
P68871	血红蛋白 S (hemoglobin subunit beta)	105.3	93.5	112.8	93.3	91.0	104.1	8.7

注 (note) : 标准化丰度为 Proteome Discoverer 软件导出的数据标准化丰度值,无量纲,使各数据处于同一数量级 (abundances (scaled) refers to the normalized abundance values exported from Proteome Discoverer software, which is dimensionless and scales all data to the same order of magnitude)

2.5.4 准确度 单抗样品中按“2.3”项样品制备加入内标蛋白,非变性酶解后,取上清液,再进行脱氧胆酸钠变性酶解,除盐后上样分析。同样制备1份无单抗基质的样品进行质谱分析。计算内标蛋白的响应最高的3条肽段响应之和,作为该蛋白的响应,比较有无单抗基质的样品中该响应的比值,即可得到回收

率校正因子,计算见公式(3)。各内标蛋白在基质的影响下回收率存在差异,见图3,后续定量分析计算时加入该回收率校正因子对内标蛋白进行校正。

$$\text{内标蛋白回收率校正因子} = \frac{\text{无单抗基质样品中内标蛋白响应}}{\text{有单抗基质样品中内标蛋白响应}} \quad (3)$$

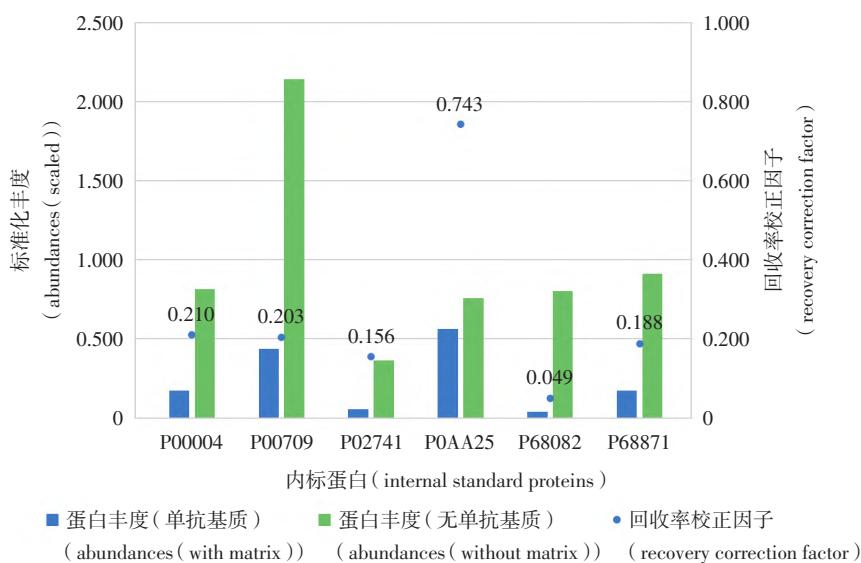


图3 内标蛋白回收率

Fig. 3 Recovery rates of internal standard proteins

蛋白响应最高的3条肽段响应之和的比值与其物质的量成正比,在引入标准蛋白回收率校正因子后,得到公式(4)。

$$\frac{\text{内标蛋白A质量} \times \text{内标蛋白A回收率校正因子}}{\text{内标蛋白B质量} \times \text{内标蛋白B回收率校正因子}} = \frac{\text{内标蛋白A响应} \times \text{内标蛋白A摩尔质量}}{\text{内标蛋白B响应} \times \text{内标蛋白B摩尔质量}} \quad (4)$$

在不引入内标蛋白回收率校正因子情况下,依次使用每个内标蛋白计算其他内标蛋白,得到热图,见图4-A。在引入内标蛋白回收率校正因子之后,应用公式(4),依次使用每个内标蛋白对其他内标蛋白进行定量计算,得到热图,见图4-B。比较图4-A与图

$$\text{HCPs质量} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{\text{内标蛋白}i\text{质量} \times \text{内标蛋白}i\text{回收率校正因子} \times \text{HCPs响应} \times \text{HCPs摩尔质量}}{\text{内标蛋白响应} \times \text{内标蛋白}i\text{摩尔质量}} \right) \quad (5)$$

式中:n表示内标蛋白数量;此处采用6个内标蛋白进行计算,故n=6。

各个样品中鉴定到的残留蛋白和满足定量计算条件的蛋白数量,平均每个样品可以鉴定到60个残留蛋白,其中符合定量条件的残留蛋白约占鉴定到的残留蛋白总数的10%。筛除肌联蛋白(titin, UniProt登记号G3HAC6)这种异常出现的蛋白,以及角蛋白这类可能来自污染的蛋白后,在样品中HCPs残留量在47.0~103.5 ng·mg⁻¹范围。残留蛋白鉴定为:补体C3(complement C3, UniProt登记号A0A8C2LJN)、C型凝集素结构域家族3成员B(C-type lectin domain

4-B,在引入内标蛋白回收率校正因子之后,内标蛋白间的定量准确度明显优于未使用内标蛋白回收率校正因子的结果。结果表明,在引入内标蛋白回收率校正因子时,这组内标蛋白整体用于定量计算准确度良好。

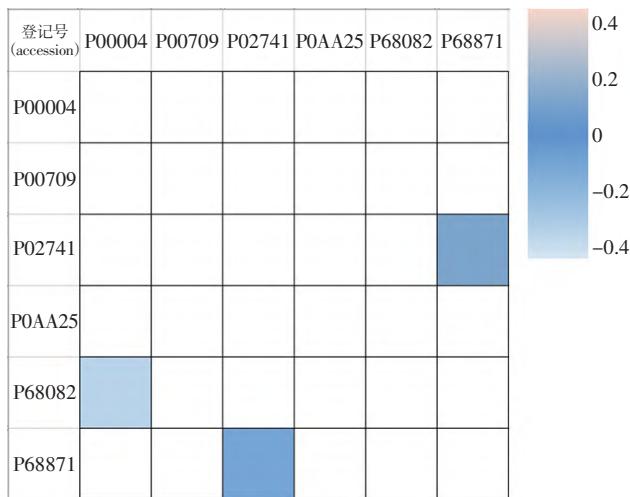
2.6 样品检测

2.6.1 宿主蛋白残留检测 蛋白响应最高的3条肽段响应之和的比值与其物质的量成正比。通过内标蛋白,可以对样品中HCPs进行相对定量。筛选特征肽段≥2的蛋白,选取响应最高的3条肽段响应之和进行计算,如不足3条肽段,则以现有肽段响应之和进行计算,作为该蛋白的响应,见公式(5)。

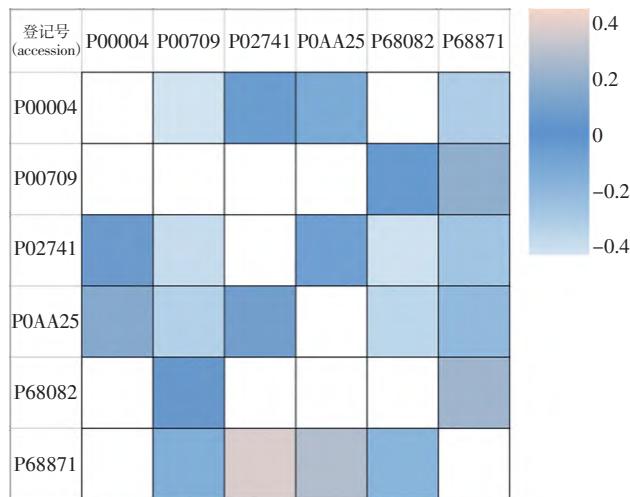
family 3 member B, UniProt登记号G3HP49)、血红蛋白α亚基(hemoglobin subunit alpha, UniProt登记号G3HBR8)、磷脂酶B样蛋白(phospholipase B-like, UniProt登记号G3I6T1)、RING型E3泛素连接酶(RING-type E3 ubiquitin transferase, UniProt登记号G3GZL3)和维生素D结合蛋白(vitamin D-binding protein, UniProt登记号G3IHJ6)。26批样品中残留蛋白定量见表3。

2.6.2 高风险蛋白注释 高风险HCPs通常具有蛋白酶、糖苷酶或脂肪酶活性,对药物的安全性或有效性存在负面影响,因此,识别生物制剂中的高风险

A



B



A. 无回收率校正因子校正 (calculate without recovery factor) B. 回收率校正因子校正 (recovery correction factor)

热图中横行为依次使用的内标蛋白,竖列为通过它计算的蛋白;图中从左上角到右下角的一系列色块为内标蛋白计算本身蛋白量的结果,此处不纳入分析,故色块没有上色;其余色块颜色越深表示计算越准确 (In the heatmap, the horizontal rows represent the internal standard proteins used, and the vertical columns represent the proteins calculated by them. The series of color blocks from the upper left corner to the lower right corner of the figure are the results of calculating the amount of protein itself by the internal standard protein. These results are not included in the analysis here, so the color blocks are not filled in. Additionally, the darker the color block, the more accurate the calculation)

图 4 内标蛋白定量热图

Fig. 4 Heatmaps for internal standard protein quantification

HCPs 显得极为重要。对鉴定到的残留蛋白进行高风险标注,在各检测样品中都鉴定到了高风险蛋白磷脂酶 B 样蛋白 (phospholipase B-like, PLBL2, UniProt 登记号 G3I6T1)。在 Protein A 纯化过程中,PLBL2 会与单抗共流出^[10],因此,PLBL2 较难去除,而高风险蛋白残留在抗体制品中,也是文献报道的 CHO 细胞常见高风险 HCPs。据报道,PLBL2 会导致药物中吐温 20 的降解,是导致产品质量不稳定的潜在因素^[11]。此外,PLBL2 还具有引起免疫反应的潜在风险,可能会对用药安全产生影响^[12]。PLBL2 在样品中的残留量见表 3,其残留量在 41.9~100.3 ng·mg⁻¹。样品中 PLBL2 在 HCPs 总残留量的百分比约为 90%,也说明高风险蛋白 PLBL2 确实是更难去除的蛋白,其残留对药物安全会有较大影响。

3 讨论

针对单抗类药物中低丰度高风险 HCPs 残留分析,本研究优化了样品前处理方法,采用非变性酶解结合脱氧胆酸钠变性酶解对单抗样品进行处理。通过非变性酶解过程沉淀掉大量单抗蛋白,再进行脱氧胆酸钠变性酶解使 HCPs 产生更少漏切且更稳定的肽段,从而保证方法精密度 (RSD) 在 ± 15% 以内,其准确度与应用响应最高 3 条肽段之和的蛋白相对

定量方法相近^[13]。本方法相较于单一的非变性酶解,能够减少吐温等基质对质谱检测的影响,提升色谱响应,检测限可到 0.3 ng·mg⁻¹。本文方法可以满足单抗类药物低丰度高风险 HCPs 残留蛋白定量分析的要求。

鉴于单抗注射液基质中存在多种辅料,本研究考察了基质对添加的标准蛋白的影响。内标蛋白在基质的影响下,回收率存在差异。通过比较有、无单抗基质的样品中的响应比值,可计算标准蛋白的回收率。如果引入回收率作为校正因子计算,有、无基质下响应最高的 3 条肽段之和计算蛋白的相对定量结果二者相近。因此,引入回收率作为校正因子有助于单抗药物中 HCPs 定量准确性的提高。

在选择内标蛋白时,标准蛋白的纯度是需要考虑的重要因素,因此选择标准蛋白纯度 ≥ 90%,尽量降低可能存在的杂质对分析的干扰。此外,由于是对特定宿主的残留蛋白进行定性定量分析,所选择的内标蛋白必须与此单抗药物的宿主不同源。同时,优先选择结构简单,不含复杂翻译后修饰的蛋白,以提升质谱分析的兼容性。在确定内标蛋白的加入量时,需要重点考虑内标蛋白的肽段响应。添加的蛋白量过低,容易导致内标蛋白肽段难以稳定检出;而添

表 3 残留蛋白定量列表

Tab. 3 HCPs residue quantification in samples

样品编号 (sample No.)	残留量 (residual amount value)/(ng·mg ⁻¹)							总 HCPs (total HCPs)
	A0A8C2IJN1*	G3HP49*	G3HBR8*	G3I6T1*	G3GZL3*	G3IHJ6*		
483	ND	1.1	3.1	45.8	ND	0.9	51.0	
484	ND	0.7	2.6	44.0	2.2	0.5	50.0	
672	1.0	0.8	3.1	49.0	2.1	ND	56.2	
737	ND	0.7	1.7	47.3	3.5	ND	53.3	
839	ND	ND	3.0	43.2	2.2	0.6	48.9	
840	0.3	0.3	3.2	67.2	2.1	0.7	73.8	
881	1.3	0.8	2.6	48.5	2.0	0.3	55.5	
882	ND	1.1	3.3	46.0	2.3	0.7	53.4	
883	ND	1.3	2.4	76.9	ND	0.7	81.2	
947	ND	0.8	3.1	54.8	1.9	0.5	61.1	
1007	ND	ND	3.3	70.1	ND	0.3	73.7	
1008	ND	0.3	2.6	42.3	1.7	ND	47.0	
1031	ND	0.4	2.8	55.2	ND	0.6	58.9	
1065	ND	1.1	5.4	90.0	ND	ND	96.6	
1087	ND	0.4	2.0	100.3	ND	0.8	103.5	
1098	ND	1.5	3.0	56.6	2.6	ND	63.7	
1099	2.0	1.6	1.6	53.9	4.4	1.2	64.6	
1121	ND	1.8	2.3	66.8	ND	ND	70.9	
1122	ND	1.4	2.9	84.4	3.4	1.2	93.3	
1123	1.2	1.3	3.0	41.9	0.9	ND	48.3	
1025	ND	1.6	2.4	63.4	4.5	0.4	72.3	
1026	ND	1.5	3.3	60.0	ND	0.7	65.4	
1286	ND	1.6	2.0	67.4	2.8	ND	73.7	
1592	0.5	1.8	2.9	90.8	6.3	ND	102.4	
2469	1.7	1.2	2.2	60.5	6.7	ND	72.3	
2750	2.2	1.9	6.0	80.2	4.4	0.5	95.2	

注 (note): * 蛋白 UniProt 登记号 (indicates UniProt accession); ND 为未检出 (means not detected)

加量过高,则可能会出现内标蛋白肽段质谱信号饱和,导致定量计算失准。同时,鉴于宿主细胞残留蛋白在抗体药物中丰度较低,添加的内标蛋白与低丰度蛋白须保持在相似水平,才能更好地表征低丰度蛋白^[14-15]。

蛋白鉴定结果中,出现了肌联蛋白,但在报告时将其排除在外。这基于以下几点考虑。其一,目前使用的蛋白数据库来源于 UniProt,其 *Cricetulus griseus* 蛋白数据库有 83 455 条蛋白序列,包含的冗余信息会在搜库时导致假阳性。其二,基于数据库搜索的方法,从实验谱图到鉴定肽段,存在模糊匹配和随机匹

配,会导致错误鉴定结果的产生。算法的局限性导致不能充分利用实验谱图的真实特征找到其来源肽段序列,而是随机地匹配上数据库中某一序列; titin 有 36 026 个氨基酸,在数据库搜索分析时会得到大量的理论酶切肽段,这增加了谱图可能被随机错误匹配的概率,以及其在结果中的序列覆盖率低,假阳性的可能性加大^[16-17]。其三,在肽段被误归属至氨基酸序列长,相对分子质量大的蛋白时,通过公式回算,会受到相对分子质量权重的影响而导致计算结果偏大。对于角蛋白这类蛋白,如角蛋白 10 (UniProt 登记号: A0A9J7JY52),则可能来自实验污染,一般进行数据

分析搜库时会将这些蛋白剔除^[18]。

ELISA 作为日常检测和控制生物制品中 HCPs 的放行方法,终产品中 HCPs 的残留限定通常要求小于 $100 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ ^[19-20]。本实验样品检测结果,部分样品中残留的 HCPs 超过了这个限度。ELISA 和 LC-MS/MS 的结果存在差异,是由于二者具有不同的检测原理^[21]。ELISA 测定的结果主要来源于能够与高亲和力抗体结合的 HCPs,低亲和力抗体不识别或弱识别的 HCPs 占了很小的比重。由于缺乏稀释线性,高丰度 HCPs 可能被漏检。如果某些 HCPs 在检测抗体制备中低或无免疫原性,则它们可能被遗漏。而在检测抗体中如果存在独特的免疫原性 HCPs,ELISA 检测的 HCPs 结果则会被高估。相较之下,LC-MS/MS 检测的 HCPs 鉴定和相关含量结果则依赖于样品制备、仪器灵敏度和使用的定量方法。基于上述原因,其检测结果可能不一致。LC-MS/MS 可以检测到 ELISA 检测不到的 HCPs,反之亦然。结合使用 LC-MS/MS 和 ELISA 方法,有利于提升各个水平 HCPs 的检出。

此外,本文质谱分析鉴定到高风险蛋白 PLBL2 在样品中占总 HCPs 残留量约为 90%,与文献报道的 PLBL2 在工艺纯化中难以去除相一致^[3]。鉴于 PLBL2 对药物安全会有较大影响,后续可以考虑建立 PLBL2 质谱检测的绝对定量方法。

综上所述,本实验采用非变性酶解结合脱氧胆酸钠变性酶解处理单抗样品,建立单抗类药物低丰度高风险 HCPs 残留蛋白液相质谱检测分析方法,创新地引入回收率校正因子,提高单抗药物 HCPs 定量准确性,并应用于 26 个单抗样品的检测。该质谱检测方法有助于生物制药行业对工艺流程中各阶段 HCPs 更全面的识别,为生物制品质量控制提供支持。

参考文献

- [1] OH YH, MENDOLA KM, CHOE LH, et al. Identification and characterization of CHO host-cell proteins in monoclonal antibody bioprocessing [J]. Biotechnol Bioeng, 2024, 121 (1): 291
- [2] MOLDEN R, HU M, YEN ES, et al. Host cell protein profiling of commercial therapeutic protein drugs as a benchmark for monoclonal antibody-based therapeutic protein development [J]. mAbs, 2021, 13 (1): e1955811
- [3] JONES M, PALACKAL N, WANG F, et al. "High-risk" host cell proteins (HCPs): a multi-company collaborative view [J]. Biotechnol Bioeng, 2021, 118 (8): 2870
- [4] 王志明. 基因工程药物中宿主细胞蛋白的检测与控制 [J]. 中国新药杂志, 2016, 25 (22): 2550
WANG ZM. Detection and control of host cell proteins in genetic engineering pharmaceuticals [J]. Chin New Drug J, 2016, 25 (22): 2550
- [5] 于继伟, 尹红锐, 邵泓. 质谱技术在单克隆抗体类药物宿主细胞残留蛋白检测中的应用进展 [J]. 药物流行病学杂志, 2023, 32 (4): 458
YU JW, YIN HR, SHAO H. Application progress of mass spectrometry technology in the detection of host cell proteins in monoclonal antibodies [J]. Chin J Pharmacoepidemiol, 2023, 32 (4): 458
- [6] 崔新玲, 朱涛, 应万涛. 基因工程药物宿主细胞蛋白的研究进展 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (9): 1533
CUI XL, ZHU T, YING WT. Research progress on host cell proteins of genetically engineered pharmaceuticals [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39 (9): 1533
- [7] BRACEWELL DG, SIMTH V, DELAHAYE M, et al. Analytics of host cell proteins (HCPs): lessons from biopharmaceutical mAb analysis for Gene therapy products [J]. Curr Opin in Biotechnol, 2021, 71: 98
- [8] HUANG L, WANG N, MITCHELL CE, et al. A novel sample preparation for shotgun proteomics characterization of HCPs in antibodies [J]. Anal Chem, 2017, 89 (10): 5436
- [9] KUFER R, HAINDL M, WEGELE H, et al. Evaluation of peptide fractionation and native digestion as two novel sample preparation workflows to improve HCP characterization by LC-MS/MS [J]. Anal Chem, 2019, 91 (15): 9716
- [10] TRAN B, GROSSKOPF V, WANG X, et al. Investigating interactions between phospholipase B-Like 2 and antibodies during protein A chromatography [J]. J Chromatogr A, 2016, 1438: 31
- [11] DIXIT N, SALAMAT-MILLER N, SALINAS PA, et al. Residual host cell protein promotes polysorbate 20 degradation in a sulfatase drug product leading to free fatty acid particles [J]. J Pharm Sci, 2016, 105 (5): 1657
- [12] FISCHER SK, CHEU M, PENG K, et al. Specific immune response to phospholipase B-Like 2 protein, a host cell impurity in lebrikizumab clinical material [J]. AAPS J, 2017, 19 (1): 254
- [13] GROSSMANN J, ROSCHITZKI B, PANSE C, et al. Implementation and evaluation of relative and absolute quantification in shotgun proteomics with label-free methods [J]. J Proteomics, 2010, 73 (9): 1740
- [14] FALKENBERG H, WALDERA-LUPA DM, VANDERLAAN M, et al. Mass spectrometric evaluation of upstream and downstream process influences on host cell protein patterns in biopharmaceutical products [J]. Biotechnol Prog, 2019, 35 (3): e2788
- [15] CARRILLO B, YANOFSKY C, LABOISSIERE S, et al. Methods for combining peptide intensities to estimate relative protein abundance [J]. Bioinformatics, 2010, 26 (1): 98
- [16] 周文婧, 曾文锋, 迟浩, 等. 蛋白质组学肽段鉴定可信度评价方法

- [J]. 生物化学与生物物理进展, 2023, 50(1): 109
- ZHOU WJ, ZENG WF, CHI H, et al. Validation methods of peptide identification results in proteomics [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2023, 50(1): 109
- [17] 马洁. 蛋白质组肽段鉴定质量控制方法的研究与应用 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2010
- MA J. Investigation and Application of the Quality Control for Peptide Identification in Shotgun Proteomics [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences, 2010
- [18] HODGE K, HAVE ST, HUTTON L, et al. Cleaning up the masses: exclusion lists to reduce contamination with HPLC-MS/MS [J]. *J Proteomics*, 2013, 88: 92
- [19] Pharmacopeia US. 〈1132〉Residual Host Cell Protein Measurement in Biopharmaceuticals [S]. 2023
- [20] 中华人民共和国药典 2020 年版. 三部 [S]. 2020 ChP 2020. Vol III [S]. 2020
- [21] ITO T, LUTZ H, TAN L, et al. Host cell proteins in monoclonal antibody processing: control, detection, and removal [J]. *Biotechnol Prog*, 2024, 40(4): e3448

(本文于 2025 年 10 月 31 日修改回)