

使用SYNAPT XS质谱仪鉴定单克隆抗体中亚ppm级的宿主细胞蛋白(HCP)

Catalin E. Doneanu, Alexandre Gomes, Brad J. Williams, Ying Qing Yu, Weibin Chen

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了一种高灵敏度发现HCP的分析方法，该方法能够对高纯度单克隆抗体中亚ppm级的HCP进行鉴定和定量。

优势

- 一种高灵敏度发现HCP的分析方法，其使用HDMS^F数据非依赖型采集(DIA)模式，能够鉴定高纯度单克隆抗体中含量非常低的HCP（低至100 ppb）
- 结合文献报道的样品制备方法，从NIST mAb中鉴定出四十八(48)种HCP，证明鉴定低丰度HCP的能力得到大幅提升

简介

残留的宿主细胞蛋白(HCP)是低浓度（通常低于100 ppm）的工艺相关杂质，即使经过大量纯化工作，仍然可能存在于蛋白类生物药物中。HCP可能使患者产生不良免疫反应，降低药物的有效性或稳定性，或导致药物降解¹。由

于这些原因，监管机构在批准药品之前需要对HCP进行鉴定和定量。生物制药行业依靠ELISA试验来测量总HCP浓度，以ppm（或ng HCP/mg生物药物）为单位。近年来，基于质谱的HCP分析已成为ELISA的优质替代方案²⁻⁶，因为它提供了更广泛的（蛋白质组范围内）HCP覆盖范围，并且能够鉴定和测量单个HCP的含量。



图1.SYNAPT XS质谱仪。

实验

样品制备

从美国国家标准技术研究所(NIST)购得采用小鼠细胞培养物制得的高纯度mAb (NIST mAb候选参比LRM 8670) , 浓度为100 mg/mL。使用Eli Lilly & Company的Huang等人首先提出的改良方案对NIST mAb进行酶解³。在装有100 µg Lys-C/胰蛋白酶混合物(Promega, Madison, WI)的玻璃样品瓶中进行mAb酶解。将125 µL NIST mAb与50 µL的100 mM CaCl₂和625 µL的100 mM碳酸氢铵混合。在37 °C下酶解过夜(约16 h)。然后使用0.05% RapiGest对mAb样品进行变性处理(在60 °C下处理1 h), 使用25 mM二硫苏糖醇(DTT)进行还原(在60 °C下处理1 h), 并用12 mM碘乙酰胺(IAM)进行烷基化(在避光的室温环境下处理45 min)。在烷基化步骤中, mAb开始沉淀。加入5 µL甲酸(FA)后, 将酶解物在37 °C下温育30 min, 然后离心(10 min, 13000 × g), 以分离沉淀的mAb和RapiGest表面活性剂。所有酶解试剂(CaCl₂、NH₄HCO₃、DTT、IAM和FA)均购自Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)。将上清液转移至自动进样器样品瓶(沃特世部件号186000327C <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/vials-containers--collection-plates/186000327c-lcgc-certified-clear-glass-12-x-32-mm-screw-neck-vial-max-recover.html>>)中, 按以下浓度添加五种MassPREP蛋白质酶解物标准品: 100 nM ENL(酵母烯醇酶, 部件号186002325 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186002325-massprep-enolase-digestion-standard.html>>)、40 nM ClpB(Hi3大肠杆菌, 部件号186006012 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006012-hi3-e-coli-standard.html>>)、20 nM ADH(酵母乙醇脱氢酶, 部件号186002328)、20 nM PHO(兔磷酸化酶b, 部件号186002326)和5 nM BSA(牛血清白蛋白, 部件号186002329 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186002329-massprep-bsa-digestion-standard.html>>)。在50 µL进样样​​品中, 各种加标蛋白质的柱上进样量分别为: 5000 fmol ENL、2000 fmol ClpB、1000 fmol ADH、1000 fmol PHO和250 fmol BSA。LC-MS级试剂(乙腈(ACN)和水)购自Thermo Fisher Scientific(麻萨诸塞州沃尔瑟姆)。

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY UPLC I-Class PLUS

色谱柱:

ACQUITY Premier CSH C₁₈色谱柱, 1.7 µm, 2.1 × 150 mm (部件号: 186009462)

柱温： 60 °C

流速： 50 μL/min

流动相： 溶剂A: 0.1%甲酸的去离子水溶液
溶剂B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

进样体积： 50 μL

清洗溶剂： 灌注溶剂： 50%甲醇
样品管理器清洗溶剂： 50%甲醇

梯度

时间 (min)	流速 (mL/min)	溶剂A含量 (%)	溶剂B含量 (%)	曲线图
0.00	0.2	100	0	初始
2.00	0.2	100	0	6
2.10	0.05	100	0	6
25.00	0.05	90	10	6
82.00	0.05	80	20	6
112.00	0.05	70	30	6
113.00	0.4	70	30	6
120.00	0.4	50	50	6
122.00	0.4	50	50	6
123.00	0.4	100	0	6
124.00	0.4	100	0	6
134.00	0.4	100	0	6

质谱条件

质谱系统： SYNAPT XS QToF质谱仪

电离模式:	ESI+
毛细管电压:	2.5 kV
锥孔电压:	40 V
电离源补偿:	4 V
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	300 °C
锥孔气流速:	35 L/h
脱溶剂气流速:	600 L/h
雾化器气压:	7 bar
数据采集:	HDMS ^E 模式
质量范围(<i>m/z</i>):	50-2000
扫描速率:	1.0 s
低能量CE:	6 V
高能CE梯度:	传输查找表(LUT), CE在0~85 V范围内
数据采集软件:	MassLynx 4.2 SCN 1009
数据处理软件:	Progenesis QI for Proteomics v4.2

注: CE值与肽段母离子的IMS漂移时间相关 (

结果与讨论

NIST mAb (100 mg/mL)中包含的HCP杂质之前已经过表征²⁻⁶。三家实验室使用相同的实验设置：二维微升级色谱（高pH RP/低pH RP）与SYNAPT G2-Si质谱仪联用系统，总共鉴定出35种HCP，其中14种HCP是共同的。该方法的检测限为1 ppm²。

近年来推出了若干替代性样品制备方案，以便提高LC-MS分析鉴定mAb样品中更低浓度HCP的灵敏度。这些方案包括：依靠mAb沉淀去除主要药物⁴、使用低分子量过滤器去除mAb并浓缩HCPs⁵，或是在蛋白质水平上采用HILIC分离技术去除主要样品组分并富集HCP⁶。本文采用Eli Lilly and Company提出的NIST mAb沉淀方案⁴，从而大幅减少LC-MS分析过程中由丰度更高的NIST mAb肽引起的离子抑制和干扰现象。与在胰蛋白酶酶解之前进行蛋白质变性、还原和烷基化的传统酶解方案不同，该方法依赖于天然构象的mAb对胰蛋白酶酶解的抗性。因此，与mAb相比，以非共价键连接至mAb的HCP更容易被胰蛋白酶酶解，而mAb即使经过长时间（过夜）酶解仍然大致保持完整。根据该方案，在胰蛋白酶酶解后，对样品进行变性、还原和烷基化处理，以便通过离心沉淀并去除主要样品组分。我们的酶解方案（详述见实验部分）也可应用于其他mAb产品。

同时采用MS^E和HDMS^E采集模式对酶解样品重复分析三次，利用Progenesis QI for Proteomics v4.2处理数据集，进行HCP鉴定和定量。仅报告在所有三次LC-MS重复测定中鉴定出的HCP，其中每种蛋白质包含3个及以上肽段。MS^E采集只能鉴定出丰度最高的5种HCP，检测限达到约10 ppm（数据未提供）。与MS^E相比，HDMS^E采集能够鉴定出明显更多的HCP（48种），检测限改善至100倍，达到了100 ppb的检测水平。在所有3次重复测定中鉴定出的所有HCP（3个数量级）详见表1。与MS^E相比，HDMS^E的灵敏度大幅提高，因为在该采集模式下，共洗脱肽段母离子在碎裂之前通过非常快速(15~20 ms)的离子淌度过程得到分离。因此，SYNAPT XS质谱仪提供了更清晰的MS/MS碎片离子谱图，从而鉴定出更多的HCP。此外，通过使转移室上施加的CE与肽段母离子的IMS漂移时间同步，在HDMS^E模式下进一步优化了用于肽段碎裂的碰撞能量(CE)。

编号	登记号	蛋白质描述	序列覆盖率 (%)	平均分子量 (kDa)	柱上进样量		浓度		RSD (%)
					fmol	ng	ng/mL	ppm	
1	P00924	酵母烯醇酶1 (ENL) - 5000 fmol	51.4	46.6	3747	175	27938	279	9.6
2	P63284	伴侣蛋白CipB (CLP) - 2000 fmol	11.2	95.6	1617	155	24734	247	5.3
3	P05064	果糖二磷酸醛缩酶A	55.5	39.3	2675	105	16820	168	4.2
4	P00489	兔糖原磷酸化酶(Pho) - 1000 fmol	43.2	97.1	1000	97	15536	155	0.0
5	P05063	果糖二磷酸醛缩酶C	42.4	39.4	1416	56	8926	89	7.3
6	P00330	酵母乙醇脱氢酶(ADH) - 1000 fmol	39.2	36.7	1028	38	6036	60	3.3
7	Q922R8	蛋白质二硫键异构酶A6	8.8	48.1	413	20	3178	32	16.5
8	P02769	牛血清白蛋白(BSA) - 250 fmol	31.3	66.3	232	15	2461	25	0.4
9	P17225	多聚嘧啶序列结合蛋白1	11.4	56.5	208	12	1880	19	1.0
10	P06745	6-磷酸葡萄糖异构酶	22.4	62.7	164	10	1645	16	2.2
11	P40142	转酮醇酶	7.2	67.6	126	9	1363	14	2.1
12	Q61937	核仁磷酸蛋白	18.3	32.6	247	8	1288	13	2.1
13	Q60864	应激诱导的磷酸蛋白1	11.7	62.5	83	5	830	8	4.8
14	Q9Z0X1	凋亡诱导因子1	5.1	66.8	75	5	802	8	4.6
15	Q9CZY3	泛素结合酶E2变体1	15.5	16.3	296	5	772	8	0.8
16	P08101	低亲和力免疫球蛋白vFc区受体	19.7	36.7	121	4	711	7	14.7
17	Q8K4F5	含α/β水解酶结构域的蛋白11	9.7	33.4	129	4	689	7	6.2
18	Q91YR9	前列腺素还原酶1	8.1	35.5	109	4	619	6	7.1
19	Q9CZ44	NSFL1辅因子p47	8.3	40.7	76	3	495	5	16.6
20	Q8C7U7	多肽N-乙酰半乳糖胺基转移酶6	6.6	71.5	40	3	458	5	10.2
21	Q6PB93	多肽N-乙酰半乳糖胺基转移酶2	3.9	64.5	44	3	454	5	2.3
22	Q3UEB3	聚(U)结合剪接因子PUF60	6.2	60.2	44	3	424	4	8.5
23	P17892	胰脂肪酶相关蛋白2	4.9	52.6	46	2	387	4	1.2
24	Q9WVA4	肌动蛋白结合蛋白2	6.7	22.4	104	2	373	4	3.8
25	Q923D2	黄素还原酶(NADPH)	11.5	22.2	104	2	369	4	5.1
26	P60335	聚(rC)结合蛋白1	6.3	37.5	60	2	360	4	9.8
27	O88569	核内不均一核糖核蛋白A2/B1	5.6	37.4	56	2	335	3	20.1
28	P01887	β-2-微球蛋白	18.3	13.8	145	2	320	3	15.7
29	P49312	核内不均一核糖核蛋白A1	9.5	34.2	58	2	317	3	3.0
30	P26928	肝细胞生长因子样蛋白	2.3	80.6	21	2	271	3	22.3
31	Q9CQF3	切割及多聚腺苷酸化特异因子亚基5	4.4	26.2	64	2	268	3	5.5
32	Q9CQE1	蛋白质Nipsnap同系物3B	5.2	28.3	49	1	222	2	3.1
33	Q8BL97	富含丝氨酸/精氨酸的剪接因子7	5.2	30.8	44	1	217	2	20.2
34	Q9WTP6	腺苷酸激酶2线粒体	7.8	26.5	41	1	174	2	2.8
35	P33174	染色体相关的驱动蛋白KIF4	0.6	139.5	7	1	156	2	14.3
36	Q9ER00	突触融合蛋白-12	3.4	31.2	27	1	135	1	19.2
37	Q9DBP5	UMP-CMP激酶	2.9	22.2	34	1	121	1	7.8
38	P35700	过氧化物还原酶-1	4.5	22.2	33	1	117	1	19.3
39	P45878	肽基脯氨酸顺反异构酶FKBP2	4.6	15.3	42	1	103	1	2.4
40	P10126	延伸因子1-α1	3.4	50.1	11	1	88	0.9	5.4
41	Q01768	核苷二磷酸激酶B	3.6	17.4	31	1	86	0.9	6.8
42	P57722	聚(rC)结合蛋白3	3.2	39.3	12	0.5	75	0.8	8.3
43	P02798	金属硫蛋白-2	1.5	6.2	51	0.3	51	0.5	3.0
44	P99029	过氧化物还原酶-5	6.7	21.8	14	0.3	49	0.5	7.1
45	P56812	程序性细胞死亡蛋白5	2.7	14.3	18	0.3	41	0.4	5.6
46	Q9D7P6	铁硫簇组装酶ISCU	2.5	18.1	14	0.3	41	0.4	7.1
47	O35166	高尔基NSP受体复合体成员2	4.1	24.7	10	0.2	40	0.4	10.0
48	P07724	小鼠血清白蛋白	5.3	68.7	3	0.2	33	0.3	21.7
49	P15532	核苷二磷酸激酶A	3.3	17.2	9	0.2	25	0.2	11.1
50	Q9JIX0	转录和mRNA输出因子ENY2	2.2	11.5	11	0.1	20	0.2	10.8
51	Q9CR16	肽基脯氨酸顺反异构酶D	1.5	40.7	3	0.1	20	0.2	17.3
52	Q9WV55	囊泡相关膜蛋白相关蛋白A	3.3	27.9	4	0.1	18	0.2	13.3
53	P62843	40S核糖体蛋白S15	1.8	17.0	3	0.1	8	0.1	21.7

表1. 使用在SYNAPT XS质谱仪上开发的HDMS^E分析方法从NIST mAb中鉴定并定量的HCP完整列表。在所有三次重

复进样中，鉴定出五种加标蛋白质（ENL、ClpB、ADH、PHO和BSA）以及48种HCP。鉴定出14种HCP的浓度低于1 ppm，该分析方法的检测限为100 ppb。

对HDMS^E实验中鉴定出的HCP列表与此前发布的两份出版物^{4,6}中报道的HCP鉴定结果进行比较，结果汇总于图2所示的文氏图中。所有三个数据集都包含本研究组初次报道的14种HCP的子集²。此外，这三个数据集均包含由单一实验室鉴定出的HCP的特有子集：在我们的案例中，采用SYNAPT XS通过HDMS^E采集仅鉴定出20种HCP。在这20种HCP中，有14种HCP（表1中以黄色突出显示）的浓度在ppm级以下(100~1000 ppb)，表明该分析方法具有优异的灵敏度。显然，虽然更容易鉴定出NIST mAb样品中包含的高丰度HCP，但是采用各种不同的样品制备程序似乎都鉴定出一些独特的低浓度HCP。这一结果表明需要尝试采用不同的样品制备方法，以便对具有挑战性的mAb样品进行全面的HCP分析。

HDMS^E 数据集

参比3数据集

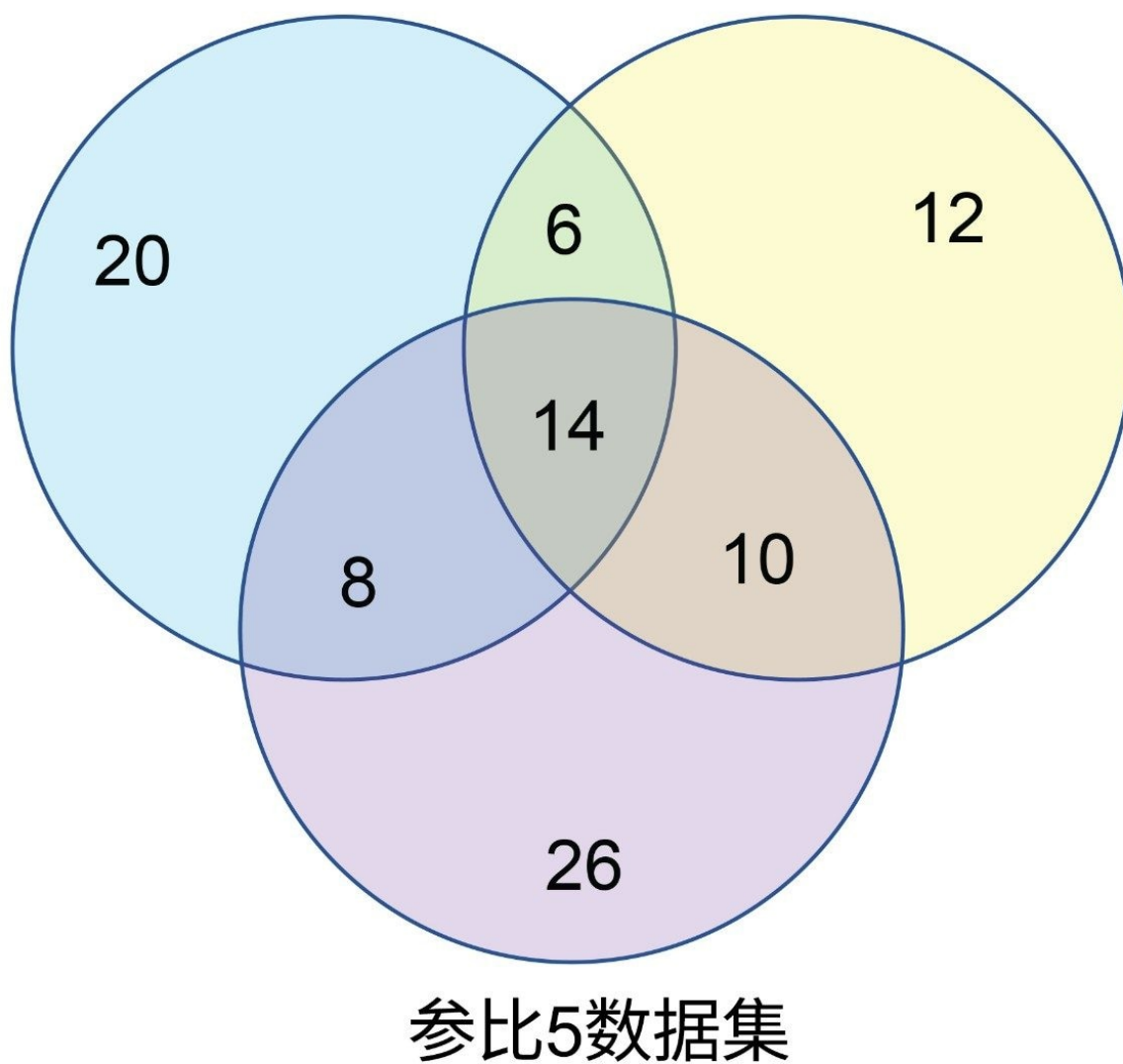


图2.文氏图，比较了本研究中鉴定出的HCP与文献中先前报道的NIST mAb HCP。

结论

- 本文介绍了一种高灵敏度发现HCP的分析方法，其使用HDMS^E数据非依赖型采集(DIA)，能够鉴定高纯度单克隆抗体中含量非常低的HCP（亚ppm级）
- 从NIST mAb中鉴定出48种HCP，明显改善了之前获得的结果（报告仅鉴定出14种蛋白质）

参考资料

1. Hogwood BD, Smales MC. Measurement and Control of Host Cell Proteins (HCPs) in CHO Cell Bioprocesses, *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30, 153–160.
2. Doneanu CE, Anderson M, Williams BJ, Lauber MA, Chakraborty A, Chen W. Enhanced Detection of Low-Abundance Host-Cell Protein Impurities in High-Purity Monoclonal Antibodies Down to 1 ppm Using Ion Mobility Mass Spectrometry Coupled with Multidimensional Liquid Chromatography, *Anal Chem*, 2015, 87, 10283–10291.
3. Weibin C, Doneanu CE, Lauber MA, Koza S, Prakash K, Stapels M, Fountain KJ. Improved Identification and Quantification of Host Cell Proteins (HCPs) in Biotherapeutics Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, book chapter in *Technologies for Therapeutic Monoclonal Antibody Characterization, Vol 3, ACS Symposium Series*, 2015, 357–393.
4. Huang L, Wang N, Mitchell CE, Brownlee T, Maple SR, De Felippis MR. A Novel Sample Preparation for Shotgun Proteomics Characterization of HCPs in Antibodies, *Anal Chem*, 2017, 89, 5436–5444.
5. Chen IH, Xiao H, Daly T, Ning L. Improved Host Cell Protein Analysis in Monoclonal Antibody Products through Molecular Weight Cutoff Enrichment, *Anal Chem*, 2020, 92, 3751–3757.
6. Wang Q, Slaney TR, Wu W, Ludwig R, Tao L, Leone A. Enhancing Host-Cell Protein Detection in Protein Therapeutics Using HILIC Enrichment and Proteomic, *Anal Chem*, 2020, 92, 10327–10335.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10160596>](https://www.waters.com/10160596)

[SYNAPT XS高分辨率质谱仪 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135020928)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[Progenesis QI for Proteomics <https://www.waters.com/134790665>](https://www.waters.com/134790665)

[MaxPeak Premier色谱柱 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135074078>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135074078)

720007101ZH, 2021年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)