

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

于继伟, 尹红锐, 邵 泓

上海市食品药品检验研究院 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室(上海201203)

【摘要】单克隆抗体类药物是近年来生物制药领域增长率最快的一类生物技术药物, 以其靶向性强、治疗效果明显等优势在癌症、自身免疫性疾病等领域应用广泛。宿主细胞残留蛋白(HCP)是其生产中无法去除且易引起免疫原性的一类工艺杂质, HCP含量测定是单抗药物质量控制中重要的一项指标。酶联免疫法(ELISA)是目前HCP检测最常用的方法, 可以定量检测HCP的总量, 但存在局限性。而质谱法作为一种高精度高准确性的检测方法, 已被应用于单克隆抗体类生物药物生产工艺中HCP的监测, 可以与ELISA形成互补, 弥补ELISA方法存在的不足, 为生产条件优化、纯化效果验证提供了依据。文中将从样品前处理技术、分离技术以及数据采集技术3个方面介绍近年来质谱技术在单克隆抗体类药物HCP研究中的应用与进展, 为后续质谱法应用于HCP检测研究提供了参考和指导。

【关键词】单克隆抗体类药物; 宿主细胞残留蛋白; 质谱; 质量控制; 检测方法

Application progress of mass spectrometry technology in the detection of host cell proteins in monoclonal antibodies

Ji-Wei YU, Hong-Rui YIN, Hong SHAO

Shanghai Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China

Corresponding author: Hong SHAO, Email: shaohong@smda.sh.cn

【Abstract】 Monoclonal antibodies are a class of biological products with the fastest growth rate in the fields of biotechnology. They are widely used in cancer, autoimmune diseases and other fields due to their advantages of targeting and obvious therapeutic effect. Host cell proteins (HCP) are a class of process impurities that cannot be removed in its production and are easy to cause immunogenicity, and HCP content determination is an important critical quality attribute in the quality control of monoclonal antibody drugs. An enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) is the most common method for HCP quantitation, but it has many limitations. As a high-precision and high-accuracy detection method, mass spectrometry has been applied to the monitoring of HCP in the production process of monoclonal antibody biological drugs, which can complement ELISA, make up for the shortcomings of ELISA method, and provide a basis for optimization of production conditions and verification of

DOI: 10.19960/j.issn.1005-0698.202304011

通信作者: 邵泓, 硕士, 主任药师, 硕士研究生导师, Email: shaohong@smda.sh.cn

purification effect. In this paper, we summarized the application and development of mass spectrometry method in the research of monoclonal antibody HCP in recent years from three aspects: sample preparation, sample separation and data acquisition, providing reference and guidance for subsequent research on the application of mass spectrometry to HCP detection.

【Keywords】 Monoclonal antibodies; Host cell proteins; Mass spectrometry; Quality control; Detection method

单克隆抗体 (mAb) 类药物是用于治疗癌症、自身免疫性疾病等的靶向生物治疗药物, 因其良好的治疗效果, 逐步在医疗市场占据重要地位, 并改变了部分疾病的治疗方式^[1-2]。此类药物主要通过基因重组技术生产, 其生产依赖于中国仓鼠卵巢或其他宿主细胞系等生物系统。虽然在生产过程中, 使用多种手段进行分离和纯化, 但是宿主细胞自身分泌表达的宿主细胞残留蛋白 (host cell proteins, HCP) 仍不能被完全去除, 而有少量会残留在终产品中^[3-4]。HCP 的存在可能会导致不同的人体反应, 部分 HCP 由于其异源性具有免疫原性, 即使浓度不高, 也可能造成一定的免疫反应^[5], 部分 HCP 可能是人体中本身含有的蛋白, 而这些蛋白的增加可能会引起人体正常的机体反应发生变化, 从而影响药物的安全性^[6-7]。在复杂的 HCP 群中还存在蛋白酶类物质, 此类蛋白会参与到 mAb 蛋白的折叠或者水解过程, 破坏了药物的稳定性^[8-10]。因此, HCP 一直作为 mAb 类药物的一个关键质量属性而被严格控制。

美国食品药品监督管理局 (FDA) 要求单抗类产品中 HCP 含量应该控制在 $100 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ 以下^[11]。目前已有多种方法可用于 HCP 的检测, 其中主要包括: 酶联免疫法 (ELISA)、二维荧光差异凝胶电泳法 (2D-DIGE)、蛋白质印记法 (Western blot)、邻位连接分析法 (PLA) 以及质谱法等。其中 ELISA 法是目前应用最广泛的 HCP 残留检测方法, 已批准上市的单抗类制品的质量标准中均采用 ELISA 的方法用于 HCP 含量的检测^[12]。

通过将宿主细胞裂解蛋白或者培养基中上清液注射到动物体内产生免疫, 获得用于 HCP 测定的多克隆抗体, 但并不是所有 HCP 都能与生产的多克隆抗体产生免疫反应, 因此 ELISA 法不能覆盖所有 HCP^[1-2]。另外, ELISA 法仅能提供 HCP 中蛋白的总量, 不能提供 HCP 中具体蛋白质的种类信息^[13-14]。2D-DIGE、Western blot、PLA 等方法主要用于工艺开发中 HCP 的监测^[15-17], 以及工艺参数的优化和调整, 但由于操作复杂、灵敏度差、成本高等缺点, 应用相对较少^[18-19]。而随着质谱技术的不断发展, 高分辨率质谱仪器的出现为质谱技术在 HCP 检测中的应用提供了可能, 目前质谱技术已是单抗类制品中工艺开发常用的技术之一。与 ELISA 等方法相比, 质谱技术可以提供 HCP 中单个蛋白的信息, 是对 ELISA 方法很好的补充^[20-22]。质谱法用于 mAb 类药物中 HCP 检测是采用蛋白质组学分析的理念, 将蛋白裂解为肽段后, 在肽段水平进行检测, 分析流程大致分为: 样品前处理、样品分离、数据采集与分析 (图 1)。由于 HCP 的含量较低, 为了实现 HCP 的检测, 每步分析流程中又有其特殊性, 因此本文对质谱法在 mAb 类药物中 HCP 检测的进展做了总结和阐述。其中质谱数据分析是基于搜索软件的数据库检索, 虽然不同的软件算法可能不同, 但最终结果差异并不大, 在此对于数据分析不做过多的介绍, 主要从样品前处理技术、分离技术、质谱数据采集技术 3 个方面进行介绍。

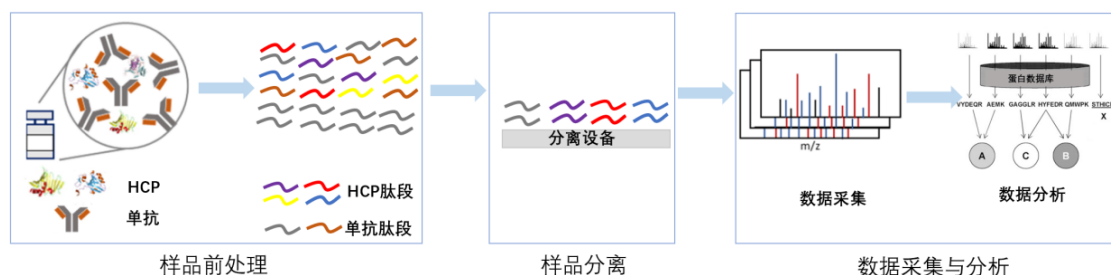


图1 基于质谱法的HCP检测流程图

Figure 1. Flow chart for mass spectrometry based on HCP detection

1 样品前处理

由于经过多步的工艺纯化, mAb 类制品中 HCP 浓度与主成分之间相差约 5~6 个数量级, 在使用质谱分析时, 高浓度的主成分必然会掩盖 HCP 的信号, 导致 HCP 的鉴定结果差。选择合适的样品前处理方法, 减少质谱检测时主成分信号的干扰, 对于 HCP 的检测尤为重要。

目前常用的样品前处理方法主要有 3 种。

1.1 富集 HCP

mAb 蛋白的相对分子质量普遍在 150 kDa 以上, 与 HCP 的相对分子质量相差较大, 可以通过相对分子质量截留过滤 (MWC0) 的方式对其进行富集。Chen 等^[23]利用 50 kDa 超滤管对样品进行预处理, 使相对分子质量较大的 mAb 蛋白被截留在超滤管内, 而较小的 HCP 蛋白可自由通过超滤膜, 从而实现主成分的去留, 及 HCP 蛋白的富集。经实验验证, 该方法可以检测低至 $8 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的 HCP, 在对 NIST mAb (一种用于 mAb 样品质量评估的重组人源 IgG 样品标准品) 的分析中检测出 150 多种 HCP。且两次平行实验中, 共同鉴定出的蛋白数占总检出蛋白数 97%, 表明该方法重现性良好, 是一种稳定的质谱前处理方法。但使用 MWC0 技术, 会导致相对分子质量较大的 HCP 流失而不能被检测, 可将该方法与其他方法结合使用, 增加 HCP 检测的覆盖率。Mörtstedt 等^[24]开发了一种命名为“ProteoMiner”的低丰度蛋白富集试剂盒, 其原理是在微球上连接多种配体, 每种蛋白配体数量保持一致, 过量的高浓度蛋白会因无法与配体结合而被除去^[25]。其利用该技术可以特异性筛选 mAb 样品中低丰度的 HCP, 而没有与结合位点结合的那些过量的 mAb 就会被洗脱去除, 从而减少样品中 mAb 蛋白的含量。此方法显著降低了 HCP 与 mAb 药物主成分间的浓度差异, 使 DDA 方法的检测限从 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ 提升到 $30 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$, 部分肽段在质谱中的信号增强百倍之多, 可鉴定出 30 种 HCP, 是未经富集处理样品的一倍。在未使用同位素标记法用于定量情况下, 实验得出标准蛋白的测量浓度与实际蛋白浓度差异程度处于可接受范围内。亲水作用色谱 (HILIC) 是一种用来改善在反相色谱中保留较差的极性物质的保留能力的色谱技术。Wang 等^[26]利用 HILIC 进行 mAb

样品初步分离, 将样品分离为主峰前、主峰和主峰后 3 组。主峰前样品因为没有了 mAb 蛋白干扰更加易于检出, 此方法在 NIST mAb 中鉴定出 20 种以往方法未能鉴定到的 HCP, 对于添加 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ 浓度 HCPs 的 BMS mAb (一种人源 IgG mAb 样品), 检测到 83 种 HCPs。此方法使用难度较低, 可以在大多数质谱实验室完成, 是样品前处理的一种新选择。

1.2 改变酶解条件

mAb 蛋白与 HCP 相比, 空间结构较为复杂, 在保持其空间结构的条件下, 更难被酶解。可利用两者差异, 改变酶解条件, 降低高浓度主成分肽段信号对 HCP 肽段信号的干扰。Huang 等^[27]对样品不预先进行变性处理, 直接用胰蛋白酶处理样品后进行还原, 然后用热变性方法沉淀 mAb 蛋白, 降低酶解出的 HCP 肽段浓度与 mAb 蛋白肽段浓度差距。此方法在 mAb 浓度为 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 制剂中, 检测限低至 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$, 在 NIST mAb 中检测出 46 种传统变性酶解方法未检测到的 HCP。该方法加入的标准蛋白回收率在 98%~169% 之间, 虽然不能精准定量每种蛋白, 但定量结果足以支持纯化工艺的开发。在以往的方法中, 为了使蛋白质酶解完全, 一般会添加过量的酶进行酶解, 但是这种方法会导致 mAb 蛋白过量酶解, 增加了 mAb 信号对 HCP 信号的干扰。Nie 等^[28]在样品不预先进行变性处理条件下, 以 1:10 000 (酶:蛋白, W/W) 的比例添加胰蛋白酶进行酶解。此方法可以有效避免过量 mAb 蛋白被酶解, 使背景干扰减小。此方法可稳定检出浓度为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mg}^{-1}$ 以上 HCP, 在 NIST mAb 中检出 453 种蛋白, 远高于其他方法, 为样品前处理提供了新思路。

1.3 改变变性剂选择

脱氧胆酸钠 (SDC) 是常用于溶解膜蛋白的阴离子型表面活性剂, 与其他盐类相比与酶类有更好的相容性。Li 等^[29]使用 SDC 对样品进行变性处理, 在样品还原烷基化、酶解后加入甲酸酸化, 酸化后 SDC 不稳定发生沉淀, 离心处理后即可被去除, 无需额外除盐步骤, 取上清液即可进行质谱分析。以 7-STD (7 种商用蛋白质, 常用于模拟 HCP) 和 48 UPS-1 (通用蛋白质组学标准蛋白样品) 分别模拟 mAb 样品中残留的 HCP 进行检测, 此方法能够在不同条件下检测出

10 ng · mg⁻¹ 以上浓度所有蛋白, 且平行实验中 7-STD 检出肽段数量的 RSD 值为 9.8%, 变异度较小。这种新方法与以往方法性能相似, 因为减少了除盐步骤, 节省了处理时间, 且减少了除盐过程中蛋白损失。这种 SDC 变性方法是一种快速、稳定的 HCP 前处理方法, 在 HCP 检测中有着良好前景。

2 分离技术

mAb 样品中蛋白种类较多, 在质谱分析前对其进行有效的分离, 使不同蛋白在不同时间被电离产生信号, 可以提高检测灵敏度。目前常用分离方式主要包括液相色谱法 (LC) 和毛细管电泳法 (CE)。其中 LC 是使用时间最久, 也是最常见的分离技术。

Walker 等^[30] 利用 Waters Acquity H-class Bio UHPLC 一维液相系统对添加了 48 UPS-1 模拟样品进行了分离, 在 2 个月以内的 5 次 LC-MS 分析中, 5 种不同的肽段保留时间的平均相对标准偏差为 1.1%, 表明 LC 分离具有良好的重现性。此方法可以对低至 10 ng · mg⁻¹ 的蛋白进行定量分析。但一维色谱分离通常具有大约 3 个数量级的分离能力, 难以分离复杂的蛋白质样品。二维色谱的分离能力就显著高于一维色谱, 一段时间内, 这种以时间换取检测能力的分离方式是 HCP 检测的主流分离方式。Doneanu 等^[31] 先使用 C₁₈ 反相色谱柱进行第一维高 pH (pH=10) 分离, 再使用 C₁₈ BEH300 反相色谱柱进行第二维低 pH (pH=2.4) 分离, 两维分离系统 pH 值、流动相等色谱参数完全不同, 在分离能力上形成了正交, 从磷酸化酪氨酸抗体 (PTG1 mAb) 样品中共鉴定出 33 种 HCP。然而此方法的低通量严重限制了该方法在实际中应用, 目前已较少采用该方法进行分离。Yang 等^[32] 使用一维离线色谱对样品进行了初步分离, 收集出的馏分使用 LC-MS 联用技术进行第二维的色谱分离和质谱鉴定。该方法在 10 ng · mg⁻¹ 浓度水平的 HCP 检出率可达 90%。但为了提高低丰度 HCP 的检出量, 一般会增加 LC 的分离时间, 难以达到真正高通量分析。为克服以上不足, 高通量蛋白组学分离系统 Evosep One LC 应运而生。此液相系统同时具备高低压双重管路系统设计、样品洗脱和梯度预存储技术, 低压泵用于洗脱 Evotip 中的样本和进行下一梯度

的预设, 高压泵用于将存储环中的液体推入与质谱相连的分析柱中, 无需设置样品间平衡时间, 能够大幅度减少 LC 分析时间, 使质谱发挥出自身最大性能。Ma 等^[33] 把 Evosep ONE LC 分离系统与 Orbitrap Lumos 质谱仪相结合, 色谱分离时间从以往的数小时降低到 21 min, 在 NIST mAb 中可以检测出 55 种 HCP, 检测限低至 0.1 ng · mg⁻¹, 在 3 次平行试验中, 共同检出的 HCP 占总数的 80% 以上, 有两组共同检出的 HCPs 占总数 90% 以上, 表明该方法重现性良好。此外, 在追求高覆盖率的 3 h 长梯度分离时间方案中, 能检出多达 171 种 HCPs。

CE 法也是一种出色的分离方法, 具有高灵敏度、高分析效率、低样品损耗等优点^[34]。近年来, 由于 CE-MS 技术的发展, 使毛细管区带电泳方法在 HCP 检测中逐渐占有一席之地^[35]。与 UPLC 方法相比, 其运行时间短、分离效率高且需要的样品量小, 使其在较少量的样品分析中有较大优势。Zhang 等^[36] 使用了 CZE-MS 方法鉴定 CHO K1SV 株原液中的 HCP, 并对其进行了定量分析。结果表明, 此方法可以在 100 ng · mg⁻¹ 水平上检测到肽段, 且在 50 ng 进样量的条件下检出的肽段数与使用 UPLC 分离方法进样量为 1 μg 条件下相似。在 mAb 样品分析中, 不去除 mAb 进行分析时共鉴定出 191 个蛋白, 在去除 mAb 进行分析时鉴定出 222 个蛋白, 其中有 24 种蛋白只存在于不去除 mAb 组, 表明其可能与 mAb 蛋白存在相互作用。

3 数据采集模式

过去 10 年间, 质谱采集技术的发展也推动着 HCP 检测研究发展, 质谱数据采集模式可以分为两大类: 数据依赖性采集 (DDA) 和数据非依赖性采集 (DIA)。

DDA 即数据依赖性采集模式, 在这种模式下质谱根据离子化的肽段母离子强度, 一次选择多个强度最大的离子进行二次碎裂^[37], 可以同时获得一级质谱和二级质谱信息。Yang 等^[32] 使用 DDA 模式对 2D-LC 分离的样品进行质谱检测, 在 48 UPS-1 样品中检测出 35 种蛋白, 检测限低至 10 ng · mg⁻¹。Ma 等^[33] 使用 top10 DDA 方法对 NIST mAb 样品进行质谱检测, 共检出 55 种 HCP。由于 DDA 方法不对离子进行筛选, 只能

收集到强度较高的离子信号，导致结果重复性较差且灵敏度较低。随着高分辨率高灵敏度质谱仪器的出现，以及针对性较强的样品前处理方法开发应用，使以上情况得到改观，DDA方法仍旧在HCP检测领域占有一席之地。

DIA模式可以将一定范围质量数母离子全部打碎，从而采集到更为丰富的碎片离子^[38-39]。常见的DIA采集模式有全信息串联（MS^E）、所有理论碎片离子的连续窗口采集（SWATH）、平行反应监测（PRM）、多反应监测（MRM）等。MS^E模式下质谱会同时采集所有母离子的碎片离子，这样就有效避免了由于DDA导致的信息不全，低丰度信号难以检测到等问题。Farrell等^[40]将2D-LC与质谱联用，使用MS^E模式进行数据采集用于HCP的定量分析。经验证，该方法最低可检测浓度低至9 ng·mg⁻¹的HCP，且在浓度为9~273 ng·mg⁻¹范围内HCP提取离子（EIC）峰面积与HCP含量线性关系良好。与传统DDA方法相比，检测限更低，且检测到HCP种类更多，但是可能存在短时间内离子信息过多相互干扰等问题。SWATH不同于MS^E方法使用的单个 m/z 采集窗口，SWATH技术将扫描分为多个窗口进行，由于窗口较小，完美解决了隔离窗口过大引起的杂峰问题。Walker等^[41]利用SWATH技术开发了一种快速准确的1D UPLC-MS/MS工作流程，用于工艺生产中的HCP清除率监测。检测限最低可达5 ng·mg⁻¹，与DDA方法相比，该方法灵敏度提高了5倍。此方法因为不需要额外的2D-LC分离过程，实现了高效快速灵敏的HCP定性定量分析。

DIA方法因本身筛选离子较多信号干扰严重，导致难以实现高通量高准确的定量分析，MRM法基于目标蛋白的特定母离子和子离子对实现定量分析，通过对母离子和子离子的双重筛选，可去除干扰离子，提高灵敏度，可以实现对目标蛋白进行较为精准的定量分析。Gao等^[42]利用

MRM方法建立了一套用于定量检测mAb生产中高危蛋白的实验流程。在不同样品中添加磷脂酶B2（PLBL2）和溶酶体磷脂酶（A2LPLA2）两种常见的具有免疫原性的HCP，经验证这两种HCP在32~735 ng·mg⁻¹浓度范围内浓度与信号强度比值线性良好，定量结果较为准确。PRM是MRM的衍生技术，此技术仅预先设定母离子，对子离子信号全部进行采集，相比MRM有更好的定量准确性。Kreimer等^[43]建立了一种新型的PRM流程用于工业生产中HCP精准定性定量分析。首先使用DIA流程建立蛋白数据库，然后使用PRM方法进行定性和定量分析，可完成2.5 ng·mg⁻¹以上浓度蛋白的准确定量分析。Meier等^[44]发展了一种新型数据采集模式：BoxCar，此种方法其将质谱一级扫描分为相隔窗口，每个窗口都设置最大离子容量以及最大注入时间，这样就能使高浓度信号的掩盖效应仅发生在一个窗口内。之后这些离子在C-Trap中贮存，达到设定的数目后，进入Orbitrap进行扫描，由于C-Trap储存离子总量被设置为固定值，低丰度离子可以通过延长注入时间增大丰度，从而提高质谱检测灵敏度。Nie等^[28]利用BoxCar数据采集模式进行了单抗样品的分析，在NIST单抗mAb标准品中鉴定出453种HCP，检测限低至0.5 ng·mg⁻¹，与传统方法差别巨大。BoxCar方法有效实现了对HCP检测的深度覆盖，在未来有着巨大发展潜力。

4 小结

随着基因工程制药行业迅速发展，对mAb类药品的质量要求也日益严格。HCP含量作为mAb类药物质量控制中的一个关键质量属性，一直被严格控制。现有多种用于HCP检测的方法因为其无法克服的局限性已难以满足检验需要，质谱技术因其本身的优势逐步在HCP检测领域受到关注。本文从样品前处理、分离技术以及质谱数据采集模式等方面介绍了目前质谱技术在HCP研究

表1 HCP检测中各类检测技术小结

Table 1. Summary table of detection techniques in HCP testing

类别	名称	用途	限制
样品前处理	MWCO	小分子蛋白富集	部分大分子蛋白缺失
	ProteoMiner	清除高浓度mAb	操作繁琐，成本较高
	SDC	减少除盐步骤，辅助酶解	变性条件导致单抗过多酶解，影响HCP信号
	HILIC	降低HCP与单抗相互作用，减少mAb信号干扰	所需样品量较大，使用受限

续表1

类别	名称	用途	限制
分离方式	LC	初步分离蛋白	分离程度有限
	2D-LC	深度分离蛋白	通量低, 耗时长
	Evosep One LC	减少色谱分离时间	无法实现自动进样
	CZE	分离小体积样品	装载量低
数据采集模式	DDA	最常见采集模式, 设置简单	取样随机, 重现性较差
	MSE	弥补DDA方法取样随机问题	二级谱图可能会有其他母离子干扰
	SWATH	大规模相对绝对定量	对数据库准确性要求较高
	MRM	多种蛋白质的同时定量	需要准确设置母离子子离子参数
	PRM	复杂样品的精准定量	分析肽段的数量过大时, 需要精细调整质谱采集参数
	BoxCar	优化一级谱图, 减少高丰度离子干扰	定量方法存疑

中的应用 (表 1) 和进展。虽然, 质谱技术还不能够替代 ELISA 法用于单抗终产品的质控, 但是其可以对 ELISA 的结果进行很好的补充, 并且由于其开发的便捷性已被应用到了 mAb 类药物的工艺开发。

参考文献

- 1 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): 2550-2557. [Wang ZM. Detection and control of host cell proteins in genetic engineering pharmaceuticals[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2016, 25(22): 2550-2557.] <https://d.wanfangdata.com.cn/periodical/zgxyzz201622005>.
- 2 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): 1533-1541. [Cui XL, Zhu T, Ying WT. Research progress on host cell proteins of genetically engineered pharmaceuticals[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2019, 39(9): 1533-1541.] DOI: 10.16155/j.0254-1793.2019.09.01.
- 3 Ahluwalia D, Dhillon H, Slaney T, et al. Identification of a host cell protein impurity in therapeutic protein, P1[J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 141: 32-38. DOI: 10.1016/j.jpba.2017.03.065.
- 4 Gilgunn S, Bones J. Challenges to industrial mAb bioprocessing—removal of host cell proteins in CHO cell bioprocesses[J]. Curr Opin Chem Eng, 2018, 22: 98-106. DOI: 10.1016/j.coche.2018.08.001.
- 5 Jawa V, Joubert KM, Zhang QC, et al. Evaluating immunogenicity risk due to host cell protein impurities in antibody-based biotherapeutics[J]. AAPS J, 2016, 18(6): 1439-1452. DOI: 10.1208/s12248-016-9948-4.
- 6 Dixit N, Miller NS, Salinas PA, et al. Residual host cell protein promotes polysorbate 20 degradation in a sulfatase drug product leading to free fatty acid particles[J]. Pharm Sci, 2016, 105: 1657-1666. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.02.029.
- 7 Gutiérrez AH, Moise L, Groot AD, et al. A new perspective on host cell proteins[J]. Hum Vaccin Immunother, 2012, 8(9): 1172-1174. DOI: 10.4161/hv.22378.
- 8 Hall T, Sandefur SL, Frye CC, et al. Polysorbates 20 and 80 degradation by group XV lysosomal phospholipase A2 isomer X1 in monoclonal antibody formulations[J]. Pharm Sci, 2016, 105: 1633-1642. DOI: 10.1016/j.xphs.2016.02.022.
- 9 Valente KN, Levy NE, Min L, et al. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations[J]. Biotechnol Bioeng, 2017, 114: 1006-1015. DOI: 10.1002/bit.26237.
- 10 Wei W, Arun AI, Broly H, et al. Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: identification of a CHO cathepsin D protease[J]. Biotechnol Bioeng, 2009, 104: 1132-1141. DOI: 10.1002/bit.22494.
- 11 Chon JH, Zarbis-Papastoitsis G. Advances in the production and downstream processing of antibodies[J]. New Biotechnol, 2011, 28: 458-463. DOI: 10.1016/j.nbt.2011.03.015.
- 12 Zhu-Shimoni J, Yu C, Nishihara J, et al. Host cell protein

- testing by ELISAs and the use of orthogonal methods[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(12): 2367–2379. DOI: 10.1002/bit.25327.
- 13 刘国芳, 刘晓志, 高健, 等. 宿主细胞残留蛋白质对单克隆抗体药物质量影响及其质量控制 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, 39(10): 105–111. [Liu GF, Liu XZ, Gao J, et al. Host cell residues protein against monoclonal antibody drug quality Influence and quality control[J]. *China Biotechnology*, 2019, 39(10): 105–111.] DOI: 10.13523 /j.cb.20191013.
- 14 Zhang QC, Goetze AM, Cui HC, et al. Characterization of the coelution of host cell proteins with monoclonal antibodies during protein a purification[J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32(3): 707–718. DOI: 10.1002/btpr.2272.
- 15 Anne LT, Julita K, Bates R, et al. Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing – methods and applications[J]. *Biotechnol J*, 2013, 8: 655–670. DOI: 10.1002/biot.201200018.
- 16 Julita K, Grzeskowiak AT, Jungbauer A, et al. 2–D DIGE to expedite downstream process development for human monoclonal antibody purification[J]. *Protein Expression Purif*, 2009, 66: 58–65. DOI: 10.1016/j.pep.2009.01.007.
- 17 Liu N, Brevnov M, Furtado M, et al. Host cellular protein quantification: using an automated solid–phase proximity ligation assay[J]. *Bio Process Int*, 2012, 10: 44. DOI: 10.3389/fonc.2016.00055.
- 18 Bracewell DG, Francis R, Smales CM, et al. The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk–based management for their control[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112: 1727–1737. DOI: 10.1002/bit.25628.
- 19 Catherine EM, Daniel G, Mark S. Measurement and control of host cell proteins (HCPs) in CHO cell bioprocesses[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30: 153–160. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.017.
- 20 Pezzini J, Joucla G, Gantier R, et al. Antibody capture by mixed–mode chromatography: a comprehensive study from determination of optimal purification conditions to identification of contaminating host cell proteins[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218: 8197–8208. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.036.
- 21 Matthew RS, Gregory CF, Andrew MG, et al. Identification and quantification of host cell protein impurities in biotherapeutics using mass spectrometry[J]. *Anal Biochem*, 2012, 428: 50–157. DOI: 10.1016/j.ab.2012.05.018.
- 22 范雯婷, 朱为. 生物制品中的残留宿主细胞蛋白及其检测方法 [J]. *国际生物制品学杂志*, 2018, 41(4): 175–179. [Fan WT, Zhu W. Residual host cell protein and their detection methods in biological products[J]. *International Journal of Biologicals*, 2018, 41(4): 175–179.] DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673–4211.2018.04.005.
- 23 Chen IH, Xiao H, Daly T, et al. Improved host cell protein analysis in monoclonal antibody products through molecular weight cut off enrichment[J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 3751–3757. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05081.
- 24 Mörtstedt H, Makower A, Edlund P, et al. Improved identification of host cell proteins in a protein biopharmaceutical by LC – MS/MS using the ProteoMiner™ Enrichment Kit[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 185: 113256. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113256.
- 25 Chen I, Xiao H, Li N, et al. Improved host cell protein analysis in monoclonal antibody products through ProteoMiner[J]. *Anal Biochem*, 2020, 610: 113972 DOI: 10.1016/j.ab.2020.113972.
- 26 Wang Q, Slaney TR, Wu W, et al. Enhancing host–cell protein detection in protein therapeutics using HILIC enrichment and proteomic Analysis[J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 10327–10335. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c00360.
- 27 Huang LH, Wang N, Mitchell CE, et al. A novel sample preparation for shotgun proteomics characterization of HCPs in antibodies[J]. *Anal Chem*, 2017, 89: 5436–5444. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00304.
- 28 Nie S, Greer T, Johnson RO, et al. Simple and sensitive method for deep profiling of host cell proteins in therapeutic antibodies by combining ultra–low trypsin concentration digestion, long chromatographic gradients, and BoxCar mass spectrometry acquisition[J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 4382–4390. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c03931.
- 29 Li D, Farchone A, Zhu Q, et al. Fast, robust, and sensitive identification of residual host cell proteins in recombinant monoclonal antibodies using sodium deoxycholate assisted digestion[J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 11888–11894. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02258.
- 30 Walker DE, Yang F, Carver J, et al. A modular and adaptive mass spectrometry–based platform for support of bioprocess development toward optimal host cell

- protein clearance[J]. *MABS*, 2017, 9(4): 654–663. DOI: 10.1080/19420862.2017.1303023.
- 31 Doneanu CE, Xenopoulos A, Fadgen K, et al. Analysis of host-cell proteins in biotherapeutic proteins by comprehensive online two dimensional liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *MAbs*, 2016, 4(1): 24–44. DOI: 10.4161/mabs.4.1.18748.
- 32 Yang F, Walker DE, Schoenfelder J, et al. A 2D LC-MS/MS strategy for reliable detection of 10-ppm level residual host cell proteins in therapeutic antibodies[J]. *Anal Chem*, 2018, 90: 13365–13372. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03044.
- 33 Ma J, Kilby GW. Sensitive, rapid, robust, and reproducible workflow for host cell protein profiling in biopharmaceutical process development[J]. *Proteome Res*, 2020, 19: 3396–3404. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00252.
- 34 Kumar R, Shah RL, Ahmad S, et al. Harnessing the power of electrophoresis and chromatography: offline coupling of reverse phase liquid chromatography capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry for analysis of host cell proteins in monoclonal antibody producing CHO cell line[J]. *Electrophoresis*, 2021, 42: 735–741. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.460954.
- 35 王芳, 王松, 从海林, 等. 基于毛细管电泳-质谱联用技术的代谢/蛋白质组学分析[J]. *色谱*, 2020, 38(9): 1013–1021. [Wang F, Wang S, Cong LH, et al. Analysis of metabolomics and proteomics based on capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2020, 38(9): 1013–1021.] DOI: 10.3724/SP.J.1123.2020.02025.
- 36 Zhang ZB, Albanetti T, Linkous T, et al. Comprehensive analysis of host cell impurities in monoclonal antibodies with improved sensitivity by capillary zone electrophoresis mass spectrometry[J]. *Electrophoresis*, 2017, 38: 401–407. DOI: 10.1002/elps.201600390.
- 37 Huang Y, Molden R, Hu MQ, et al. Toward unbiased identification and comparative quantification of host cell protein impurities by automated iterative LC-MS/MS (HCP-AIMS) for therapeutic protein development[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 200: 114069. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114069.
- 38 Pythoud N, Bons J, Mijola G, et al. Optimized sample preparation and data processing of data independent acquisition methods for the robust quantification of trace-level host cell protein impurities in antibody drug products[J]. *Proteome Res*, 2021, 20: 923–931. DOI: 10.1021/acs.jproteome.0c00664.
- 39 Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis[J]. *Cellular Proteomics*, 2012, 11(10): 1–17. DOI: 10.1074/mcp.0111.016717.
- 40 Farrell A, Mittermayr S, Morrissey B, et al. Quantitative host cell protein analysis using two dimensional data independent LC-MSE[J]. *Anal Chem*, 2015, 87: 9186–9193. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01377.
- 41 Walker DE, Yang F, Carver J, et al. A modular and adaptive mass spectrometry-based platform for support of bioprocess development toward optimal host cell protein clearance[J]. *MABS*, 2017, 9(4): 654–663. DOI: 10.1080/19420862.2017.1303023.
- 42 Gao XL, Rawal B, Wang Y, et al. Targeted host cell protein quantification by LC-MRM enables biologics processing and product characterization[J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 1007–1015. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b03952.
- 43 Kreimer S, Gao YW, Ray S, et al. Host cell protein profiling by targeted and untargeted analysis of data independent acquisition mass spectrometry data with parallel reaction monitoring verification[J]. *Anal Chem*, 2017, 89: 5294–5302. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04892.
- 44 Meier F, Geyer FE, Winter SV, et al. BoxCar acquisition method enables single-shot proteomics at a depth of 10,000 proteins in 100 minutes[J]. *Nat Methods*, 2018, 15: 440–448. DOI: 10.1038/s41592-018-0003-5.

收稿日期: 2022 年 11 月 01 日 修回日期: 2023 年 02 月 14 日
本文编辑: 周璐敏 钟巧妮