

· 实验研究 ·

应用免疫磁珠捕获技术分析宿主细胞蛋白抗体覆盖率

豆敏华,陈秋燕,张宏声,邵宇皓,马全刚,杨志行*

(湖州申科生物技术股份有限公司,湖州 313000)

[摘要] **目的:**建立并应用基于免疫磁珠捕获分离(immunomagnetic beads separation, IMBS)技术的宿主细胞蛋白(host cell protein, HCP)抗体覆盖率分析方法。**方法:**首先,建立和优化IMBS方法,包括HCP抗体磁珠偶联、洗涤和洗脱条件关键步骤。其次,针对二维电泳实验部分,设计等电聚焦质控和银染质控,并建立IMBS处理后的样品前处理方法,可用于LC-MS/MS分析,计算HCP抗体覆盖率。**结果:**优化确定IMBS覆盖率方法步骤,相对0.5 mg抗体,采用500 μL磁珠偶联使HCP抗体的捕获效率最高,通过8次洗涤消除非特异性结合HCP,3次洗脱步骤充分收获结合的HCP。开发基于荧光标记多肽的2种等电聚焦质控品和银染灵敏度质控品,可以有效监控二维电泳实验过程。MS法具有较高的分辨率和测量精度,采用IMBS结合MS法可以识别到更多的HCPs,表现出来的覆盖率也高于IMBS结合二维电泳的方法;同时,IMBS结合MS法还可以通过识别高风险HCPs评估抗体的性能。**结论:**本研究建立稳定可靠的IMBS-2DE方法和IMBS-LC/MS/MS方法用于分析HCP抗体覆盖率,2个技术平台获得的抗体覆盖率水平由于分析灵敏度的不同导致结果有较大的差异。

[关键词] 宿主细胞蛋白;抗体覆盖率;二维电泳;LC-MS/MS分析

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2024)21-2290-09

Analysis of anti-host cell protein antibody coverage rate by the immunomagnetic beads separation technique

DOU Min-hua, CHEN Qiu-yan, ZHANG Hong-sheng, SHAO Yu-hao, MA Quan-gang, YANG Zhi-xing*

(Huzhou Shenke Biotechnology Co., Ltd., Huzhou 313000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an immunomagnetic beads separation (IMBS) method for the application in the analysis of host cell protein (HCP) antibody coverage. **Methods:** Firstly, the IMBS method was developed and optimized, including key steps such as HCP antibody magnetic bead coupling, washing, and elution conditions. Secondly, for the two-dimensional electrophoresis experiments, isoelectric focusing and silver staining quality control materials were designed, and a sample pre-processing method was also established for IMBS-treated samples. The developed methods are applicable to LC-MS/MS to calculate the HCP antibody coverage. **Results:** The optimized IMBS method was developed and the highest capture efficiency of HCP antibody was achieved by coupling 500 μL magnetic beads with 0.5 mg antibody. Eight washing steps were employed to eliminate nonspecific binding of HCP, and three elution steps were performed to thoroughly harvest bound HCP. Two isoelectric focusing quality control samples based on fluorescently labeled peptides and a silver staining sensitivity control sample were developed to effectively monitor the two-dimensional electrophoresis experiment process. The MS is of high resolution and measurement accuracy. When combining MS with IMBS, more HCPs can be identified than the combination of

[作者简介] 豆敏华,男,硕士,研究方向:生物技术药物质量安全控制技术和产品研究。E-mail: minhuad@shenkebio.com。

[通讯作者] *杨志行,男,高级工程师,研究方向:生物技术药物质量安全控制技术和产品研究。E-mail: zhixingy@shenkebio.com。



2290

中国新药杂志 2024 年第 33 卷第 21 期

IMBS with two-dimensional electrophoresis. Moreover, the coverage demonstrated by the IMBS combined with mass spectrometry method is higher than that of IMBS combined with two-dimensional electrophoresis. Additionally, the IMBS combined with MS can assess antibody performance by recognizing high-risk HCPs. **Conclusion:** IMBS-2DE method and IMBS-LC/MS/MS method, which are stable and reliable, analyzing HCP antibody coverage were established, respectively. As a result, the antibody coverage levels obtained from the two technological platforms showed significant differences due to variations in analytical sensitivity.

[Key words] host cell protein; antibody coverage; two-dimensional electrophoresis; LC-MS/MS

宿主细胞蛋白(host cell proteins, HCPs)是生物制品基于细胞基质生产工艺而带入的一种关键的工艺杂质之一,需要通过下游纯化工艺尽可能去除,以保证生物制品的安全性^[1-4]。目前研究发现HCP会带来诸多危害,包括某些HCP具有高免疫原性,可能诱发人体不良免疫反应^[5-6];类免疫佐剂作用,激发人体对药品本身免疫反应,降低药效^[7];潜在的蛋白酶或“吐温酶”等活性^[8-9],可能导致产品稳定性下降、药效变化等^[10]。因此,HCP往往作为关键质量属性之一进行质量控制。目前,按照《中华人民共和国药典》、美国药典和欧洲药典等各国药典和ICH Q6B等的法规要求,可采用高检测灵敏度和良好特异性的双抗体夹心法进行快速检测,包括酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa)、化学发光免疫法等多种形式,统称HCP免疫检测法^[11-12]。

由于Elisa法具有操作简单、高通量、可自动化等优点,目前是HCP残留检测定量分析的金标准,广泛用于生物制品早期的工艺开发,后期工艺验证和日常批放行检验^[13-16]。HCP是一种多蛋白质混合物,其蛋白种类多、丰度变化大,因此HCP的Elisa法采用多克隆抗体的夹心方法。HCP多克隆抗体是Elisa法优劣的关键原料,评估HCP抗体对HCP的广谱性识别非常重要,尤其是对那些存在于生物制品原液中的潜在HCP。由于HCP蛋白质种类的复杂性,可能存在一些分子量小、免疫原性差的HCPs,在抗体制备中无法免疫产生抗体,或者只能产生单一表位的抗体,导致无法被检测到。因此,对HCP抗体的覆盖率评价是非常重要的,高的抗体覆盖率表明检测结果的可靠性高,降低漏检的风险^[11-12]。

目前,常见的HCP抗体覆盖率分析方法是基于蛋白质电泳技术为基础,如二维电泳。美国药典1132章节宿主细胞蛋白免疫检测方法中描述到可

采用二维电泳结合蛋白质免疫印迹法(two-dimensional electrophoresis Western blot, 2DE-WB),或者采用免疫亲和色谱结合二维电泳染色方法(immunoaffinity chromatography two-dimensional electrophoresis, IAC-2DE),通过最终二维电泳上蛋白质点数的对比匹配分析,计算得到覆盖率^[17]。2DE-WB方法在实际运用中有诸多局限,如结果的重复性差、数据比对分析困难、难以标准化等。WB图上常见大块区域,无法区分具体蛋白识别情况,覆盖率结果主观因素大。此外,该方法电泳条件下HCPs需变性处理,与Elisa检测条件的表位差别较大,导致结果不准确。IAC-2DE方法在原理上更符合Elisa法的实际检测条件,目前一般采用柱层析的方式,但该方法仍存在步骤多,HCP抗体需求量较大、不同实验室的分析结果变异性大等缺陷。随着研究深入,已有研究报道将MS法逐渐用于HCP鉴定和定量分析,包括HCP抗体覆盖率分析^[18-21]。因此,本研究从当前方法的缺点考虑,采用免疫磁珠捕获方法,优化关键步骤,能够使HCP和抗体充分结合,得到更加准确的覆盖率。由于基于电泳分析方法的分析误差较大,本研究同时与MS法的结果进行对比,为2种方法下HCP抗体覆盖率质量标准的确立提供参考数据,推进覆盖率方法的标准化。

材料与方法

1 试剂

快速银染试剂盒(碧云天生物技术有限公司,目录号:P0017S,批号:092420210118);DryStrip Cover Fluid(Cytiva 公司,目录号:17133501,批号:7N012052);ReadyStripTM IPG Strips(Bio-Rad 公司,目录号:1632036,批号:64425229);PierceTM 考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒(Thermo Scientific 公司,目录号:23200,批号:WB317256);Beaver BeadsTM Magrose NHS 琼脂糖磁珠(苏州海狸生物医学工程

有限公司,目录号:70702-50,批号:20211201);3 kDa 超滤管(Merck 公司,目录号:UFC5003,批号:ROMB25761);大肠杆菌(*E. coli*)表达菌 HCP 抗体、*E. coli* 表达菌 HCP 残留检测试剂盒(Elisa 法)、第一向等电聚焦质控品 pI 3、第二向 SDS-PAGE 质控品、*E. coli* 表达菌 HCP(自制)。

2 仪器

Ettan IPG Phor3 Isoelectric Focusing Unit 等电聚焦仪(原 GE Healthcare 公司);Ettan DALTSix Electrophoresis Unit, 220 VAC 大规模垂直电泳系统(原 GE Healthcare 公司);GS800 校正型光密度扫描分析系统(Bio-rad 公司);MX-EL-E 旋转混匀仪[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司];60201 磁性分离器(苏州海狸生物医学工程有限公司);Sapphire™ RG-BNIR 双模式多光谱激光成像系统(Azure Biosystems 公司);Q-Exactive HF Mass Spectrometer 质谱仪(赛默飞世尔科技公司)。

3 IMBS-2DE 方法

3.1 偶联抗体磁珠的制备

分别取一定体积的磁珠,用 1 mmol·L⁻¹ 的 HCL 清洗,加入 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体 0.5 mg,室温混合 2 h。上清液用 Pierce™ 考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。磁珠用封闭液(0.1 mol·L⁻¹ Tris)封闭 2 h,再用超纯水清洗。

3.2 HCP 捕获

每管磁珠加入 2 mg 的 *E. coli* 表达菌 HCP 混合过夜进行 HCP 抗原孵育,弃上清。磁珠用 1 mL 洗涤液(0.05% PBST)清洗 3 遍。每管磁珠用洗脱液(含 6 mol·L⁻¹ 尿素、2 mol·L⁻¹ 硫脲)洗脱 2 次,单次洗脱体积为 300 μL,合并洗脱液,用 3 kDa 的超滤管超滤浓缩至 200 μL。按照考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒说明书,配置牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准曲线,测定洗脱样本的蛋白浓度。

3.3 二维电泳

3.3.1 等电聚焦电泳 取“3.2”项中收获的浓缩样本,加入 5 μL 第一向等电聚焦质控 pI 3,用水化液[含 7 mol·L⁻¹ 尿素、2% (w/v) CHAPS、0.5% (v/v) IPG 缓冲液、18 mmol·L⁻¹ 的二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)和微量溴酚蓝]补足至 340 μL,采用 pH 5 ~ pH 8,18 cm 线性干胶条进行上样。水化结束,胶条在等电聚焦仪(IEF)中升压至 10 000 V,5 h 进行聚焦,聚焦结束,用双模式多光谱激光成像系统对胶条进行扫描。

3.3.2 垂直电泳 配置 SDS-PAGE 梯度胶(12.5%:15% = 2:1),用 DTT 和碘乙酰胺依次平衡,再用 Running Buffer[含 25 mmol·L⁻¹ 的 Tris、0.1% (w/v) SDS、192 mmol·L⁻¹ 甘氨酸]润洗 1 次。将胶条置于 SDS-PAGE 胶的顶端,靠近胶条的孔位两边各加 10 μL 蛋白 Mark,远离胶条的两孔位分别加入 20 和 40 ng 的第二向 SDS-PAGE 质控。设置电压:4 V,1 h;56 V,4 h。电泳结束,将胶转移至 200 mL 固定液[含 50% 乙醇和 10% 乙酸(v/v)]中。

3.4 银染

参照快速银染试剂盒说明书,对固定液中胶进行银染显色,试剂添加量均为每块胶 250 mL。

3.5 覆盖率分析

采用 GS800 校正型光密度扫描分析系统对胶进行灰度扫描,再经 PDQuest 软件对胶上的点进行数点及胶之间匹配分析。

4 磁珠洗涤条件优化

取 4 管 400 μL 磁珠分别与 0.5 mg 的 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体偶联,步骤同“3.1”项,再将偶联抗体的磁珠用 2 mg 的 *E. coli* 表达菌 HCP 孵育过夜,步骤同“3.2”项。孵育结束的磁珠分别用 1,2,4 和 8 mL 的洗涤液重复洗涤 5 次,再用相同体积的超纯水重复洗涤 3 次,用考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒参照说明书对洗涤液进行蛋白浓度检测,并用 *E. coli* 表达菌 HCP 残留检测试剂盒(Elisa 法)检测水洗液中的 HCP 残留。

5 磁珠洗脱条件优化

取 3 管 400 μL 磁珠分别与 0.5 mg 的 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体偶联,步骤同“3.1”项,将偶联抗体的磁珠 2 mg 的 *E. coli* 表达菌 HCP 孵育,步骤同“3.2”项,每管磁珠加入 4 mL 的 0.05% PBST 清洗 5 次,再用 4 mL 的无菌水洗涤 3 次。每管加入 300 μL 洗脱液重复洗脱 5 次。用考马斯(Bradford)蛋白检测试剂盒对洗脱液进行 HCP 蛋白浓度检测。

6 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体覆盖率检测

参照上述优化的 IMBS-二维电泳方法,对申科生物公司的 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体进行覆盖率检测,PDQuest 软件对胶上的点进行数点及胶之间匹配分析。

7 IMBS-MS 抗体覆盖率的检测方法

7.1 HCP 样本 MS 分析前处理

取 3 kDa 超滤管,分别加入 IMBS 处理前后的 *E. coli* 表达菌 HCP 样品,用 300 μL UA Buffer(50

mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃, 8 mmol·L⁻¹ 尿素) 置换 1 次, 超滤换液。加终浓度 50 mmol·L⁻¹ 的 DTT (浓度为 1 mol·L⁻¹ 的 DTT 溶液), 37 °C 还原 90 min, 超滤浓缩。加入终浓度 100 mmol·L⁻¹ 的碘乙酰胺 (IAM), 于暗处反应 30 min, 超滤浓缩。加入终浓度 50 mmol·L⁻¹ 的 DTT 中和 IAM。用 200 μL 的 UA Buffer 置换 2 次。用 50 mmol·L⁻¹ 的 NH₄HCO₃ 200 μL 置换 3 次。吸取出样品到 1.5 mL 离心管 (低吸附), 其中 IMBS-多抗洗脱的样本和参考品样本, 采用考马斯 (Bradford) 方法测定样品浓度。加入 Trypsin (酶: 蛋白 = 1: 25), 酶切 17 h; 随后加入 10% 甲酸, 至甲酸终浓度为 1%。采用氮气吹干后, 用 0.1% 甲酸溶液复溶后上样分析。

7.2 MS 采样及数据分析

7.2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC Peptide BEH C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 55 °C; 样品室温度: 10 °C; 进样量: 25 μL; 流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液, 流动相 B 为含有 0.1% 甲酸的乙腈; 流量: 0.2 mL·min⁻¹ (0 ~ 5 min), 0.1 mL·min⁻¹ (5 ~ 160 min); 梯度洗脱 (0 ~ 7 min, B 相 3%; 7 ~ 15 min, B 相由 3% 升至 8%; 15 ~ 130 min, B 相由 8% 升至 30%; 130 ~ 154 min, B 相由 30% 升至 54%; 154 ~ 155 min, B 相由 54% 升至 90%; 155 ~ 160 min, B 相维持 90%)。

7.2.2 MS 条件 电喷雾离子源 (ESI⁺) 正离子模式下一级全扫描/数据依赖二级离子模式 (Full MS/dd-MS) 扫描, 喷雾电压 3.8 kV, 离子传输管温度 275 °C, Full MS 扫描参数: 分辨率 70 000; 目标自动增益控制 (AGC) 值 3×10^6 ; 最大注入时间 100 ms; 扫描范围质荷比 (*m/z*) 350 ~ 1 500。dd-MS 扫描参数: 分辨率 17 500; 目标 AGC 值 1×10^5 ; 最大注入时间 50 ms; 循环次数 (loop count) 为 10; 最强离子数 (Top N) 为 20; 四极杆隔离窗口 *m/z* 为 2。

7.2.3 数据分析 原始数据导入 Proteome Discov-

erer 2.5 软件进行搜库分析, 数据库为 Uniprot 网站 (<http://www.uniprot.org>) 下载对应的宿主细胞蛋白数据库。设定酰胺甲基化、去酰胺化、氧化、乙酰化修饰方式; 一级母离子质量误差容忍度设为 10 ppm, 二级碎片离子的质量误差容忍度为 0.02 Da, 设置酶切方式为 Trypsin (full) 每条肽段允许最大漏切数目为 2; 设置肽段最小长度为 6 个氨基酸残基。

结 果

1 IMBS-2DE 实验方法建立

1.1 HCP 抗体偶联磁珠及结合比例优化

为确定磁珠与抗体的偶联比例, 取不同量的磁珠偶联抗体, 对抗体流穿液进行蛋白浓度测定, 结果见表 1, 300, 400 和 500 μL 磁珠偶联的抗体量差异较小, 表明 300 μL 磁珠满足抗体偶联量要求。通过对洗脱样本浓度检测结果见表 2, 随着磁珠用量的提高, 洗脱样本的蛋白量也提高。将洗脱样本进行 2D 电泳银染分析, 结果见图 1, 通过 PDQuest 软件分析结果显示, 300 μL 磁珠捕获 HCP 蛋白点数 778 个, 400 μL 磁珠捕获 HCP 蛋白点数 926 个, 而 500 μL 磁珠捕获 HCP 蛋白点数 929 个。相同抗体量偶联不同量的磁珠, 其捕获蛋白总量及蛋白丰度的差异, 可能是抗体在磁珠上的分布差异的, 磁珠用量越大, 抗体偶联磁珠时, 抗体间的距离越大, HCP 结合抗体时的空间越小, 结合的 HCP 量越高。

表 1 HCP 抗体流穿液中免疫磁珠偶联抗体量统计表 (Bradford)

磁珠取样量/μL	浓度均值/mg·mL ⁻¹	SD	CV/%	样品种积/mL	磁珠偶联抗体量/mg
300	0.199	1.93×10^{-2}	9.7	0.25	0.444
400	0.179	2.00×10^{-2}	11.2	0.25	0.449
500	0.132	6.73×10^{-3}	5.1	0.25	0.461

表 2 3 种磁珠取样量下洗脱液中的 HCP 浓度 (Bradford)

磁珠取样量/μL	稀释倍数	浓度均值/mg·mL ⁻¹	SD	CV/%	回算浓度/mg·mL ⁻¹	洗脱体积/mL	HCP 蛋白量/mg
300	4	0.169	1.25×10^{-2}	7.37	0.677	0.203	0.137
400	4	0.160	5.40×10^{-3}	3.38	0.639	0.233	0.149
500	4	0.190	1.30×10^{-2}	6.85	0.758	0.203	0.154

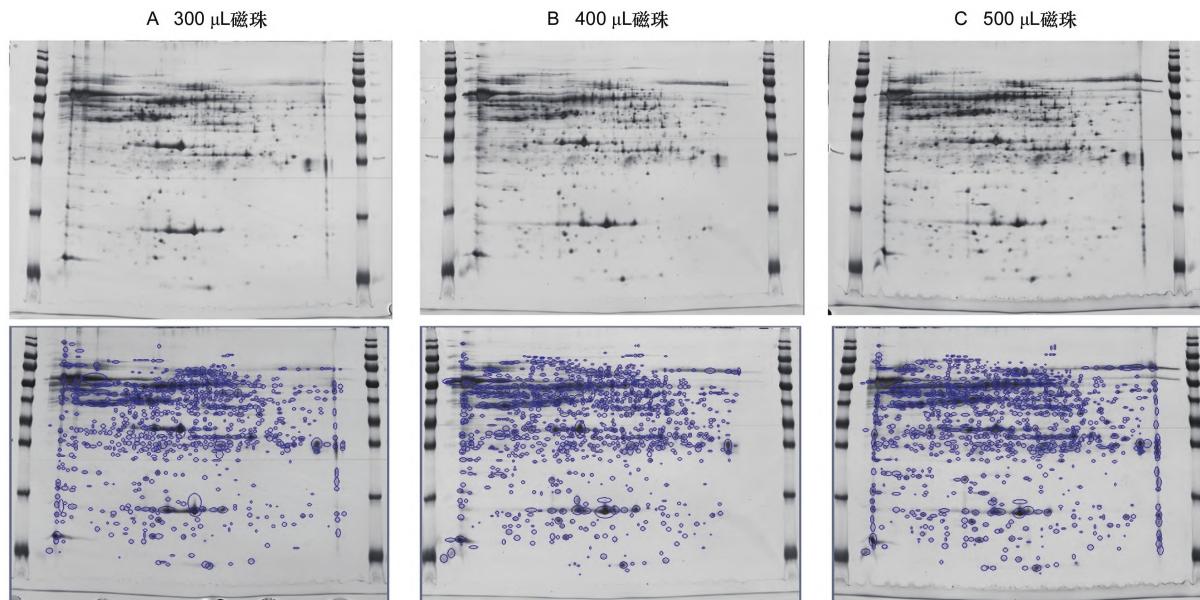


图 1 银染图谱经 PDQuest 分析蛋白点分布图

1.2 磁珠洗涤条件优化

为减少磁珠上的非特异性结合,对洗涤液体积和洗涤次数进行优化,结果见图 2。随着洗涤体积和洗涤次数的增加, HCP 残留量降低。并通过 *E. coli* 表达菌 HCP 残留检测试剂盒(Elisa 法)对水

洗液中 HCP 残留进行测定,结果见图 4。水洗 3 次后,1 和 2 mL 的洗涤液中 HCP 残留量为 119.79 和 10.71 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,而 4 和 8 mL 的洗涤液中 HCP 残留低于 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因此选择 4 mL, 洗涤液清洗 5 次,水洗 3 次,作为洗涤条件较为合适。

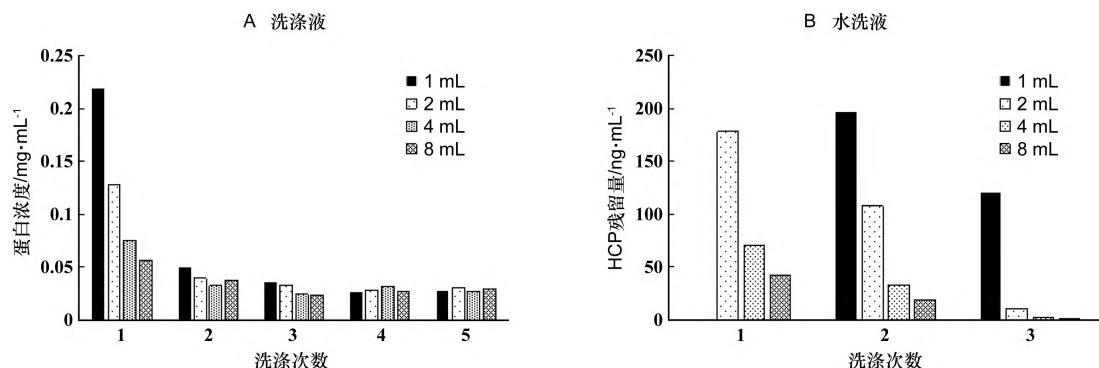


图 2 IMBS 法洗涤效果对比

1.3 磁珠洗脱条件优化

由于 HCP 的复杂性,不同种类蛋白与多克隆抗体间亲和力的存在差异,因此对洗脱次数进行考察,结果见图 3。洗脱次数增加,洗脱液中 HCP 的蛋白浓度降低,第 3 次和第 4 次的洗脱液中 HCP 蛋白浓度差异较小,表明洗脱 3 次后磁珠上蛋白均被洗脱,同时考虑后续样本浓缩,将洗脱次数确定为 3 次。

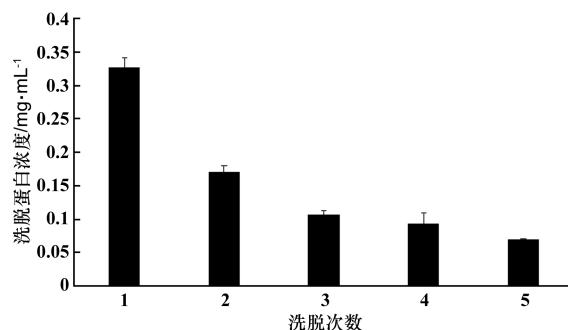


图 3 不同洗脱次数中 HCP 残留量

2 二维电泳实验质控

由于二维电泳实验步骤多,时间跨度大,为了在实验过程中进行控制,在等电聚焦实验部分设计了荧光标记多肽作为内部质控掺入样品一起进行等电聚焦电泳,结束后可直接在荧光扫描仪上成像,快速判断样品聚焦效果。结果如图 4A 所示,在 pH 5~pH 8 的 IEF 胶条上设计一个质控,形成单一条带,

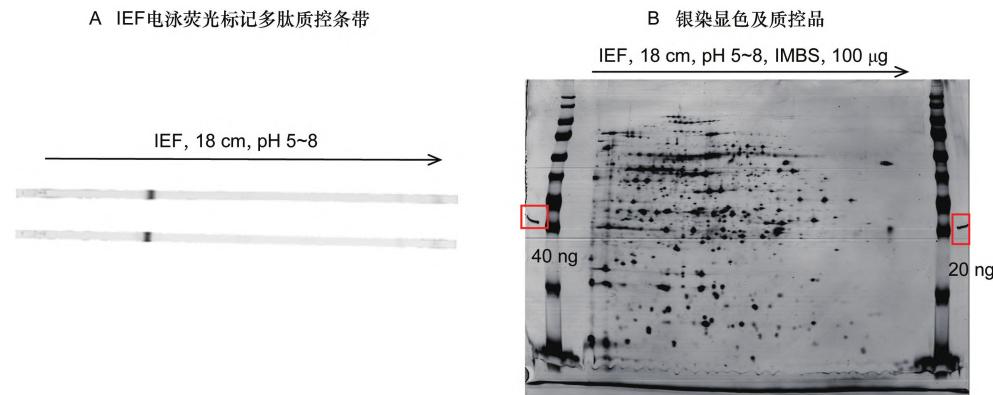


图 4 HCP 抗体结合的 HCP 的 IMBS-2DE 方法银染显色及质控品

3 使用 IMBS-2DE 方法进行抗体覆盖率检测分析

在上述优化步骤后,采用申科生物公司 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体进行覆盖率分析。图 5A 为表达菌样品总 HCP 的分布情况,图 5B 为 HCP 抗体结合的 HCP 分布情况,通过银染显色,扫描成像,在 PDQuest 软件中分析,结果见图 5C,其中表达菌总

同时由于是小肽,在后续垂直电泳过程中会率先跑出,并不影响后续银染的分析。银染过程中由于试剂的差异,需要把握显色时间,确保足够的灵敏度。本研究建立了 20 和 40 ng 这 2 个单独的银染显色质控品,在显色过程中发现 2 个质控品显色即可终止,保证实验足够的灵敏度,同时不至于过曝而影响分析。

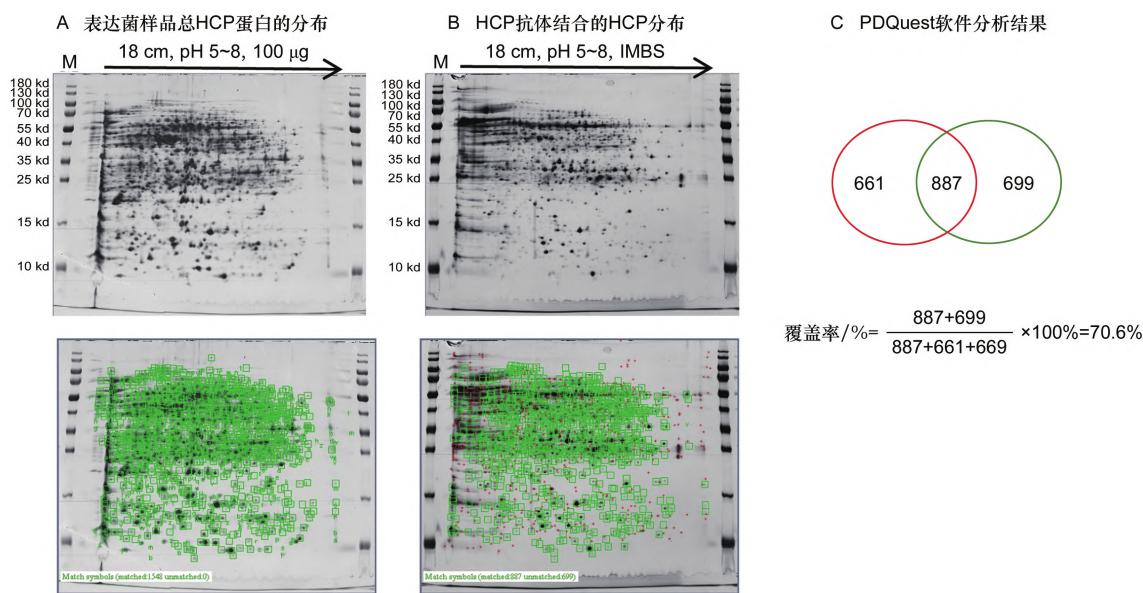


图 5 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体覆盖率分析 (IMBS-2DE 方法)

关于抗体覆盖率的计算方法目前没有统一的标准,如图 5C 的方式是相对保守的计算方法。基于传统的二维电泳技术的覆盖率分析方法包括免疫捕获法和蛋白免疫印迹法等,由于电泳过程导致的 HCP 蛋白显色和识别点数的变异性较大,往往导致用保守方法获得的覆盖率数值偏低。因此,目前也有直接用抗体识别的 HCP 除以样品中 HCP 的方式获得较高的覆盖率,而省去匹配过程,这也是一种相对合理的方式,如本例数据计算可得很高的覆盖率水平。最后,覆盖率的评估是取保守方式和合理方式的区间。

4 IMBS 结合高分辨 MS 进行抗体覆盖率的检测

将 *E. coli* 表达菌 HCP 样品和 HCP 抗体捕获的 HCP 分别进行 MS 前处理,然后进行 LC-MS/MS 分析,采用 1 条特征性肽段鉴定标准,覆盖率分析方法及结果见图 6。图 6A 中 *E. coli* 样品中可鉴定到蛋白质有 1 787 个,HCP 抗体可结合的 HCP 蛋白质有 1 516 个,HCP 抗体无法结合的 HCP 有 273 个,HCP 样品中无法被 MS 检测到的蛋白质有 2 个,覆盖率为 84.8%。图 6B 按照鉴定到的 HCP 蛋白质分子量和等电点信息进行分析得到的模拟二维电泳图,两者具有较高的相似度。

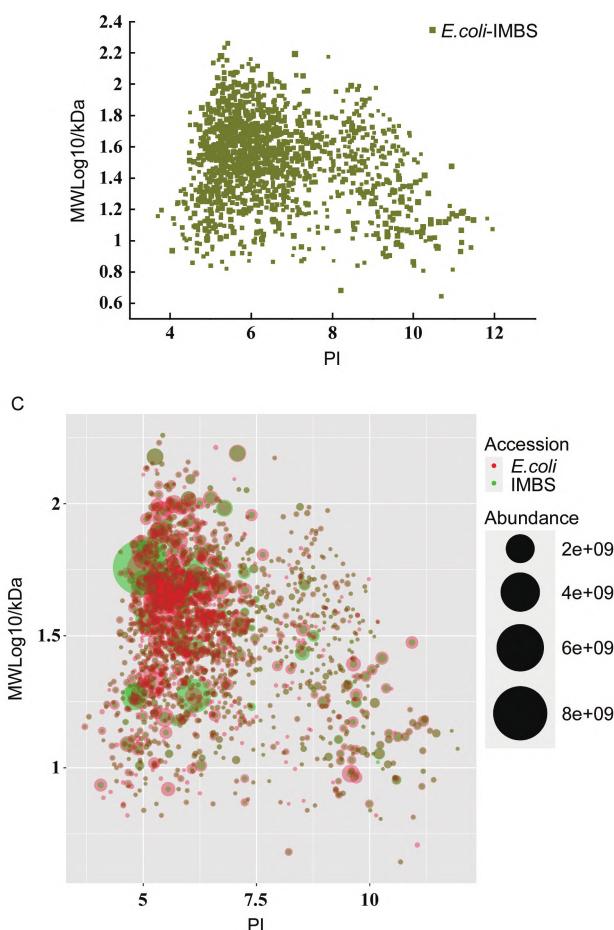
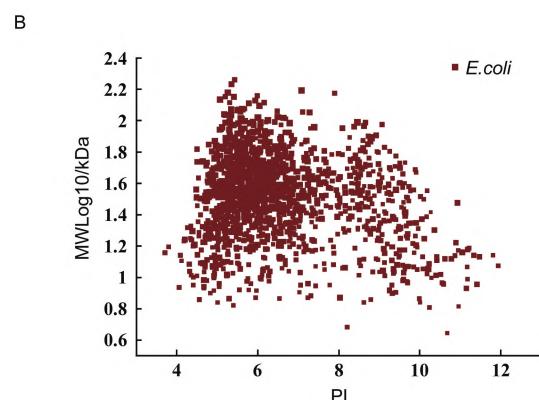
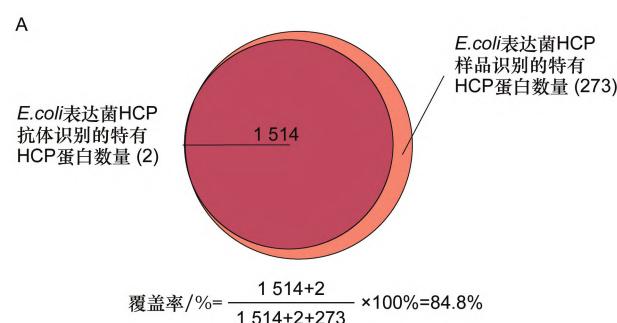


图 6 IMBS-MS 法分析 *E. coli* 表达菌 HCP 抗体覆盖率

相对图 5 的数据对比,MS 法获得的数据更稳定,HCP 样品和抗体识别的 HCP 之间共有的 HCP 占绝大部分,而在抗体识别的 HCP 中特有的 HCP 是极少的,因此也可以直接采用相除的方式进行计算获得覆盖率。

对于 MS 法鉴定蛋白质来说,一个普遍存在的问题是采用多少条特征性肽段。本研究分别通过 1 条,2 条及 3 条以上的条件进行 MS 分析及覆盖率计算,结果见表 3,随着特征性肽段标准的提高,鉴定到的总蛋白数有所减少,但抗体覆盖率数值有提高。从 MS 鉴定的技术原理考虑,提升特征性肽段数量要求,一定程度上使 MS 鉴定结果更可靠。目前,从现有的研究来看,普遍采用至少 2 条特征性肽段作为鉴定的标准。

表3 不同肽段分析条件下覆盖率结果

特征肽段数	HCP 样品中特有蛋白	IMBS 捕获 HCP 中特有蛋白	共有蛋白	覆盖率 /%
≥1	273	2	1 514	84.8
≥2	176	0	1 436	89.1
≥3	108	0	1 333	92.5

5 高风险蛋白的 MS 鉴定

现阶段 HCP 研究表明 HCP 的危害往往来源于

表4 *E. coli* 表达菌 HCP 中常见高风险因子

<i>E. coli</i> 表达菌 HCP 高风险因子	基因名	Uniprot 登录号	潜在风险
核糖磷酸异构酶	<i>rpiB</i>	P37351	佐剂效应 ^[23]
鞭毛蛋白	<i>fliC</i>	P04949	高免疫原性 ^[23-25]
纤维素酶	<i>bcsZ</i>	P37651	水解酶活性, 如引起 EGF 和 TGF-β 细胞外用凝胶制剂黏度变化 ^[26]
寡肽结合蛋白/二肽结合蛋白	<i>OppA/DppA</i>	P23843/P23847	与产品共纯化 ^[27]
热休克蛋白类(包括 GrpE, IbpB/A, HSP15 等)	—	—	佐剂效应 ^[28]

讨 论

在生物制品生产工艺的开发和验证, 原液的放行中 HCP 的去除残留检测是重要的一环, HCP 的 Elisa 方法由于其简单易用且可提供定量信息等特点被广泛使用。HCP 的 Elisa 方法不同于常规的单一分析物的 Elisa 方法, 由于 HCP 的复杂性, 法规规定^[11-12]在方法开发中需要对 HCP 标准品和 HCP 抗体进行充分的评估, 这也是导致 HCP 检测结果差异的 2 个重要因素。HCP 标准品中的蛋白质种类和丰度应该尽可能与实际生产工艺条件样品中的 HCPs 相近, 即要有代表性。HCP 抗体需能覆盖到实际生产工艺条件样品中所有潜在的 HCPs, 降低漏检的风险。因此, 对抗体覆盖率的评价非常重要。

目前, 抗体覆盖率的计算原理上是通过一定方法获得 HCP 样品总蛋白数量和 HCP 抗体能识别结合的蛋白质数量的比值。目前在技术实现上常采用经典的 2DE-WB 方法, 该方法存在一些缺点, 例如: 转膜效率的差异往往导致低分子蛋白质的缺失; 抗体杂交扫描获得的结果中常见有较大区域的模糊信号而难以分析, 导致结果判断的主观性强等^[29]。本研究建立基于磁珠捕获的方式, 可以在参照 Elisa 实验的非变性条件下, 利用磁珠的半固体悬浮方式可充分让 HCP 与其抗体结合, 最大限度地反映真实的 HCP 抗体覆盖率水平。经本研究对方法关键步骤

某类或某几类 HCP 蛋白质, 被称为高风险因子, 如表 4 所示列举目前在 *E. coli* 中发现的常见高风险因子及作用, 其在本研究建立的 MS 法下均可以检测到, 表明该 HCP 抗体具备识别 HCP 高风险因子的能力。因此, 在 HCP 抗体覆盖率评价中注重对风险因子的识别, 可以对下游工艺优化提供有用信息, 有效降低 HCP 检测的风险性。

的优化, 在多次的重复实验中始终能获得一致的结果, 因此该方法的结果稳定性好、数据质量高。由于磁珠的特性, 该方法可以进一步用自动化设备进行操作, 减少人为因素带来的结果变异。同时, 该方法可以做到快速适配 MS 法, 无需复杂的装柱等前处理。基于电泳的方法, 如由于银染或其他染色对氨基酸的偏好性, 导致某些 HCPs 无法识别; 电泳只能获得蛋白质的大致情况, 并不能鉴定到具体的蛋白质信息, 而 HCP 中具体的蛋白质信息对工艺的开发来说非常重要。因此, MS 法在 HCP 分析中的运用越来越多^[30], 美国药典在 2023 年 5 月份在药典论坛中新出了 1132.1 章节, 对 MS 法在 HCP 分析中的方法建立进行了较全面的阐述。本研究建立了 IMBS-LC-MS/MS 方法, 可以鉴定分析 HCP 抗体及结合 HCP 蛋白信息, 并且评估其是否对一些已报道的高风险的 HCPs 有较好的识别, 进一步降低 HCP 的 Elisa 方法可能存在的漏检风险。

从本研究结果数据来看, MS 法往往比电泳方法的覆盖率高。MS 法的结果分析还存在一些待研究的内容, 如在鉴定 HCPs 时是采用 1 条特征性肽段, 还是 2 或 3 条。采用不同数量的特征性肽段, 覆盖率结果会发生变化; 往往可信度的提高, 覆盖率也会更高一些。因此, 本研究在确定评价 HCP 抗体覆盖率的时候需要结合方法本身的分辨率和精度水平综合判断抗体是否符合要求, 不同的覆盖率技术评估平台下需要有相应的合理评价标准。



[参 考 文 献]

- [1] TSCHELIESSNIG AL, KONRATH J, BATES R, *et al.* Host cell protein analysis in therapeutic protein bioprocessing-methods and applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2013, 8 (6) : 655 – 670.
- [2] DE ZAFRA CL, QUARMBY V, FRANCISSEN K, *et al.* Host cell proteins in biotechnology-derived products: a risk assessment framework[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(11) : 2284 – 2291.
- [3] KORNECKI M, MESTMÄCKER F, ZÖBEL-ROOS S, *et al.* Host cell proteins in biologics manufacturing: the good, the bad, and the ugly[J]. *Antibodies*, 2017, 6(3) : 13.
- [4] LI YF. Effective strategies for host cell protein clearance in downstream processing of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins[J]. *Protein Expr Purif*, 2017, 134: 96 – 103.
- [5] REIJERS JAA, MALONE KE, BAJRAMOVIC JJ, *et al.* Adverse immunostimulation caused by impurities: the dark side of biopharmaceuticals[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2019, 85 (7) : 1418 – 1426.
- [6] JAWA V, JOUBERT MK, 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.
- [7] YASUNO K, HAMAMURA-YASUNO E, NISHIMIYA D, *et al.* Host cell proteins induce inflammation and immunogenicity as adjuvants in an integrated analysis of *in vivo* and *in vitro* assay systems[J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2020, 103: 106694.
- [8] GRAF T, TOMLINSON A, YUK IH, *et al.* Identification and characterization of polysorbate-degrading enzymes in a monoclonal antibody formulation[J]. *J Pharm Sci*, 2021, 110(11) : 3558 – 3567.
- [9] LI XW, WANG FQ, LI H, *et al.* The measurement and control of high-risk host cell proteins for polysorbate degradation in biologics formulation[J]. *Antib Ther*, 2022, 5(1) : 42 – 54.
- [10] JONES M, PALACKAL N, WANG FQ, *et al.* “High-risk” host cell proteins (HCPs): a multi-company collaborative view[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(8) : 2870 – 2885.
- [11] The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopeia[S]. 40. 2016:1416 – 1436.
- [12] 欧洲药典委员会. European pharmacopoeia[S]. 10. 0. 2017: 244 – 248.
- [13] DAGOUASSAT N, HAEUW JF, ROBILLARD V, *et al.* Development of a quantitative assay for residual host cell proteins in a recombinant subunit vaccine against human respiratory syncytial virus[J]. *J Immunol Methods*, 2001, 251(1 – 2) : 151 – 159.
- [14] WOLTER T, RICHTER A. Assay for controlling host-cell impurities in biopharmaceuticals[J]. *BioProcess International*, 2005, 3(2) : 40 – 46.
- [15] GUNAWAN F, NISHIHARA J, LIU P, *et al.* Comparison of platform host cell protein ELISA to process-specific host cell protein ELISA[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(2) : 382 – 389.
- [16] GRAF T, SEISENBERGER C, WIEDMANN M, *et al.* Best practices on critical reagent characterization, qualification, and life cycle management for HCP immunoassays [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(10) : 3633 – 3639.
- [17] SEISENBERGER C, GRAF T, HAINDL M, *et al.* Questioning coverage values determined by 2D western blots: a critical study on the characterization of anti-HCP ELISA reagents[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(3) : 1116 – 1126.
- [18] HENRY SM, SUTLIEF E, SALAS-SOLANO O, *et al.* ELISA reagent coverage evaluation by affinity purification tandem mass spectrometry[J]. *MAbs*, 2017, 9(7) : 1065 – 1075.
- [19] PILELY K, NIELSEN SB, DRABORG A, *et al.* A novel approach to evaluate ELISA antibody coverage of host cell proteins-combining ELISA-based immunocapture and mass spectrometry [J]. *Biotechnol Prog*, 2020, 36(4) : e2983.
- [20] WALDERA-LUPA DM, JASPER Y, KÖHNE P, *et al.* Host cell protein detection gap risk mitigation: quantitative IAC-MS for ELISA antibody reagent coverage determination [J]. *MAbs*, 2021, 13(1) : 1955432.
- [21] SEISENBERGER C, GRAF T, HAINDL M, *et al.* Toward optimal clearance: a universal affinity-based mass spectrometry approach for comprehensive ELISA reagent coverage evaluation and HCP hitchhiker analysis[J]. *Biotechnol Prog*, 2022, 38 (3) : e3244.
- [22] BEE JS, TIE L, JOHNSON D, *et al.* Trace levels of the CHO host cell protease cathepsin D caused particle formation in a monoclonal antibody product[J]. *Biotechnol Prog*, 2015, 31 (5) : 1360 – 1369.
- [23] VANDERLAAN M, ZHU-SHIMONI J, LIN SS, *et al.* Experience with host cell protein impurities in biopharmaceuticals[J]. *Biotechnol Prog*, 2018, 34(4) : 828 – 837.
- [24] HAJAM IA, DAR PA, SHAHNAWAZ I, *et al.* Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent[J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(9) : e373.
- [25] HAYASHI F, SMITH KD, OZINSKY A, *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5[J]. *Nature*, 2001, 410(6832) : 1099 – 1103.
- [26] SHAHROKH Z, BEYLIN I, EBERLEIN G, *et al.* Cellulose cleaving activity from *E. coli* detected in topical formulations of recombinant proteins[J]. *BioPharm*, 1995, 8: 32 – 38.
- [27] HUNTER AK, WANG X, SUDA EJ, *et al.* Separation of product associating *E. coli* host cell proteins OppA and DppA from recombinant apolipoprotein A-I (Milano) in an industrial HIC unit operation[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(2) : 446 – 453.
- [28] RANE SS, DEARMAN RJ, KIMBER I, *et al.* Impact of a heat shock protein impurity on the immunogenicity of biotherapeutic monoclonal antibodies[J]. *Pharm Res*, 2019, 36(4) : 51.
- [29] SEISENBERGER C, GRAF T, HAINDL M, *et al.* Questioning coverage values determined by 2D western blots: a critical study on the characterization of anti-HCP ELISA reagents[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(3) : 1116 – 1126.
- [30] PILELY K, JOHANSEN MR, LUND RR, *et al.* Monitoring process-related impurities in biologics-host cell protein analysis[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414(2) : 747 – 758.

编辑:刘卓越/接受日期:2024-15-17