

生物质谱在生物制品宿主细胞 蛋白残留分析中的应用

谢力琦¹, 王 静¹, 朱添怡¹, 王佳馨¹, 黄 懿¹, 乔 亮²

(1. 上海探实生物科技有限公司, 上海 201206; 2. 复旦大学化学系, 上海 200438)

摘要: 宿主细胞蛋白(host cell proteins, HCPs)残留影响生物制品的质量和安全性, 是生物制品生产的关键质控要素。目前, HCPs 残留的主要质控方法是酶联免疫吸附试验(ELISA), 但该方法的准确性高度依赖于抗体的特异性, 且无法获得 HCPs 的种类及其含量分布信息, 需要使用正交方法全面监测。而生物质谱技术无需依赖抗体即可实现 HCPs 的定性和定量分析, 已逐渐成为除 ELISA 法外的主要分析表征方法, 但质谱技术存在缺乏统一的操作流程和验证标准、高丰度药物信号抑制以及高昂的仪器成本等问题。本文总结了质谱法在生物制品 HCPs 分析中的工作流程及其应用进展, 详细阐述了流程中涉及的样品准备、液相色谱分离、质谱数据采集、质谱数据分析和报告的开发原则和关键方法参数, 并对未来的研究方向及挑战进行展望。

关键词: 宿主细胞蛋白; 生物质谱; 生物制品; 质量控制

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)02-0193-08

doi: 10.7538/zpxb.2023.0134

Progress in Residual Host Cell Proteins Analysis of Biologics by Mass Spectrometry

XIE Li-qi¹, WANG Jing¹, ZHU Tian-yi¹, WANG Jia-xin¹, HUANG Yi¹, QIAO Liang²

(1. Shanghai Tanshi Biotechnology Co., LTD, Shanghai 201206, China;

2. Department of Chemistry, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Residual host cell proteins (HCPs) can significantly impact the efficacy and safety of biologics, and are considered as critical quality attributes that require rigorous quality control. Currently, the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most common methodology for monitoring residual HCPs in biologics. However, the accuracy of ELISA is highly dependent on the specificity of the used antibodies, and it does not provide information about the types and quantities of individual HCP, making it necessary to complement ELISA with other analytical methods. Mass spectrometry (MS) has emerged as a key analytical and characterization technique for HCPs analysis. Without solely depending on antibody affinity recognition, MS enables the identification and quantification of individual HCP, which facilitates a deeper understanding of HCP profiles, clearance patterns, risk assessment, and problematic HCP monitoring.

Moreover, the method of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) offers faster development for new products. Despite its advantages, LC-MS/MS faces challenges in HCP analysis, such as the lack of standardized procedures and validation standards, signal suppression in the presence of high-abundance active pharmaceutical ingredient (API), and the high instrumentation cost and specialized expertise barriers in routine quality control settings. Researchers and industry experts are working towards establishing standardized procedures and validation guidelines for HCPs analysis using LC-MS/MS, which includes utilizing data dependent acquisition (DDA) for the construction of project-specific HCP libraries, data independent acquisition (DIA) for efficient HCP screening, and targeted strategy like multiple reaction monitoring (MRM) for absolute quantification of high-risk HCPs. Efforts are also underway to mitigate signal suppression effects and reduce instrumentation costs. To overcome high-abundance API interference in HCP detection, advanced techniques involving API-HCP separation, HCP enrichment, and non-denaturing enzymatic digestion have been developed, allowing for the monitoring of HCPs at exceptionally low levels (0.1 to 0.01 ppm). This paper provided an overview of MS-based HCPs analysis workflow utilized “proteomics” approach, covering essential considerations in instrument selection, sample preparation, LC separation, MS data acquisition, and data analysis and reporting, corresponding optimized practices were discussed. Nowadays ELISA is still a workhorse for residual HCP analysis, however, LC-MS/MS is a valuable tool for the analysis of residual HCPs in biologics. It offers a more comprehensive and detailed view of HCP profiles and their clearance patterns throughout the production process, enabling better risk assessment and monitoring of problematic HCPs. While challenges remain, ongoing research and development efforts are paving the way for the broader adoption of LC-MS/MS in the biopharmaceutical industry, ultimately ensuring the quality and safety of biologic products.

Key words: host cell proteins (HCPs); mass spectrometry (MS); biologics; quality control

宿主细胞蛋白 (host cell proteins, HCPs) 是在生物制品生产过程中由宿主细胞表达并残留在产品中的工艺相关蛋白质杂质^[1]。HCPs 残留的种类由宿主细胞类型和亚型决定,其含量受表达体系、表达方式、纯化工艺和药物种类的影响。每种 HCP 都有其独特的理化活性和生物功能,部分高风险型 HCPs 能引起免疫原性而发生临床安全性风险,也可能引起药物降解而影响产品质量,需要严密监控^[2]。如,在一种抗白介素 13 的抗体的 III 期临床试验中,90% 受试者因为宿主细胞中的 PLBL2 蛋白残留产生了免疫反应^[3];有研究^[4]发现,在一款重组 Fc 融合蛋白产品中,来源于宿主细胞的组织蛋白酶 D 可引发药物降解,导致药效降低。生物

制品制剂处方中常见的聚山梨醇酯 80 和聚山梨醇酯 20 等稳定剂可能会被脂肪酶家族的 HCPs 降解,从而影响药物本身的长期稳定性^[5]。基于此,在绝大多数情况下,HCPs 残留被认为是生物制品的关键质量属性,需要在成品和原液的放行检测以及中间产品的工艺控制中重点关注^[5]。在生物制品的生产过程中,应尽量去除 HCPs,或将其控制在不妨碍产品安全有效性的范围内。由于 HCPs 种类繁多、性质各异且分子质量差距较大,在纯化工艺开发过程中预测其清除效率极具挑战。抗体药物典型的纯化流程及各阶段产品的 HCPs 水平示于图 1。纯化流程通常包括深层过滤、亲和色谱以及 2~3 次正交色谱分离。细胞培养发酵液

中的 HCPs 含量通常在 $10^5 \sim 10^6$ ppm 水平,其中大部分在亲和色谱(如蛋白 A 亲和纯化)阶段被去除至约 1 000 ppm,其余与药物有相互作用或与层析柱有非特异结合的部分 HCPs 在后续阴阳离子色谱纯化步骤得到进一步清除^[6-7]。

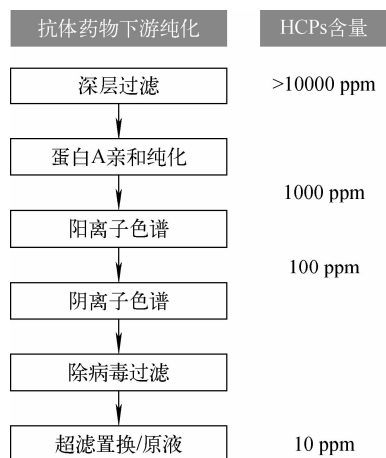


图 1 抗体药物纯化工艺流程对应的 HCPs 水平

Fig. 1 Typical HCPs level during purification process for monoclonal antibodies (mAbs)

对于经纯化后仍残留于生物制品中低至 ppm 级别的 HCPs^[8],尤其是高风险型 HCPs 的质量控制,如何实现准确的定性和定量分析,对生物制品的质量控制以及工艺开发尤为关键。

1 生物制品宿主细胞残留的分析方法和质谱技术的优势

测定生物制药中残留的宿主细胞蛋白的方法主要包括基于特异性抗体的酶联免疫吸附试验(ELISA)和免疫印迹法,以及以液相色谱-质谱(LC-MS)法为代表的非免疫特异性方法^[9-10]。

ELISA 法因高可及性、高灵敏度及低定量限一度成为生物制品 HCPs 放行检测及工艺控制的金标准^[11]。双抗夹心法 ELISA 与竞争性 ELISA 相比,大大提高了检测的灵敏度和特异性,是检测 HCPs 最常用的一种 ELISA 方法^[9]。对于常见的生产用细胞株或菌株,有商品化的夹心法 ELISA 试剂盒供选择^[2],在早期研究中经初步评估后可直接选用相应的试剂盒进行检测。ELISA 法对 HCPs 分析的准确性高度依

赖于所使用抗体的覆盖率,无法被抗体特异性识别或低亲和力的 HCPs 可能会被漏检或低估,同时也可能高估高亲和力的 HCPs 含量,导致结果不准确^[9]。因此,在关键临床样本及商业放行测试前,需评估试剂盒抗体对 HCP 蛋白组的覆盖率。若覆盖率不足,需开发特异的自制试剂盒。此外,特异性抗体方法只能定量分析 HCPs 总量或单个蛋白质,无法全面监测所有 HCPs 种类及其含量分布。

为弥补 ELISA 方法的局限性,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)逐渐成为一种高通量、高灵敏度检测 HCPs 残留的方法^[9],通过液相色谱分离不同类型的 HCPs 和药物,并利用质谱图与数据库对每种 HCP 进行确认和表征^[12-13]。LC-MS/MS 法非特异性的特点避免了亲和力歧视问题,使定量结果更准确^[14]。此外,该方法还能在高丰度单克隆抗体(mAb)药物背景下检测低至 $10 \sim 0.1$ ppm 的残留 HCPs^[8,15-16]。对于高风险型 HCPs,通过建立靶向质谱分析方法可以有效识别并监控其清除情况,促进相关的风险评估。

质谱法可以在单次实验中鉴定和定量多种 HCPs,且不存在抗体法对无亲和力或低亲和力 HCPs 的歧视,可应用于生物制品全生命周期中 HCPs 的监控^[17]。基于 LC-MS/MS 的 HCPs 检测方法在生物制品生命周期中的应用示于图 2。在生物制品研发初期确定生产用细胞后,即可使用 LC-MS 法对下罐料液进行蛋白质组分析,建立特定的 HCP 库,确认可能残留于产品中的 HCPs 类型。随着工艺开发,LC-MS 法可评估纯化工序对 HCPs 的清除效率,并鉴定易在工艺步骤中持续存在的顽固 HCPs 和共洗脱 HCPs,辅助工艺的优化和锁定^[2,18]。如果在原液或成品中发现可能影响产品安全有效性的高风险 HCPs,可应用靶向 LC-MS 技术实现定量监测^[12]。

2021 年,生物制药新兴最佳实践协会(BEBPA)的 HCP 论坛调研报告显示,有 62% 生物制药企业使用质谱法进行 HCPs 监测以指导工艺开发。此外,对于缺乏商品化 ELISA 试剂盒的宿主细胞,开发试剂盒需要 1~2 年的周期,而 LC-MS 法的开发可在 1 个月内完成,能够快速应用于残留 HCPs 的检测^[9]。2021 年,



图 2 基于 LC-MS/MS 的 HCPs 检测方法在生物制品生命周期中的应用

Fig. 2 Application of LC-MS/MS based HCPs measurement methods in life cycle management of biologics

美国食品药品监督管理局批准了 Actinobac Biomed 公司仅使用 LC-MS 法进行 HCPs 质量控制的申请,该产品所用的细胞株目前尚未有商品化的 HCP-ELISA 试剂盒,这标志着 LC-MS 在 HCPs 放行检测中的应用已受到主流药品监管机构的认可。2023 年 5 月,美国药典发布了“质谱法测定生物药中残留宿主细胞蛋白”(征求意见稿)^[13],进一步推动和规范了 LC-MS 法在 HCP 分析检测中的应用。

2 生物质谱在生物制品宿主细胞残留分析中的工作流程

HCPs 的 LC-MS/MS 分析通常基于“自下而上”的蛋白质组学工作流程,包括样品预处理(可能包含 HCPs 富集或高丰度药物去除步骤)、酶切、LC-MS 分析和数据处理^[9],其工作流程示于图 3。中间产物或成品被特异性蛋白酶消化后,经反相液相色谱(RPLC)分离并进入高分辨质谱仪进行肽段及其碎片离子的检测,通过数据库检索确定对应的 HCPs 序列,使用峰面积评估其含量。在开发 HCPs 检测方法前,需要根据目标物以及样品特性设计研究方

案。如,高通量 HCPs 快速监测与低丰度 HCPs 高灵敏度分析采取的流程不同。对于 ppm 级的 HCPs,在样品预处理过程中,常增加活性药物成分(API)去除或 HCPs 富集步骤,以降低高丰度 API 对低丰度 HCPs 检测的干扰。

2.1 样品前处理

根据目标分析物的差异,可以选择多种 HCP 样品制备和前处理策略。理论上,前处理步骤越简单,越能够无偏地反映样品中 HCPs 的实际情况。HCP 分析常用的样品前处理方法列于表 1,生物制品的 API 分子大小、性质、浓度和配方缓冲液等因素都会影响样品制备和分离分析方法^[13]。

生物制品制剂处方中的表面活性剂、等渗调剂和氨基酸等可能影响样品的溶解性、酶切效率或形成干扰质谱检测的背景信号,可通过超滤、透析、有机溶剂沉淀等方式去除。但预处理可能导致一些 HCPs 信息丢失,例如,具有分子质量截留功能的脱盐柱或超滤管可能导致低分子质量 HCPs 的移除,需评估方法的回收率,将方法的优势和劣势控制在可接受的范围内。

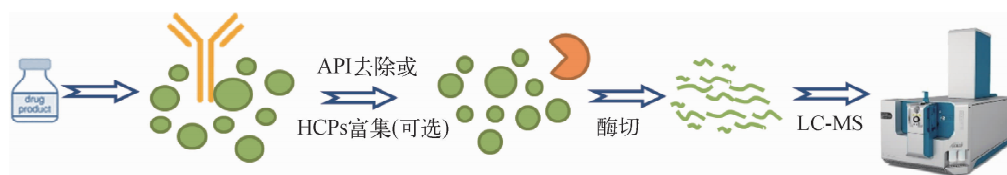


图 3 LC-MS/MS 法分析宿主细胞蛋白的典型流程

Fig. 3 Typical workflow of LC-MS/MS based HCPs measurement

表 1 生物制品 HCPs 分析常用的样品前处理方法
Table 1 Sample preparation methods for HCPs detection

方法类型 Method type	前处理方法 Sample preparation method	HCP 富集原理 HCP enrichment mechanism	风险 Caveat
标准方法	变性还原烷基化后酶切	无	高丰度药物可能影响 HCPs 的检测
高丰度药物去除	亲和纯化去除药物收集流穿液	亲和纯化	可能遗漏与药物有相互作用的,以及和亲和材料有非特异吸附的 HCPs
	超滤法去除高分子质量药物	分子质量截留	可能遗漏高分子质量 HCPs
	一维/双向凝胶电泳	通过电荷和分子大小分离 药物和 HCPs	只有高于染色方法检测限度的 HCPs 才能被检出,可能在切胶酶解过程中 遗失部分 HCPs
	色谱分离	通过分子大小、电荷和疏水性 分离药物和 HCPs	与药物共流出的 HCPs 难以检出
	非变性酶切	加热沉淀移除未充分酶切 的药物	适用于不变性难以酶解药物 (如 mAb)的 HCP 分析,部分 HCPs 也可能存在酶切不完全的问题
HCPs 富集	抗体富集	抗原抗体结合	可能检测不到抗体不识别的 HCPs
	亲和试剂富集(核酸适配体、 蛋白冠等)	每种配体结合适量的特定 蛋白,拉平 API 和 HCPs 的含量差异	受限于配体特异性,HCPs 定量数据 无参考意义
	基于酶活的 HCPs 富集	亲和标记对酶活性位点 进行共价修饰	受限于酶活性和亲和标签的特异性

为克服高丰度 API 对 HCPs 残留检测的抑制,增加 HCPs 的检测灵敏度,衍生了深度分离、纯化富集和非变性酶切等方法^[5,19]。如,Doneanu 等^[8]利用改进的混合粒子技术提高了 LC 系统峰容量和样品分离能力,使残留 HCPs 的检测限达到 1 ppm。通过多抗、核酸适配体或蛋白冠等富集技术可以富集 HCPs,减小 API 和 HCPs 的丰度差异,并促进低丰度 HCPs 的检测。本课题组采用蛋白冠磁珠富集以及离子流动模式质谱,成功识别出 0.01 ppm 级别的 HCPs。利用天然状态下以球蛋白构型存在的抗体药物可以抵御蛋白酶酶切的特性,研究人员开发了相应的非变性酶切方法,在非变性条件下消化 HCPs,使大部分抗体药物保持完整结构。Yang 等^[1,16]在高浓度单克隆抗体背景下直接非变性条件下进行胰蛋白酶消化,并通过加热沉淀去除未被消化的抗体,所建立的非变性酶切法可稳定识别出含量低至 0.1 ppm 的残留 HCPs。

2.2 酶切

在“自下而上”策略中,胰蛋白酶是 LC-MS/MS 法分析 HCPs 最常用的蛋白酶,胰蛋白酶的酶切效率高,且所得肽段 C 末端含有带正电荷的赖氨酸或精氨酸,有助于电离。当胰

蛋白酶不适合的情况下,可选用糜蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶等。HCPs 的酶切效率受蛋白质与酶的比例、API 与残留 HCPs 的浓度比、酶切温度和 pH 值以及变性剂浓度的影响。在开发酶切方法时,可通过评估鉴定肽段的数量以及漏切和错切肽段的比例来评估酶切的效率。

2.3 LC-MS 分析

色谱柱、流动相、分离梯度等参数均会影响 HCPs 的分离效率。在 HCPs 的 LC-MS 分析中,最常用的色谱柱是反相 C18 柱。为避免 HCP 肽段的离子化抑制,通常会使用具有较高峰容量的色谱柱。此外,较小的色谱柱内径和较长的柱长也可以提高 HCPs 的检测灵敏度。如 Yang 等^[16]使用 50 cm 表面带电杂化的 CSH C18 色谱柱(1.7 $\mu\text{m} \times 75 \mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$, 130 \AA)提高反相肽分离的峰容量和分离度,实现了 0.1 ppm HCPs 的鉴定。为了适配质谱分析,色谱流动相中通常采用挥发性的离子对试剂(如甲酸)辅助肽段电离。使用生物惰性液相色谱可改善酸性肽和碱性肽的非特异性相互作用,配备柱温箱可提升方法的稳定性。采用正交的二维液相分析方法也可提升 HCPs 的分离效率,但受限于串联色谱柱的稳定性不易控制,该方法较少用于分析实际样品。一般选用具有

高分辨率和高准确度的质量分析器(如 Orbitrap 或 Q-TOF)分析 HCPs。此外,内嵌离子淌度分离功能的质量分析器可进一步分离共流出的低丰度 HCPs 肽段,促进低丰度 HCPs 的鉴定。

HCP 分析中常用的数据采集模式示于图 4。采用数据依赖的数据采集模式(DDA)采集特定母离子碎片信息,通过精确的高通量深度测序建立 HCPs 库。所获得的 HCPs 串联质谱图可为后续筛查产品中特定 HCPs 和高风险 HCPs 的靶向定量分析提供基础^[1]。DDA 模式下,按照丰度水平每次选择 1 个母离子进行碎裂,受限于仪器的扫描速度和共流出肽段的影响,可能会错失某些低丰度 HCPs 的肽段信息,因此,需谨慎设计动态排除标准,以尽可能提高低丰度 HCPs 的鉴定^[20-21]。在非数据依赖采集模式(DIA/SWATH)下,主要应用全景式扫描模式快速筛查和定量分析残留 HCPs,使设定 m/z 范围内的所有母离子均被碎裂,相对 DDA 模式可以鉴定更多低丰度蛋白质。DIA 不存在对扫描时间段内能采集离子数量的限制,定量准确性和重复性均优于 DDA,但 DIA 的 MS/MS 为多个母离子碎片的混合图谱,较复杂,需依赖特定的数据分析软件以及 HCP 谱图库辅助鉴定^[20]。高风险 HCPs 筛查多依赖多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)等靶向分析技术。MRM 仅对选定的母离子和子离子进行信号记录,可以提升分析的灵敏度和特异性。对于高风险型 HCPs,在 MRM 模式下,

可从 DDA 产出的 HCPs 谱图库中筛选合适的肽段和子离子进行定量分析。LC-MS/MS 为 HCPs 分析提供了多种解决方案,借助高分辨质谱数据,可实现从细胞发酵液到原液样品的残留 HCPs 的绝对定量分析。

2.4 数据分析与报告

将采集的质谱数据与 UniProtKB、SwissProt、NCBI 等数据库中的理论蛋白序列进行比对,鉴定样品中的 HCPs 种类。为获得高可信度的检索结果,多采用靶向-诱饵库(target-decoy)的检测策略,仅输出假阳性率(FDR) < 1% 和包含特征肽段的 HCPs 数据。HCPs 的定量分析基于肽段母离子或子离子的峰面积,肽段的离子化效率、碎裂效率和受基质效应的影响程度都可能影响定量结果的准确性,通常加入已知含量的内标蛋白辅助准确定量。在残留 HCPs 的定量分析中,根据 HCPs、加入的内标蛋白质和产品蛋白质的峰面积确定 HCPs 与 API 的摩尔比,再考虑分子质量差异,将数据转换为纳克 HCP 到毫克 API 形式,以百万分之一(ng/mg)的形式表示 HCPs 的相对含量。

3 质谱法在宿主细胞残留质量控制中的应用挑战

生物质谱在生物制品检测中的应用面临着挑战^[13]: 1) 质谱仪器和数据处理软件的成本普遍较高; 2) 需要对数据采集和数据处理的实验人员进行相关培训; 3) 整个工作流程的每个环节都需要控制变量数量,以获得可靠、稳定、重

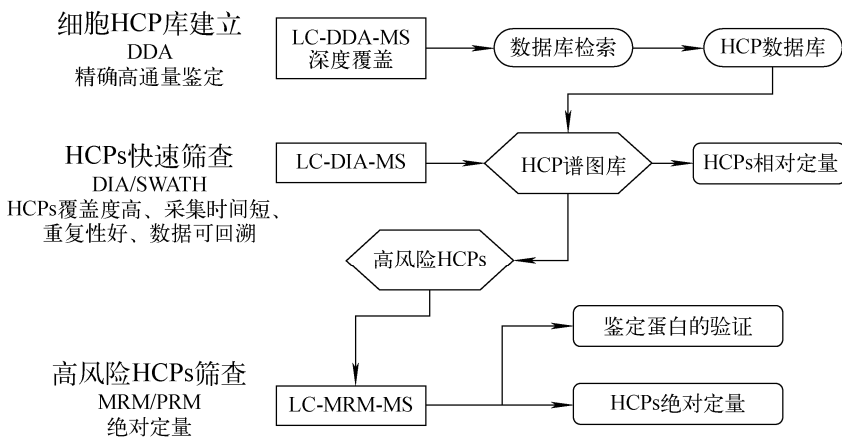


图 4 HCP 分析中常用的质谱数据采集模式

Fig. 4 MS data acquisition modes applied in HCP analysis

现性好的结果;4) 质谱检测时动态范围的限制;5) 潜在基质的干扰;6) 动态药品生产管理规范(cGMP)缺少良好的仪器和软件验证要求;7) 质谱仪器采集和数据分析时间较长,检测通量较低。作为质量控制方法,生物质谱技术目前仍缺少稳定统一的操作流程^[23]。一般使用质谱法对 HCPs 进行分析时,需要针对不同样品、不同用途进行重现性验证,尚未有统一的标准规定^[24]。此外,所使用的蛋白质组数据库需考量在现有转录组信息和算法预测免疫原性和蛋白质相互作用的前提下进行标准化,可以通过数学模型生成通用数据库,并基于用户的质谱数据量化 HCPs 风险值^[19]。虽然基于 LC-MS/MS 的 HCPs 分析方法存在局限性和复杂性,但通过细节优化建立系统性的质量控制方法将有助于保障用药安全^[23]。

4 总结与展望

本文讨论了 HCP 质控对分析方法的需求,简述了基于生物质谱法的宿主细胞残留分析工作流程,详细阐述了流程中涉及的样品准备、液相色谱分离、质谱数据采集、质谱数据分析和报告的方法开发原则和关键方法参数,为建立稳定统一的操作流程提供实践基础。

目前,在多数情况下,质谱法作为表征方法与 ELISA 法共同监测生物制品中的残留 HCPs,暂未独立用于残留 HCPs 的质量控制。未来,用于 HCPs 分析的质谱技术发展方向为:1) 相关质谱仪有待提高普适性;2) 对于数据结果分析,建立自动化的分析流程;3) 在整体的工作流程中,建立更严格的变量把控方法;4) 质谱检测时的基质干扰有待优化;5) 在质量控制和工艺控制中,建立公认的法律法规与监管标准,共同推进生物质谱在相关领域的发展。

参考文献:

[1] YANG F, LI D, KUFER R, CADANG L, ZHANG J, DAI L, GUO J, WOHLRAB S, GREENWOOD-GOODWIN M, SHEN A, DUAN D, LI H, YUK I H. Versatile LC-MS-based workflow with robust 0.1 ppm sensitivity for identifying residual HCPs in biotherapeutic products [J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(2): 723-

731.

- [2] PILELY K, JOHANSEN M R, LUND R R, KOFOED T, JØRGENSEN T K, SKRIVER L, MØRTZ E. Monitoring process-related impurities in biologics-host cell protein analysis[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2022, 414(2): 747-758.
- [3] FISCHER S K, CHEU M, PENG K, LOWE J, ARAUJO J, MURRAY E, McCLINTOCK D, MATTHEWS J, SIGUENZA P, SONG A. Specific immune response to phospholipase B-like 2 protein, a host cell impurity in lebrizumab clinical material[J]. *The AAPS Journal*, 2017, 19(1): 254-263.
- [4] ROBERT F, BIERAU H, ROSSI M, AGUGIARO D, SORANZO T, BROLY H, MITCHELL-LOGEAN C. Degradation of an Fc-fusion recombinant protein by host cell proteases: identification of a CHO cathepsin D protease[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(6): 1 132-1 141.
- [5] JONES M, PALACKAL N, WANG FENGQIANG, GAZA-BULSECO G, CONNOLLY P. "High-risk" host cell proteins (HCPs): a multi-company collaborative view[J]. 2021, 118(8): 2 870-2 885.
- [6] ZHANG Q, GOETZE A M, CUI H, WYLIE J, TRIMBLE S, HEWIG A, FLYNN G C. Comprehensive tracking of host cell proteins during monoclonal antibody purifications using mass spectrometry[J]. *mAbs*, 2014, 6(3): 659-670.
- [7] WALKER D E, YANG F, CARVER J, JOE K, MICHELS D A, YU X C. 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.
- [8] DONEANU C E, ANDERSON M, WILLIAMS B J, LAUBER M A, 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[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(20): 10 283-10 291.
- [9] TSCHELIESSNIG A L, KONRATH J, BATES R, JUNGBAUER A. Host cell protein analysis

- in therapeutic protein bioprocessing-methods and applications[J]. *Biotechnology Journal*, 2013, 8(6): 655-670.
- [10] USP-NF[1132]. Residual host cell protein measurement in biopharmaceuticals[S]. U. S. Pharmacopeia National Formulary Official, 2023.
- [11] ALLA Z. HCP ELISA and HCP antibody coverage analysis methods[J]. *Biopharm International*, 2021, 34(4):38-40.
- [12] KREIMER S, GAO Y, RAY S, JIN M, TAN Z, MUSSA N A, TAO L, LI Z, IVANOV A R, KARGER B L. Host cell protein profiling by targeted and untargeted analysis of data independent acquisition mass spectrometry data with parallel reaction monitoring verification[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(10): 5 294-5 302.
- [13] USP-NF[1132.1]. Residual host cell protein measurement in biopharmaceuticals by mass spectrometry[S]. U. S. Pharmacopeia National Formulary Official, 2023.
- [14] BRACEWELL D G, FRANCIS R, SMALES C M. The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112(9): 1 727-1 737.
- [15] YANG F, WALKER D E, SCHOENFELDER J, CARVER J, ZHANG A, LI D, HARRIS R, STULTS J T, YU X C, MICHELS D A. A 2D LC-MS/MS strategy for reliable detection of 10 ppm level residual host cell proteins in therapeutic antibodies[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(22): 13 365-13 372.
- [16] LI D, FARCHONE A, ZHU Q, MACCHI F, WALKER D E, MICHELS D A, YANG F. Fast, robust, and sensitive identification of residual host cell proteins in recombinant monoclonal antibodies using sodium deoxycholate assisted digestion[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(17): 11 888-11 894.
- [17] WALKER D E, YANG F, CARVER J, JOE K, MICHELS D A, YU X C. 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.
- [18] HESSMANN S. Development of analytical strategies in quantitative proteomics: quantitation of host cell proteins by mass spectrometry as a quality control tool for the biopharmaceutical industry [D]. Strasbourg: Université de Strasbourg, 2021.
- [19] TONG L, ZHOU X Y, JYLHA A, AAPOLA U, LIU D N, KOH S K, TIAN D, QUAH J, UUSITALO H, BEUERMAN R W, ZHOU L. Quantitation of 47 human tear proteins using high resolution multiple reaction monitoring (HR-MRM) based-mass spectrometry[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 115: 36-48.
- [20] GUO J, HUAN T. Comparison of full-scan, data-dependent, and data-independent acquisition modes in liquid chromatography-mass spectrometry based untargeted metabolomics[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(12): 8 072-8 080.
- [21] CHEN Z W, XIONG L, ADAMS G, WALKER H, WILSON M, PYBUS L, HEISE C, LYONS M, HASTINGS B. Powerful workflows for highly sensitive identification and quantification of host cell proteins (HCPs)[R]. USA, SCIEX Technical Note, 2022.
- [22] SIMON R, ESHANI N. Simultaneous quantification of trastuzumab and pertuzumab in human serum using accurate mass spectrometry[R]. USA, SCIEX Technical Note, 2023.
- [23] BITTREMIEUX W, WALZER M, TENZER S, ZHU W, SALEK R M, EISENACHER M, TABB D L. The human proteome organization-proteomics standards initiative quality control working group: making quality control more accessible for biological mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(8): 4 474-4 479.
- [24] NICOLE G, STEFAN S. BEBPA 2021: trends and opinions[R]. Germany, BioGenes GmbH, 2021.

(收稿日期:2023-11-29;修回日期:2024-01-24)