

抗体药物中高风险聚山梨酯降解酶残留的质谱分析

俞小娟¹, 王飞宇^{1,2}, 张佳龄¹, 王 兰¹, 于传飞¹

(1. 中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629;

2. 沈阳药科大学制药工程学院, 辽宁 本溪 117004)

摘要: 抗体药物中微量的宿主细胞蛋白质(HCP)残留会导致其关键辅料聚山梨酯(吐温)降解, 进而产生不溶性微粒, 影响药品的有效性和安全性。本研究建立了一种定量分析 HCP 残留中微量聚山梨酯降解酶的质谱方法。首先使用液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(LC-QTOF MS)系统的迭代采集方式, 对 Protein A 亲和层析纯化液中高风险 HCP 进行非靶向筛查, 得到聚山梨酯降解酶的蛋白质和肽段鉴定列表。随后, 使用液相色谱-三重四极杆质谱(LC-QQQ MS)靶向定量技术, 建立基于特征肽段的多重反应监测定量分析方法, 对溶酶体磷脂酶 A2、磷脂酶 B 样 2、脂蛋白脂肪酶及溶酶体酸性脂肪酶等 4 种聚山梨酯降解酶进行检测。同时, 优化样品处理流程, 并对方法进行验证。结果表明, 本方法的定量限和检测限分别为 0.5、0.1 $\mu\text{g/g}$ 。最后, 使用该方法对纯化工艺过程样品、原液和成品中的 4 种聚山梨酯降解酶进行定量分析。该方法快速、灵敏, 适用于抗体药物中高风险聚山梨酯降解酶的鉴别和定量分析。

关键词: 质谱; 宿主细胞蛋白质(HCP); 聚山梨酯; 降解; 不溶性微粒

中图分类号: O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-2997(2026)02-0250-11

DOI: 10.7538/zpxb.2025.0076 CSTR: 32365.14.zpxb.2025.0076

Analysis of Polysorbate-Degrading Esterase Residues in Therapeutic Antibodies by Mass Spectrometry

YU Xiao-juan¹, WANG Fei-yu^{1,2}, ZHANG Jia-ling¹, WANG Lan¹, YU Chuan-fei¹

(1. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Benxi 117004, China)

Abstract: Polysorbates are a class of hydrophilic non-ionic surfactants characterized by exceptional biocompatibility, rendering them the most frequently employed excipients in therapeutic monoclonal antibodies' formulations. These compounds play a pivotal role in preventing the formation of antibody aggregates and their subsequent inactivation, while simultaneously mitigating non-specific adsorption onto surfaces of glass vials or intravenous infusion tubing. However, due to inherent variations in synthetic processes and diverse raw material sources, polysorbates exist as complex mixtures with significant batch-to-batch variability in their compositional profiles. Their inherent chemical instability predisposes them to degradation, with degradation products capable of interacting

with protein particles present in therapeutic monoclonal antibodies to form insoluble particulates and visible foreign matters. These particulate contaminants pose substantial risks to both drug safety and therapeutic efficacy, thereby underscoring the critical importance of investigating the degradation mechanisms of polysorbates in antibody formulations. Chinese hamster ovary (CHO) cells represent the predominant expression system for antibody production, with trace amounts of host cell protein (HCP) residues persisting during the drug purification process. These trace amounts of HCP residues have been identified as a principal contributor to polysorbate degradation. In this study, a highly sensitive and specific mass spectrometry (MS) method was developed for quantifying trace amounts of polysorbate-degrading esterases in HCP residues. This study aims to elucidate the specific impact of HCP residues on polysorbate degradation, enable comprehensive quantitative analysis of polysorbate-degrading esterases, and thereby provide essential guidance for process optimization and quality control in antibody drug manufacturing. The methodology involved an initial non-targeted screening approach using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF MS) operating under data-dependent acquisition mode. This screening was performed on high-risk HCPs present in Protein A affinity eluates, which yielded comprehensive identification lists of polysorbate-degrading esterases at both the protein and peptide levels. Subsequently, a targeted quantitative approach was established using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (LC-QQQ MS), employing multiple reaction monitoring (MRM) based on characteristic peptide sequences to detect four common polysorbate-degrading esterases: lysosomal phospholipase A2, phospholipase B-like 2, lipase LIPH, and lysosomal acid lipase. The sample processing workflow underwent rigorous optimization, encompassing various parameters such as sample preparation procedures, extraction efficiency, and analytical conditions. The method underwent comprehensive validation, ultimately achieving a limit of quantification of 0.5 $\mu\text{g/g}$ and a limit of detection of 0.1 $\mu\text{g/g}$. The developed method was successfully applied to quantify these four polysorbate-degrading esterases across various sample types, including purification process samples, bulk drug substances, and final drug products. The results demonstrated that the method exhibits exceptional rapidity, sensitivity, and specificity, making it well-suited for both identification and quantitative analysis of high-risk polysorbate-degrading esterases in therapeutic monoclonal antibodies. This capability provides a robust analytical tool for ensuring drug quality and safety throughout the manufacturing process, offering significant advantages for process development and quality control in antibody drug production.

Key words: mass spectrometry; host cell protein (HCP); polysorbate; degradation; insoluble particle

宿主细胞蛋白质(host cell protein, HCP)残留是中国仓鼠卵巢细胞(Chinese hamster ovary cells, CHO)表达的抗体药物等重组生物制品中的杂质,经过复杂的纯化步骤后仍有部分残留。残留HCP作为外源蛋白质会在不同程度上引发机体的免疫应答,导致过敏等不良反应;此外,还有部分残留HCP具有蛋白酶或酯酶活性,可能导致蛋白质或辅料的降解,进而影响抗体药物的安全性和稳定性。美国药典、欧洲药典以及中国药典均对HCP残留检测提出了具体要求和相关标准。2021年,由BioPhorum发起、26家生物

制药企业参与完成的关于高风险HCP残留的行业调研报告汇总了在实际生产中CHO表达系统常见的高风险HCP残留,包括聚山梨酯降解酶、蛋白质降解酶等^[1]。

聚山梨酯降解不仅降低表面活性剂的有效浓度,还与抗体药物中不溶性微粒/可见异物的形成有关^[2-3]。目前,针对HCP残留酯酶导致抗体药物中关键辅料聚山梨酯(polysorbate)的水解研究较多^[4-11],已报道的与聚山梨酯降解相关的HCP残留(以下简称“聚山梨酯降解酶”)超过20种,其中溶酶体磷脂酶A2(lysosomal phospholipase

A2, LPLA2)、磷脂酶 B 样 2(phospholipase B-like2, PLBL2)、脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LpL)、溶酶体酸性脂肪酶(lysosomal acid lipase, LAL)等 4 种酶的检出率最高,且活性较高,在 $\mu\text{g/g}$ 浓度水平即可引起聚山梨酯降解^[11]。对于高浓度抗体药物,抗体与 HCP 残留的浓度差异高达 6 个数量级以上,且即使采用相同的 CHO 细胞系、通用的纯化平台工艺表达纯化得到的不同抗体药物分子,其残留的聚山梨酯降解酶的种类和含量也可能不同。

酶联免疫(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)是抗体药物放行检验中针对 HCP 残留的最常用分析方法。然而,使用 CHO 表达系统通用试剂盒仅能得到 HCP 残留总量,无法区分单个酯酶。因此,建立一种稳定可靠、灵敏度高且快速的可监测单个聚山梨酯降解酶的分析方法,对于抗体药物的工艺开发和质量控制具有重要意义。

高效液相色谱-质谱技术广泛应用于不同类型生物大分子的药学研究和质量控制中,包括一级结构表征(分子质量、氨基酸序列、翻译后修饰分析)、高级结构研究、多属性方法建立、杂质鉴定等^[12-15]。质谱技术用于残留 HCP 分析具有独特优势^[16-19],该技术能够在单个蛋白质水平对包括聚山梨酯降解酶在内的多种 HCP 残留进行鉴定和定量,有助于对 HCP 残留杂质的了解和风险评估,同时可监控高风险 HCP 残留的去除情况,且可在短期内开发出适宜的质谱鉴别方法,相比开发产品和工艺特异性 ELISA 试剂盒更省时。2025 年 5 月 1 日,美国药典发布了通则 1132.1《质谱法进行残留宿主细胞蛋白质测定》,介绍了质谱法作为一种互补的技术平台在 HCP 残留检测中的应用。

针对抗体药物中 HCP 残留的研究,目前最常用的质谱技术主要包含 2 种。第一种是非靶向方法,采用高效液相色谱-高分辨串联质谱技术开展 HCP 残留的发现研究。抗体药物(含 HCP 以及添加的蛋白质标准品)经胰蛋白酶酶解处理后,应用自下而上(bottom-up)蛋白质组学工作流程对得到的肽段混合物进行分离^[20-21]。该流程通常基于纳升流速液相色谱仪(liquid chromatography, LC)一维或二维反相色谱法分离肽段,经色谱分离后的肽段通过静电场轨道阱质

谱仪或四极杆-飞行时间质谱仪(quadrupole-time-of-flight mass spectrometer, QTOF MS)检测,得到肽指纹图谱;随后进行多肽的鉴定和定量分析,再根据多肽和蛋白序列的对应关系,经蛋白数据库和软件处理,得到蛋白质的定性和相对定量结果。将上述方法应用于制药企业的分析实验室主要存在以下 3 个问题:1)纳升液相色谱对操作人员的专业技能要求较高,且进样量低、重复性差;2)方法灵敏度较低,通常一维方法可检测到 $50 \mu\text{g/g}$ 以上的单个 HCP,对于精纯样品和原液中的低含量 HCP 则无法有效检出,二维方法也仅可检测到 $10 \mu\text{g/g}$ 浓度水平的单个 HCP;3)分析时间长,一维方法需要 120 min 以上的数据采集时间,如果为了检出精纯后样品中的低含量 HCP($<10 \mu\text{g/g}$)而采用在线或离线的二维液相色谱方法,单个样品的分析耗时将长达 20 h 以上,无法满足下游纯化工艺过程监控对分析数据及时性的要求。

另一种是靶向方法,适用于已鉴定到的 HCP 残留的选择性检测和定量分析。该方法通常采用常规流速超高效液相色谱仪(LC),根据所用质谱仪类型的不同,可分为基于三重四极杆质谱(triple quadrupole mass spectrometry, QQQ MS)的多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)和基于四极杆-飞行时间质谱(QTOF MS)或串联静电场回旋轨道阱高分辨质谱的平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)。靶向分析需要在采集方法中设置目标肽段的母离子 m/z 值,由第 1 个质量分析器(四极杆,充当一级离子过滤器)进行选择,然后在碎裂池对选定的母离子进行碎裂,并将碎片离子送至第 2 个质量分析器进行分析检测。在 MRM 实验中,每次仅将 1 个碎片离子送至检测器(第 3 个四极杆,充当二级离子过滤器);在 PRM 实验中,来自母离子的所有碎片离子均由第 2 个质量分析器进行扫描检测。已有报道采用 LC-QQQ MS 多重 MRM 方法分析 LPLA2 和 PLBL2^[22],与非靶向的 HCP 残留发现研究方法相比,该方法的定性能力较弱,且由于 HCP 残留数量较多,导致精准靶向所需的分析时间过长。

本研究拟建立一种灵敏度高、高效快速且适合制药企业分析实验室常规应用的,针对高风险聚山梨酯降解酶定量和工艺过程监控的工作

方案, 流程示于图1。首先采用非靶向方法开展 HCP 残留的发现研究, 使用 LC-QTOF MS 平台鉴定得到聚山梨酯降解酶的蛋白质和肽段; 然后用靶向方法进行目标聚山梨酯降解酶的定量分析, 基于目标蛋白质的特征肽段对照品, 使用 LC-QQQ MS 平台开发 MRM 方法, 实现 HCP 残留的精准定量。考虑到一维常规超高效液相色谱仪在 HCP 非靶向分析时存在的灵敏度局限,

选择 Protein A 亲和层析步骤的粗提液作为 HCP 残留发现研究的代表性样品, 通过非变性酶切的样品前处理方法、大体积进样和 QTOF 的智能化二级质谱采集方法来保障 HCP 残留鉴别的灵敏度。在完成高效鉴别后, 以特征肽段作为对照品, 建立聚山梨酯降解酶的 LC-QQQ-MS-MRM 定量分析方法, 并对方法的专属性、准确度和精密度进行方法学验证。

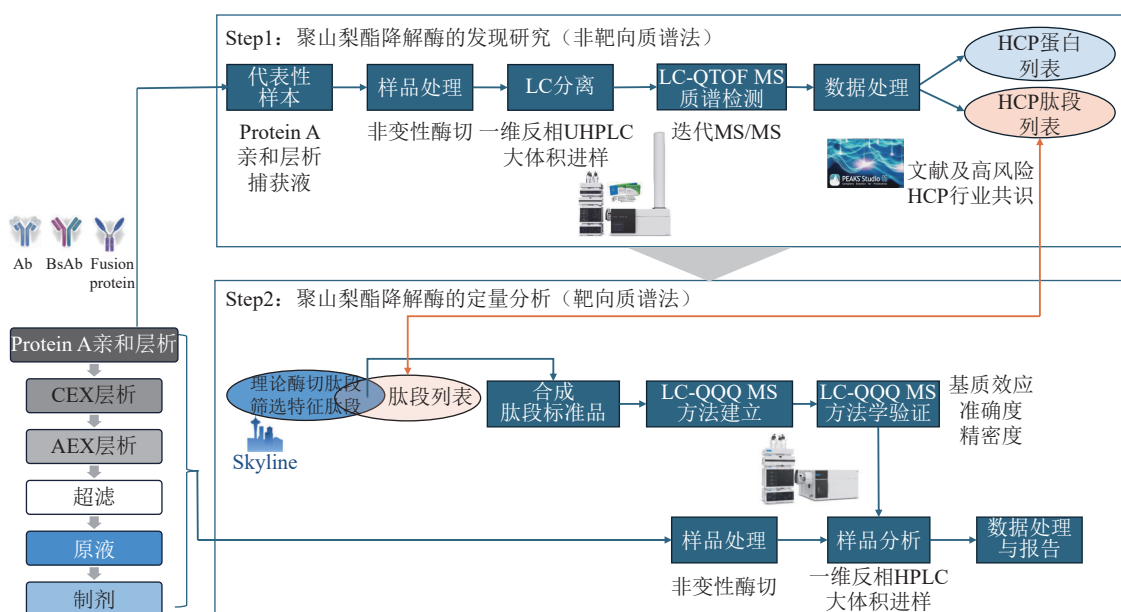


图1 高风险聚山梨酯降解酶发现及定量工作流程

Fig. 1 Workflow for the discovery and quantification of high-risk polysorbate-degrading esterases

1 实验部分

1.1 试剂和样品

曲妥珠单抗: 本实验室留存的效期内样品, 于 4 °C 保存; 胰蛋白酶 (trypsin) 和二硫苏糖醇 (DTT): 美国 Sigma 公司产品; 回收率肽段、特征肽段标准品: 强耀生物有限公司产品; 合成的 4 个特征肽段对照品及其对应的蛋白质分别为 IPVIGPLK (LPLA2), GLEDSYEGR (PLBL2), GLGDVDQLVK (LpL), GNTWSLK (LAL)。回收率肽段的设计序列为 GGRGLEDSYEGRGLGDVDQLVKGGR, 包含 3 个胰蛋白酶酶切位点 (赖氨酸和精氨酸), 用于验证胰蛋白酶的酶切效率。抗体药物原液及纯化工艺过程中样品 (按纯化工艺顺序依次为 Protein A 纯化样品、阳离子交换柱纯化样品和阴离子交换柱纯化样品, 以下简称“原液及工艺样品”): 由上海迈威生物技术有限公司提供, 于 -80 °C 保存; 乙腈、甲酸 (液相质谱级, 1 L/瓶):

德国 Merck 公司产品; 实验用水: 由 Millipore Milli-Q 超纯水系统制备。

1.2 高风险 HCP 残留的鉴定

1.2.1 原液及工艺样品的制备 (非变性酶切法) 分别取抗体药物原液及纯化工艺过程样品, 使用去离子水稀释得到 10 g/L 样品储备液, 分装成 100 μL/份并保存于 -80 °C。取 1 份储备液 (含 1 mg 抗体蛋白) 溶解后, 加入 0.5 mL 低蛋白吸附离心管中; 依次加入 10 μL 1 mol/L 碳酸氢铵溶液、5 μL 0.5 g/L 胰蛋白酶溶液, 然后用超纯水补足至总体积为 200 μL, 最终碳酸氢铵浓度为 50 mmol/L, 胰蛋白酶与抗体蛋白质的质量比为 1:400。将混合液置于 37 °C 条件下孵育 4 h, 然后恢复至室温; 再加入 2 μL 50 g/L DTT 溶液, 于 90 °C 金属浴加热 10 min 以沉淀未完全酶解, 以 13 000 r/min 离心 2 min 去除沉淀, 转移上清液至进样小瓶, 待进样分析。

1.2.2 样品分析 使用 Agilent Infinity III 1290 UHPLC 连接 6545XT 飞行时间高分辨质谱仪。

色谱条件: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流速 0.2 mL/min; 色谱柱温度 60 °C; 流动相 A 为 0.1%甲酸-水溶液, B 为 0.1%甲酸-乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~2 min(1%B), 2~45 min(1%~40%B), 45~47 min(40%~80%B), 47~50 min(80%B), 50~51 min(80%~1%B), 51~60 min(1%B)。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI)正离子模式, 雾化气、干燥气及碰撞气均为氮气, 干燥气温度 250 °C, 鞘气温度 350 °C, 毛细管电压 3 500 V, 喷嘴电压 300 V。使用 AutoMS/MS 结合迭代 MS/MS 采集模式获得更多低含量离子的二级质谱碎片离子; 使用 Agilent MassHunter 12 质谱软件进行数据采集; 使用 Peaks Studio12.5 软件进行数据处理; 从 Uniprot 网站检索 *Cricetulusgriseus*(Chinese hamstr)并下载 CHO 蛋白质总库, 共包含 83 190 个蛋白质。

1.3 HCP 残留的定量分析

1.3.1 原液及工艺样品的制备 按照 1.2.1 节流程处理, 得待测样品。

1.3.2 回收率样品及质控样品的制备 取 100 μL 样品储备液(含 1 mg 抗体蛋白)于 0.5 mL 低蛋白吸附离心管中, 分别加入 2、20 和 200 μg/g 回收率肽段对照品, 制备低(Recovery-L)、中(Recovery-M)、高(Recovery-H)3 个浓度的回收率样品。同样, 取 100 μL 样品储备液(含 1 mg 抗体蛋白)于 0.5 mL 低蛋白吸附离心管中, 分别

加入 0.5、10 和 50 μg/L 特征肽段对照品, 制备低(LQC)、中(MQC)、高(HQC)3 个浓度的质控样品, 每个浓度质控样品配制 3 个平行样品。按照 1.2.1 节方法制备样品, 上清液即为回收率样品和质控样品。

1.3.3 空白基质标准曲线溶液的制备 取若干份 1 g/L 曲妥珠单抗空白对照储备液, 每份 100 μL(相当于 1 mg 抗体样品)。按照 1.2.1 节方法制备样品, 得到基质空白处理液。使用该空白溶液和特征肽段对照品, 配制浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μg/g(已换算为 HCP 相对于抗体的质量浓度)的标准曲线溶液进行采样分析, 使用该标准曲线对目标 HCP 进行定量分析。

1.3.4 样品分析 使用 Agilent Infinity III 1290 UHPLC 连接 6495D 三重四极杆质谱仪。

色谱条件: Agilent ZORBAX RRHD 300SB-C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流速 0.2 mL/min; 色谱柱温度 50 °C; 流动相 A 为 0.1%甲酸-水溶液, B 为 0.1%(V/V)甲酸-乙腈溶液; 梯度洗脱程序: 0~2 min(2%B), 2~10 min(2%~30%B), 10~13 min(30%~90%B), 13~16 min(90%B), 16~17 min(90%~2%B), 17~21 min(2%B)。

质谱条件: ESI 源正离子模式, 雾化气、干燥气及碰撞气均为氮气, 干燥气温度 250 °C, 鞘气温度 350 °C, 毛细管电压 3 500 V, 喷嘴电压 300 V。使用 MRM 采集方式, 特征肽段的 MRM 方法列于表 1; 使用 Agilent Mass Hunter 12 软件进行数据采集和定量计算。

表 1 聚山梨酯降解酶及其特征肽段在三重四极杆质谱上的 MRM 离子对

Table 1 MRM ion pairs of polysorbate-degrading esterases and their characteristic peptide segments on triple quadrupole mass spectrometry

蛋白质 Protein	缩写 Abbreviation	蛋白质资源库序号 UniProt ID	特征肽段 Characteristic peptide	母离子 m/z (价态) Precursor ion m/z (z)	碎片离子 m/z (价态) Fragment ion m/z (z)	碰撞能量 Collision energy/eV
溶酶体磷脂酶A	LPLA2	G3HKV9	IPVIGPLK	419(2+)	626.8(1+)	17
				419(2+)	362.5(2+)	17
磷脂酶 B样2	PLBL2	G3I6T1	GLEDSYEGR	513.5(2+)	855.8(1+)	17
				513.5(2+)	726.7(1+)	13
脂蛋白脂肪酶	LpL	G3H6V7	GLGDVDQLVK	522.6(2+)	874(1+)	17
				522.6(2+)	816.9(1+)	17
脂肪酶/溶酶体酸性脂肪酶	LAL	G3HQY6	GNTWSLK	403.5(2+)	634.7(1+)	14
				403.5(2+)	347.4(1+)	14

2 结果与讨论

2.1 LC-QTOF MS 对高风险 HCP 的鉴定结果

通常使用高分辨液相色谱-质谱联用仪(如 LC-QTOF MS)分析 HCP 残留。在抗体药物中残留的 HCP 经胰蛋白酶酶解处理后,得到肽段混合物;该混合物先经超高效液相色谱分离和四极杆-飞行时间质谱检测,然后采用 Peaks Studio 11 软件进行数据库检索,即可得到 HCP 的鉴定结果,同时可基于质谱响应进行相对定量分析。

尽管使用非变性酶解的样品处理方法已去除大部分抗体蛋白质的干扰^[22],但由于 HCP 残留种类较多且含量差异显著,要求所建立的质谱法需具有更宽的谱图动态范围,以确保不同丰度的肽段都能被采集到高质量的二级碎片离子。LC-QTOF MS 常规的二级采集模式仅能实现单次进样内的动态排除,因此,在样品组分复杂时,低丰度组分信号会出现无法采集到二级碎片离子的情况。经优化,本研究采用 MS/MS 采集模

式,实现了进样针之间的动态排除,即通过多针数据采集实现低丰度二级谱图的最大化,提升了特征肽段鉴定结果的稳定性和准确性。

使用 LC-QTOF MS 法在抗体药物原液及纯化工艺过程样品(按照纯化工艺顺序依次为 Protein A 纯化样品、阳离子交换柱纯化样品和阴离子交换柱纯化样品)中共鉴定到 165 种蛋白质组,其中 6 种是文献^[1]报道的具有聚山梨酯降解功能的高风险 HCP 残留(表 2 中的 2、5、6、9、11、25)。本研究根据 PLBL2、LAL、LPLA2 和 LPL 聚山梨酯降解酶在 LC-QTOF MS 检测中的质谱响应差异,分析其在下述纯化工艺过程中的变化趋势,以含量最高的 Protein A 亲和层析纯化样品为参照的相对定量结果列于表 3。可以看出,大多数聚山梨酯降解酶含量随着多步纯化工艺呈下降趋势,但 PLBL2 在阴离子层析样品中含量反而升高,推测原因是层析纯化不能去除该酯酶杂质,反而随着抗体浓缩出现富集。

表 2 LC-QTOF MS 鉴定的高风险 HCP

Table 2 Identification of high-risk HCP by LC-QTOF MS

序号 No.	名称 Name	蛋白质资源库序号 Uniprot ID	特征肽段1 Unique peptide 1	特征肽段2 Unique peptide 2
1	Carboxypeptidase D (Cpd)	G3HR95	SQEGDSVSVVGR	ESLITLIEK
2	Carboxylesterase 1-like protein, Liver (CES1)	A0A061IFE2	APEEILAEK	MAIALLLQK
3	Procollagen-lysine 2-oxoglutarate 5-deoxygenase_1 (PLOD1)	G3IIE7	SEDYVDIVQGR	FLVEYIAPMTEK
4	78 ku Glucose regulated protein (GRP78, BiP)	G3I8R9	VEIANDQGNR	IINEPTAAAIAVGLDK
5	Phospholipase B-like 2 (PLBL2)	G3I6T1	LTLQLK	—
6	Sialate <i>o</i> -acetyltransferase (SIAE); G3IIB1	G3IIB1	NLAFQGPLPK	GVIWYQGESNEDLNR
7	Matrix metalloproteinase-19 (MMP-19)	G3HRK9	LEDITEALR	LHPDDVAGIQALYK
8	Pyruvate kinase (PK)	G3H3Q1	GDLGIEPAEK	ITLDNAYMEK
9	Lipoprotein lipase (LPL)	G3H6V7	GLGDVDQLVK	LVGNDDVAR
10	Clusterin (CLU)	G3HNJ3	FMDTVAEK	IDSLMESDR
11	Lysosomal acid lipase (LAL)	G3HQY6	MYNEIVNLLR	WPEVIIEDLFGHK
12	Cathepsin B (CatB)	G3H0L9	HEAGDIMGGHAIR	EIMAEIYK
13	Cathepsin L (CatL)	G3INC5	GLDSEESYPYEAKE	LYGTNEEEWR
14	Cathepsin Z (CatZ)	Q9EPP7	NSWGEPWGER	VGDYGLSLGR
15	Serine protease (HTRA1)	G3IBF4	ENTLNMVVR	VTAGISFAIPSDK
16	Glutathione S-transferase P 1 (GSTP1)	P46424	EEVTVVETWR	ILLADQGSWK
17	Peroxiredoxin-1 (PRDX1)	Q9JKY1	ATAVMPDQFR	QITINDLPVGR
18	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	G3GTT2	EAVIFITK	QDWVQTYTK
19	α -Enolase (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase)	G3I0W1	IGAEVYHNLK	SCNCLLLK

续表

序号 No.	名称 Name	蛋白质资源库序号 Uniprot ID	特征肽段1 Unique peptide 1	特征肽段2 Unique peptide 2
20	C-X-C Motif chemokine 3 (CXCL3)	A4URF0	IDFEDIQSLK	DGQEVCLDPEGPR
21	Protein S100-A6 (S10A6)	G3HC31	LQDAEIAR	LMDDLDR
22	Annexin A5 (ANXA5)	G3I5A4	GTVTAFPGFDSR	VLTEIASR
23	Cathepsin D	G3I4W7	DPTGQPGGELMLGGIDSK	VSSLPSVTLK
24	Glutathione-S-transferase (GST)	G3ILF3/G3I3Y6	LLLEYTDSSYEK	VDILENQLMDNR
25	Lysosomal phospholipase A2 (LPLA2)	G3HKV9	ATQFPDGV DVR	VPFGFETFSLEFLDPSKR
26	Matrix metalloproteinase (MMP)	G3HRK9	LEDITEALR	GDYVWTVTDSGPGPLFR
27	Peptidyl-prolylcis-trans isomerase A (PPIA)	P14851	FEDENFILK	EGMNIVEAMER
28	Protein disulfide isomerase (PDI)	Q8R4U2	YKPESDELTAEK	LITLEEEMTK

表3 LC-QTOF MS 法测定原料药和样品中聚山梨酯降解酶的相对含量

Table 3 Relative contents of polysorbate-degrading esterases in drug substances and samples during the manufacturing process by LC-QTOF MS

聚山梨酯降解酶 Polysorbate degradation esterase	相对含量 Relative content/%			
	Protein A纯化样品 Protein A purified sample	阳离子层析样品 Cation exchange chromatograph sample	阴离子层析样品 Anion exchange chromatograph sample	原液 Drug substance
LAL	100.0	58.7	10.9	ND
LpL	100.0	44.2	17.8	ND
LPLA2	ND	ND	ND	ND
PLBL2	100.0	49.1	64.9	2.3

2.2 LC-QQQ MS 对聚山梨酯降解酶的定量分析结果

2.2.1 LC-QQQ MS 定量方法的建立 LC-QTOF MS 的相对含量结果只能表示同一种酯酶在不同工艺过程样品中的含量变化,无法体现不同聚山梨酯降解酶之间的含量差异,因此,难以针对含量较高的酯酶制定更具针对性的改进工艺。此外,LC-QTOF MS 的检测灵敏度不足以检出含量低至百万分之一量级的聚山梨酯降解酶。鉴于此,本研究针对含量低、风险高且可引起聚山梨酯降解的 PLBL2、LAL、LPLA2 和 LPL 酯酶,建立了基于特征肽段定量的 LC-QQQ MS 分析方法。

建立 LC-QQQ MS 方法时,需筛选合理的特征肽段及对应的离子对。使用 Skyline 软件对上述 4 种酯酶进行理论酶切,以筛选特征肽段,特征肽段的选择应避免含有甲硫氨酸、半胱氨酸、色氨酸等易发生化学变化的氨基酸残基。将 LC-QTOF MS 鉴定结果与软件推荐的理论肽段

进行比对分析,最终确定每种酯酶的候选特征肽段,并通过化学合成得到相应的肽段对照品。通过优化 MRM 方法,得到表 1 的离子对和碰撞能量;其中,每个特征肽段均优化得到 2 个 MRM 离子对,避免了单个离子对可能存在的干扰风险。

在质谱检测中,受基质共流出的影响,相同浓度目标物在不同基质背景下的响应强度不同,该差异以基质效应表示。本研究分别将 0.5、10 和 50 $\mu\text{g/g}$ 3 个不同浓度水平的肽段溶解于去离子水和基质空白处理液中,通过对比两者的质谱峰面积来评价基质效应,以验证方法的定量稳定性,示于图 2。可见,基质效应在 -30%~60% 之间。

为避免 HCP 残留与抗体药物自身蛋白质之间显著的丰度差异导致的基质效应,本研究采用非变性酶切方法进行样品制备。首先,在非变性条件下加入胰蛋白酶进行酶解,由于残留 HCP 蛋白分子质量较小,高级结构简单,即使在非变性条件下也能被酶解,而抗体蛋白得以保留。在

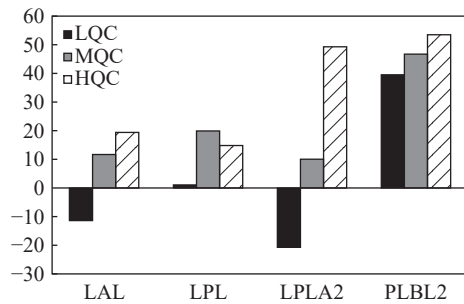


图2 不同浓度下特征肽段的基质效应

Fig. 2 Matrix effects of characteristic peptides at different concentrations

残留 HCP 完成酶解后,加入 DTT,并于 90 °C 条件下使抗体蛋白变性沉淀,经离心后,即可去除大部分抗体蛋白。该样品处理方式降低了酶切肽段混合物的复杂程度,消除了高丰度抗体蛋白质的干扰,使质谱检测残留 HCP 的定量限降低 1~2 个数量级。

除背景蛋白质影响外,残留 HCP 自身的酶切效率也会影响方法回收率,进而影响方法的定量限及准确性。由于残留 HCP 对照品较难获得,因此,本研究使用化学合成的回收率肽段对方法回收率进行评估。该回收率肽段的序列设计为 GGRGLEDSYEGRGLGDVDQLVKGG,其包含 3 个胰蛋白酶酶切位点,以最大程度模拟真实的酶解过程。当回收率肽段加入到空白基质并按照 1.3.2 节方法处理后,其序列中的 GLEDSYEGR 肽段会被酶切并释放出来,通过对其进行定量分析即可得到包含酶切效率在内的方法回收率。本研究对 2、20 和 200 $\mu\text{g/g}$ 3 个不同浓度水平回收率肽段添加样品进行分析,回收率在 97.1%~108.9% 之间,示于图 3。

其包含 3 个胰蛋白酶酶切位点,以最大程度模拟真实的酶解过程。当回收率肽段加入到空白基质并按照 1.3.2 节方法处理后,其序列中的 GLEDSYEGR 肽段会被酶切并释放出来,通过对其进行定量分析即可得到包含酶切效率在内的方法回收率。本研究对 2、20 和 200 $\mu\text{g/g}$ 3 个不同浓度水平回收率肽段添加样品进行分析,回收率在 97.1%~108.9% 之间,示于图 3。

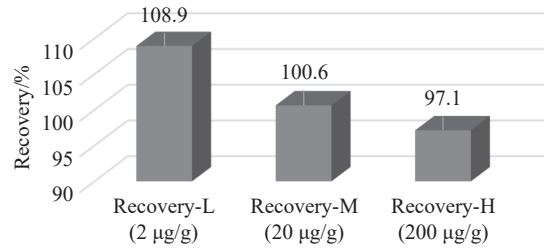
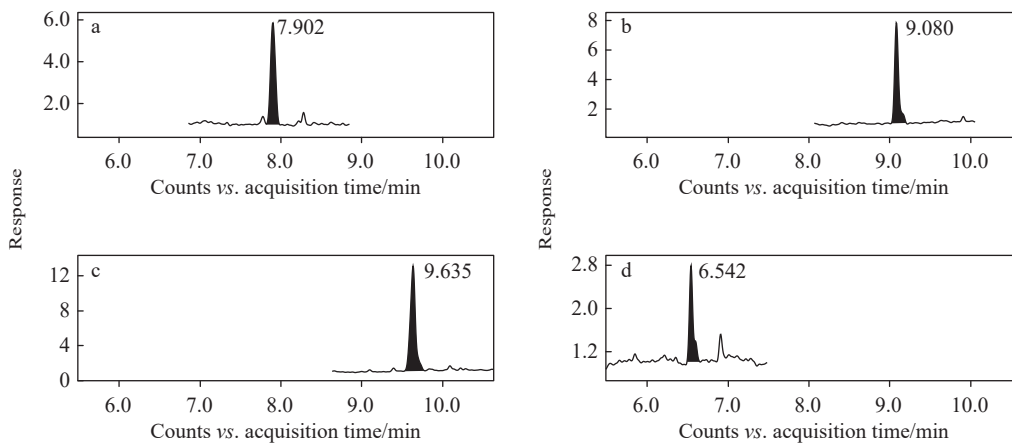


图3 肽段 Recovery-L, Recovery-M 和 Recovery-H 的回收率

Fig. 3 Recoveries of Recovery-L, Recovery-M and Recovery-H

2.2.2 LC-QQQ MS 定量方法的验证 专属性: 在基质空白处理液中添加 0.5 $\mu\text{g/g}$ 特征肽段时,能够获得稳定的、无明显基质干扰的色谱峰信号,示于图 4,表明本方法的专属性和定量稳定性较好。



注: a. LAL; b. LPL; c. LPLA2; d. PLBL2

图4 基质空白处理液中 0.5 $\mu\text{g/g}$ 的特征肽段添加色谱图Fig. 4 Chromatograms of 0.5 $\mu\text{g/g}$ peptide added in blank matrix

准确性: 使用低、中、高 3 个浓度的质控样品,每个浓度设置 3 个平行样,分别计算各浓度的回收率,结果列于表 4。所有样品的回收率均在 88.8%~118.2% 范围内,表明本方法的准确性良好。

精密度: 使用质控样品计算每个样品不同浓度下回收率的相对标准偏差(RSD, $n=3$),以及不同浓度样品回收率总的 RSD($n=9$),结果列于表 4。上述 2 项的 RSD 均小于 15%,表明本方法的精密度良好。

表4 质控样品的准确性和精密度

Table 4 Accuracy and precision of quality control samples

质控样品 QC sample	样品信息 Spike sample	准确性 Accuracy/%				精密度 Precision/%			
		溶酶体 磷酸酶 LPLA2	磷酸酶 B样2 PLBL2	脂蛋白质 脂肪酶 LpL	溶酶体酸性 脂肪酶 LAL	溶酶体 磷酸酶 LPLA2	磷酸酶 B样2 PLBL2	脂蛋白质 脂肪酶 LpL	溶酶体酸性 脂肪酶 LAL
LQC	1	88.8	104.9	108.6	109.4	6.7	5.8	11.0	6.7
	2	101.5	98.2	92.6	96.8				
	3	96.1	110.4	115.2	98.4				
MQC	1	92.1	111.7	111.6	112.7	8.2	0.3	10.1	11.3
	2	103.6	111.3	96.9	90.3				
	3	108.4	110.9	92.2	107.4				
HQC	1	107.1	101.2	111.6	110.5	2.8	5.9	3.3	6.5
	2	103.2	105.5	113.9	118.2				
	3	101.3	113.6	106.7	103.8				
总RSD						6.6	4.9	8.7	8.3

线性关系: 分别以 LPLA2、PLBL2、LpL 及 LAL 的 LQC、MQC 和 HQC 3 个浓度的理论添加量(0.5、10 和 50 $\mu\text{g/L}$)为横坐标, 实测值为纵坐标绘制标准曲线, 考察方法的线性关系, 线性曲线示于图 5。结果表明, 在 0.5~50 $\mu\text{g/g}$ 浓度范围内, 各线性曲线的相关系数(R^2)均大于 0.999,

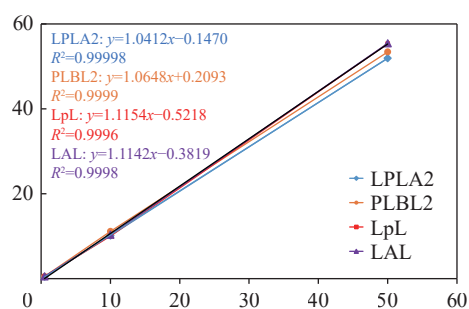


图5 质控样品的线性关系

Fig. 5 Linearity of quality control samples

表5 聚山梨酯降解酶在抗体原液及工艺过程样品中的 LC-QQQ MS 定量结果

Table 5 LC-QQQ MS quantification results of polysorbate-degrading esterases in drug substance and in-process samples

聚山梨酯降解酶 Polysorbate degradation esterase	含量 Content/($\mu\text{g/g}$)			
	Protein A纯化样品 Protein A purified sample	阳离子层析样品 Cation exchange chromatograph sample	阴离子层析样品 Anion exchange chromatograph sample	原液 Drug substance
LAL	5.18	1.45	0.22	ND
LpL	113.03	10.37	2.34	0.20
LPLA2	0.34	ND	ND	ND
PLBL2	563.00	48.32	51.34	3.28

表明本方法的线性关系良好。

检测限与定量限: 通过在空白基质处理液中逐步稀释添加 HCP 特征肽段的方式, 得到本方法的检测限($I/\sigma \geq 10$)和定量限($I/\sigma \geq 3$)分别为 0.1、0.5 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2.3 LC-QQQ MS 定量方法的应用 采用 LC-QQQ MS 定量方法对抗体药物原液及纯化工艺过程中的样品进行聚山梨酯降解酶定量分析, 结果列于表 5。与表 3 相比, 使用 LC-QQQ MS 方法得到的定量结果能够更好地揭示 4 种酶的含量及变化趋势。尽管除 LPLA2 外的 3 种酶含量变化趋势和各步骤的纯化效果基本一致, 但由于它们在样品中的实际浓度存在较大差异, 对工艺优化的改进要求亦有所不同。其中, PLBL2 和 LPL 的含量较高, 需要更好的纯化工艺才能将其从原液中彻底去除。LAL 含量较低, 现有的纯化工艺

已能将其在原液中的含量降至检测限以下。LPLA2作为一种高风险的聚山梨酯降解酶,尽管在样品中含量较低,但基于LC-QQQ MS的高灵敏度定量优势,仍可检测到其在Protein A纯化样品中的含量。

3 结论

本研究建立了一种针对CHO细胞表达的抗体药物中高风险HCP残留监控的工作方案。首先,采用LC-QTOF MS非靶向方法进行高风险HCP鉴别,此方法具有筛查广谱性,能够不依赖聚山梨酯降解酶对照品实现抗体药物中不同种类的HCP残留分析,也无需针对每种残留HCP进行方法优化,方法开发简单且高效;然后采用LC-QQQ MS方法,通过肽段标准品对每种聚山梨酯降解酶进行定量分析,本方法灵敏度高、线性范围宽,能够在20 min内对0.5 $\mu\text{g/g}$ 浓度水平的高风险HCP残留进行准确定量,检测限可达0.1 $\mu\text{g/g}$,可作为目前通用HCP ELISA试剂盒法的补充,实现部分高风险HCP残留的精准鉴别和定量。此外,通过对4种聚山梨酯降解酶的残留量测定和对实际样品的分析,初步验证了该方案的可行性,可用于工艺过程监控以及抗体终产品中聚山梨酯降解酶的定量分析,为抗体药物的工艺优化和制剂开发提供数据支持。

本研究建立的方法可有效解决原有技术中使用纳升液相色谱或二维液相色谱法带来的耗时长、花费高等问题,能够满足CHO细胞表达的不同抗体药物的工艺过程监控和聚山梨酯降解酶杂质蛋白质的定量检测,可帮助药物研发企业从早期开发阶段开始关注并监控高风险HCP残留的影响,并在下游纯化过程中依据去除效果优化工艺。此外,由于使聚山梨酯降解的酶活性不同,仅监控蛋白质含量不足以指导工艺开发,未来可考虑以活性最高的酶为参照,计算得到其余聚山梨酯降解酶的相对活性,并建立酶活性与蛋白质含量之间的当量关系,从而更准确地描述HCP残留与聚山梨酯降解酶之间的定量关系。

致谢: 感谢上海迈威生物技术有限公司提供样品。

参考文献:

- [1] JONES M, PALACKAL N, WANG F, GAZA-

BULSECO G, HURKMANS K, ZHAO Y, CHITIKILA C, CLAVIER S, LIU S, MENESALE E, SCHONENBACH N S, SHARMA S, VALAX P, WAERNER T, ZHANG L, CONNOLLY T. "High-risk" host cell proteins (HCPs): a multi-company collaborative view[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(8): 2 870-2 885.

- [2] KERWIN B A. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2008, 97(8): 2 924-2 935.

- [3] 贾东晨, 何伍. 抗体药物制剂处方中的可见异物/不溶性微粒[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(10): 933-936.

JIA Dongchen, HE Wu. The visible particles or insoluble particles in antibody drug formulations[J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2022, 31(10): 933-936(in Chinese).

- [4] DIXIT N, SALAMAT-MILLER N, SALINAS P A, TAYLOR K D, BASU S K. Residual host cell protein promotes polysorbate 20 degradation in a sulfatase drug product leading to free fatty acid particles[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(5): 1 657-1 666.

- [5] LARSON N R, WEI Y, PRAJAPATI I, CHAKRABORTY A, PETERS B, KALONIA C, HUDAK S, CHOUDHARY S, ESFANDIARY R, DHAR P, SCHÖNEICH C, MIDDAGH C R. Comparison of polysorbate 80 hydrolysis and oxidation on the aggregation of a monoclonal antibody[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 109(1): 633-639.

- [6] CHIU J, VALENTE K N, LEVY N E, MIN L, LENHOFF A M, LEE K H. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2017, 114(5): 1 006-1 015.

- [7] HALL T, SANDEFUR S L, FRYE C C, TULEY T L, HUANG L. Polysorbates 20 and 80 degradation by group XV lysosomal phospholipase A2 isomer X1 in monoclonal antibody formulations[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(5): 1 633-1 642.

- [8] ZHANG S, XIAO H, MOLDEN R, QIU H, LI N. Rapid polysorbate 80 degradation by liver carboxylesterase in a monoclonal antibody formulated drug substance at early stage development[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2020, 109(11): 3 300-3 307.

- [9] GRAF T, TOMLINSON A, YUK I H, KUFER R,

- SPENSBERGER B, FALKENSTEIN R, SHEN A, LI H, DUAN D, LIU W, WOHLRAB S, EDELMANN F, LEISS M. Identification and characterization of polysorbate-degrading enzymes in a monoclonal antibody formulation[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 110(11): 3 558-3 567.
- [10] LI X, WANG F, LI H, RICHARDSON D D, ROUSH D J. The measurement and control of high-risk host cell proteins for polysorbate degradation in biologics formulation[J]. *Antibody Therapeutics*, 2022, 5(1): 42-54.
- [11] ALLMENDINGER A, LÉBOUC V, BONATI L, WOEHHR A, KISHORE R S K, ABSTIENS K. Glass leachables as a nucleation factor for free fatty acid particle formation in biopharmaceutical formulations[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 110(2): 785-795.
- [12] ROGSTAD S, FAUSTINO A, RUTH A, KEIRE D, BOYNE M, PARK J. A retrospective evaluation of the use of mass spectrometry in FDA biologics license applications[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28(5): 786-794.
- [13] CHEN G. Characterization of protein therapeutics using mass spectrometry[M]. Springer US, 2013.
- [14] MILLÁN-MARTÍN S, JAKES C, CARILLO S, ROGERS R, REN D, BONES J. Comprehensive multi-attribute method workflow for biotherapeutic characterization and current good manufacturing practices testing[J]. *Nat Protoc*, 2023, 18(4): 1 056-1 089.
- [15] GERVAIS A, DIRKSEN E H C, POHL T, BECHTOLD-PETERS K, BURKITT W, D'ALESSIO V, GREVEN S, LENNARD A, LI X, LÖSSNER C, NIU B, REUSCH D, O'RIORDAN T, SHEARER J W, SPENCER D, XU W, YI L. Compliance and regulatory considerations for the implementation of the multi-attribute-method by mass spectrometry in a quality control laboratory[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2023, 191: 57-67.
- [16] 谢力琦, 王静, 朱添怡, 王佳馨, 黄懿, 乔亮. 生物质谱在生物制品宿主细胞蛋白残留分析中的应用[J]. *质谱学报*, 2024, 45(2): 193-200.
- XIE Liqi, WANG Jing, ZHU Tianyi, WANG Jiaxin, HUANG Yi, QIAO Liang. Progress in residual host cell proteins analysis of biologics by mass spectrometry[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2024, 45(2): 193-200(in Chinese).
- [17] 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): 458-465.
- YU Jiwei, YIN Hongrui, SHAO Hong. Application progress of mass spectrometry technology in the detection of host cell proteins in monoclonal antibodies[J]. *Chinese Journal of Pharmacoepidemiology*, 2023, 32(4): 458-465(in Chinese).
- [18] THOMAS S N, FRENCH D, JANNETTO P J, RAP-POLD B A, CLARKE W A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2022, 2(1): 96.
- [19] MOLDEN R, HU M, YEN E S, SAGGESE D, REILLY J, MATTILA J, QIU H, CHEN G, BAK H, LI N. Host cell protein profiling of commercial therapeutic protein drugs as a benchmark for monoclonal antibody-based therapeutic protein development[J]. *mAbs*, 2021, 13(1): 1 955 811.
- [20] HUANG L, WANG N, MITCHELL C E, BROWNLEE T, MAPLE S R, de FELIPPIS M R. A novel sample preparation for shotgun proteomics characterization of HCPs in antibodies[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(10): 5 436-5 444.
- [21] 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.
- [22] GAO X, RAWAL B, WANG Y, LI X, WYLIE D, LIU Y H, BREUNIG L, DRISCOLL D, WANG F, RICHARDSON D D. Targeted host cell protein quantification by LC-MRM enables biologics processing and product characterization[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(1): 1 007-1 015.
- (收稿日期: 2025-06-07; 修回日期: 2025-09-19)