

液质联用法鉴定、定量宿主细胞蛋白

Catalin Doneanu, Keith Fadgen, StJohn Skilton, Martha Stapels, Weibin Chen
1Waters Corporation, Milford, MA 01757

摘要:

使用细胞系表达产生的蛋白类药物不可避免的会含有宿主细胞自身的某些蛋白质，及宿主细胞蛋白（HCPs， host cell proteins）。即使经过成熟的纯化过程，仍会有一些宿主细胞蛋白的残留，而这些杂志蛋白的存在对于蛋白药物使用的安全性存在着巨大的隐患。因此必须对宿主细胞蛋白进行监控。与传统的ELISA方法相比，液质方法具有开发时间短，无偏性检测，方法可调整性高等诸多优点，本文就应用液质联用方法进行宿主细胞蛋白的分析方法进行了简要举例。

关键词: 宿主细胞蛋白; 液质联用

中图分类号: 文献标志码: 文章编号:

Identification and Quantification of HCPs by LCMS method

Catalin Doneanu, Keith Fadgen, StJohn Skilton, Martha Stapels, Weibin Chen
1Waters Corporation, Milford, MA 01757

ABSTRACT:

Even after sophisticated purification steps, many Host cell proteins (HCPs) still leaves in the protein drug product, which is from recombinant DNA technology. Comparing to ELISA method, the LCMS method needs less development time, is objective and easy to change. This paper give a short example of MS method for HCPs analysis.

Key words: Host cell proteins (HCPs), LCMS

使用细胞系表达产生的蛋白类药物不可避免的会含有宿主细胞自身的某些蛋白质，及宿主细胞蛋白（HCPs， host cell proteins）。即使经过成熟的纯化过程，仍会有一些宿主细胞蛋白的残留，而这些杂志蛋白的存在对于蛋白药物使用的安全性存在着巨大的隐患。传统的ELISA方法开发时间较长，一般需要数月至一年以上。其次，其监控的对象只是抗体特异结合的某些宿主细胞蛋白，具有片面性，对于突然产生的杂质蛋白无检测能力。此外，ELISA方法可应变性差，如果需要对新蛋白的检测，往往需要完全重复开发过程。相比之下液质方法具有开发时间短，无偏性检测，方法可调整性高等诸多优点。分析时首先使用2D nanoLC-MSMS液质平台以及Hi3方法对杂质蛋白进行鉴定及定量，进行方法开发，之后再使用1D UPLC MRM方法进行大批量样品检测。

1.材料与方法

1、实验样品

使用DG-44及CHO细胞系表达，采用不同纯化方法得到的anti-phosphotyrosine使用ProSep-vA柱纯及MabSelect Sure柱纯化。加入ADH、PHO、BSA、ENL为已知浓度外源蛋白，用于验证方法正确性。

2、2D RP-RP UPLC Hi3方法用于宿主细胞鉴定与定量

液相：2D UPLC 系统， NanoACQUITY UPLC with2D Technology and on line dilution）。

第一维：pH 10下反相分离，色谱柱为XBridge BEH 300 C₁₈ 5μm，1×50mm，流速10μL/min。流动相：A为20mM甲酸铵 pH10，B为乙腈。分十步洗脱，B相比分别为10.8%、12.4%，14%，15%，16.7%、18.6%、20.4%、25%、30%、50%。稀释液为0.1%TFA 流速100 μ L/min。富集柱为Symmetry C₁₈ 0.5 × 20mm 5μm。第二维：色谱柱ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 0.3 × 150mm，1.7μm，柱温65℃,12μL/min。A相，0.1 FA 水，B相0.1%FA ACN，梯度30分钟B相从7%提升至35%

质谱方法：质谱系统SYNAPT HDMS，采集方法MS^E，采集范围50m/z-1990m/z，正离子模式，源电压2.6kV，锥孔电压37V，源温120℃，碰撞能量15-35eV。

3、1D UPLC MRM批量检测平台

液相系统：ACQUITY UPLC，色谱柱为ACQUITY UPLC BEH300 C₁₈ 2.1 × 150mm 1.7μm，柱温35℃。

质谱系统：Xevo TQ MS，锥孔电压37V，源电压3.5kV，源温90℃，MS1/MS2窗口为0.75Da，驻留时间20-30ms。

4、分析软件

ProteinLynx Global SERVER (PLGS) 2.4

2.结果与讨论

在第一步宿主细胞鉴定与定量过程中，与传统的SCX-RP二维方法相比，使用双反相（RP-RP）在线二维色谱分离，可以使样品分离更加充分，而使RP-RP蛋白鉴定数目更多。此外，由于不必使用高浓度盐溶液，使RP-RP分离方法更加易用（图1）^[1-2]。Hi3蛋白定量方法是基于MSE串联质谱方法的非标定量蛋白技术，不仅已经过多年广泛地应用，而且定量准确，方法简单^[3-4]。DG-44及CHO细胞系表达的，不同纯化方法得到的anti-phosphotyrosine IgG1中的宿主细胞蛋白鉴定及定量结果如表1。

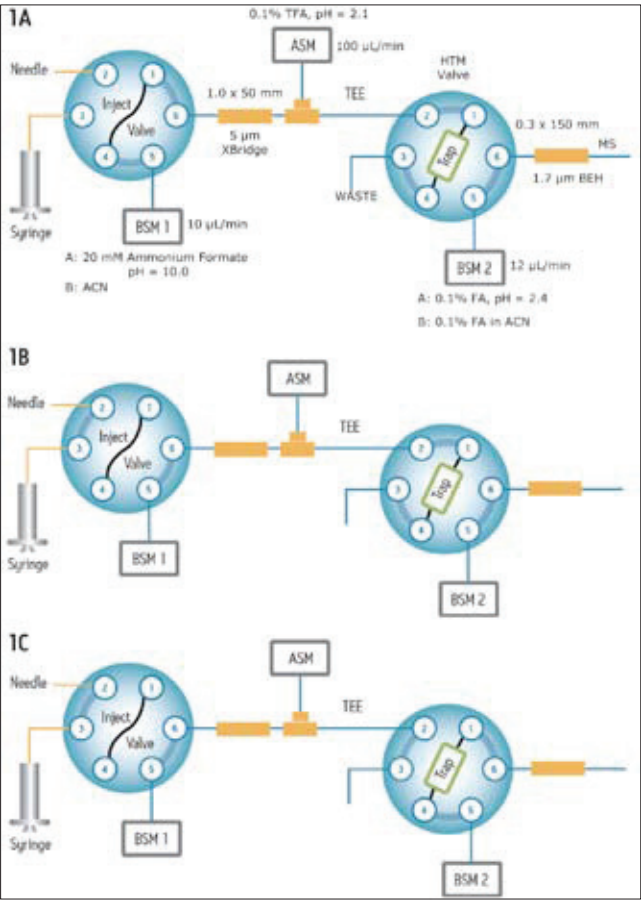


图1:2D RPRP UPLC 色谱示意图。

Prot no	Protein Description	Protein concentration (ppm)					
		DG-44 cells				CHO-S cells	
		A1	A2	B1	B2	C	D
1	Nucleolin: Mus musculus; aequorin: Golden hamster		181	1615	3034		
2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein: Mus musculus			1459	2613		
3	Elongation factor 1a: Mus musculus	354	145	1705	1354	142	533
4	Procollagen 1 endopeptidase enhancer 1: Mus musculus			1655	1265		
5	Actin cytoplasmic isoform: Mus musculus; aequorin: Golden hamster	907	956	813	877	287	45
6	Clusterin: Mus musculus	1010	1068	658	815	537	189
7	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (PHO)	621	443	536	658	801	621
8	Phenylethanolamine N-methyltransferase: Mus musculus			400	484		
9	Lysosomal lipase: Mus musculus; aequorin: Golden hamster	1788	481	689	404		
10	78 kDa glucose-regulated protein: Mus musculus; aequorin: Golden hamster	251	341	168	453		
11	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: Golden hamster	448	771	573	442	104	31
12	Nucleon polypeptide associated complex subunit: Mus musculus			494	440		40
13	Nucleon 1: Mus musculus	38	263	47	300		
14	T complex protein 1 subunit: Mus musculus	100	271	95	296		
15	Serine protease HTRA1: Mus musculus	545	295	471	296		
16	High-mobility group protein isoform: Mus musculus			113	278		59
17	45S ribosomal protein S3: Mus musculus	354	323	268	278		
18	Alpha-fetoprotein: bovine - Lb	120	260	255	270	200	104
19	Lysosomal alpha-glucosidase: Mus musculus	40	385	752	268		
20	Nucleon sensitive element binding protein 1: Mus musculus			17	296	208	
21	Pyruvate kinase isoenzyme M2: Mus musculus	242	332	143	186		
22	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15			152	161		
23	Heat shock protein HSP 90 beta: Mus musculus	76	114	121	154		
24	Nucleophosmin: Mus musculus			96	145		
25	Insulin-like growth factor binding protein 4: Mus musculus			352	578		53
26	Complement C3b convertin: factor related protein 4	53	51	364	304		
27	Exon-junction complex formation factor: Mus musculus	26	38	239	86	17	
28	Alcohol dehydrogenase (non)-ADH	72	59	81	83	101	77
29	Interleukin enhancer binding factor 2: Mus musculus			71	81		
30	Laminin subunit: Mus musculus			31	71		
31	Guanine nucleotide binding protein subunit: Mus musculus	52	86	44	78		
32	Serum albumin precursor: bovine - BSA	46	25	47	57	63	46
33	Cathexin: Mus musculus	15	39	21	53		
34	Perlecan: Mus musculus	31	33	39	49		
35	Heat shock cognate 71 kDa protein: Mus musculus	122	212				
36	Heat shock protein HSP 90 alpha: Mus musculus	71	83				
37	Tubulin isoform: Mus musculus	122	147			81	86
TOTAL ppm HCPs (without considering the spiked proteins)		5945	7793	12097	15352	1751	1020
PGL1 spiking		54.25	62.81	87.10	84.30	98.05	98.98

表1: DG-44及CHO细胞系表达的, 不同纯化方法得到的anti-phosphotyrosine IgG1中的宿主细胞蛋白鉴定及定量结果。A1、A2、C为使用ProSep-vA柱纯化, B1、B2、D为使用MabSelect Sure柱纯化。A1与A2为B1与B2为生DG-44mamster细胞实验水平重复, C与D为CHO-S细胞表达系统重复实验。ADH、PHO、BSA、ENL为加入的已知浓度外源蛋白, 用于验证方法正确性。

在HCP蛋白列表简历好之后, 为了提高质控工作效率, 可进一步使用1D UPLC MRM方法, 对样品批量样品中的HCP进行检测。图2所示结果显示, 1D UPLC MRM与2D UPLC Hi3方法的蛋白定量结果一致。

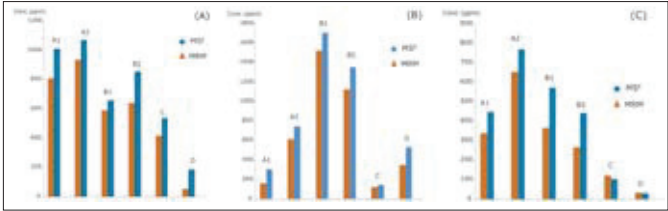


图2: 使用1D UPLC MRM方法, 对样品批量样品中的HCP进行检测。A图蛋白为对Clusterin丹巴的检测对比, B为Elongation factor 1-alpha, C为Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

小结:

使用2D RPRP UPLC Hi3方法可以对生物药产品中的低丰度宿主细胞蛋白进行鉴定和定量, 定量动态范围在4-5个数量级。通过高通量的UPLC MRM方法可以快速准确地检测HCP蛋白含量。

REFERENCES

1. Zhou F, Cardoza JD, Ficarro SB, Adelmant GO, Lazaro JB, Marto JA. Online Nano ow RP-RP-MS Reveals Dynamics of Multicomponent Ku Complex in Response to DNA Damage. J Proteome Res. 2010, 9, 6242-6255.
2. Gilar M, Olivova P, Daly AE, Gebler JC. Two-dimensional separation of peptides using RP-RP-HPLC system with different pH in rst and second separation dimensions. J. Sep. Sci. 2005, 28, 1694–1703.
3. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ. Absolute Quantification of Proteins by LCMS. Mol Cell Proteomics. 2006, 5, 144-156
4. Silva JC, Denny R, Dorschel C, Gorenstein MV, Li GZ, Richardson K, Wall D, Geromanos SJ. Simultaneous Qualitative and Quantitative Analysis of the Escherichia coli Proteome. Mol Cell Proteomics. 2006, 5, 589-607.