

采用 Agilent 6495C 三重四极杆 LC/MS 系统定量分析宿主细胞蛋白质杂质

作者

Linfeng Wu
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了 mAb 产品中亚 ppm 宿主细胞蛋白质杂质的定量分析方法。本工作流程采用 Agilent AssayMAP Bravo 平台、Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统和 Agilent 6495C 三重四极杆 LC/MS 系统。

前言

宿主细胞蛋白 (HCP) 杂质是低浓度的蛋白质杂质，来源于生物药物生产过程中的宿主生物。由于它们可能影响产品安全性和功效，因此根据法规要求必须对药品中的 HCP 进行监测和控制^[1]。传统上，酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 是定量分析蛋白质治疗药物中 HCP 的标准方法。然而，ELISA 的特异性和覆盖率不足以鉴定并定量分析各种 HCP。因此，LC/MS 技术成为 HCP 分析的另一选择。在 HCP 的 LC/MS 定量分析过程中，主要挑战在于低丰度 HCP 肽段与高丰度药品肽段的共洗脱。因此需要在药品基质的高背景下对低丰度肽进行灵敏而可重现的定量分析。

本应用简报介绍了用于宿主细胞蛋白质高灵敏度定量分析的完整工作流程解决方案，包括：

- 用于样品自动前处理的 Agilent AssayMAP Bravo 平台
- 用于样品分离的 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪
- 用于数据采集的 Agilent 6495C 三重四极杆 LC/MS 系统
- 用于 MRM 方法开发的 Skyline 软件中的安捷伦自动化工具
- 使用 Agilent MassHunter 定量分析软件和 Skyline 软件进行数据处理

使用基于多反应监测 (MRM) 的同位素稀释方法，结果显示可准确定量低至亚 ppm (ng/mg) 浓度的 HCP。

实验部分

仪器

- Agilent AssayMAP Bravo 系统 (G5571AA)
- Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统包括：
 - Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
 - Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)，配备样品冷却装置选件 (选件 100)
 - Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)
- Agilent 6495C 三重四极杆 LC/MS 系统
- 安捷伦喷射流 ESI 离子源 (G1958-65138)

材料

人 IgG1 mAb (来自合作伙伴的一种研发产品) 由中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞产生，并经过 Protein A 纯化。重型稳定同位素标记 (SIL) 肽标准品由第三方供应商定制合成 (表 1)。所有 SIL 肽经 HPLC 纯化，质量通过 LC/MS 和氨基酸分析测定。

表 1. 液相色谱参数

液相色谱参数	
分析柱	表面带电荷的反相 C18 色谱柱
流动相 A	H ₂ O, 0.1% 甲酸
流动相 B	90% 乙腈水溶液, 0.1% 甲酸
流速	0.5 mL/min
进样量	20 µL
梯度	0 min → 3% B 1 min → 3% B 10 min → 21% B 10.5 min → 90% B 12 min → 90% B 12.5 min → 3% B
停止时间	13 min
后运行时间	1 min
柱温	60 °C

样品前处理

使用 AssayMAP Bravo 系统进行 mAb 样品变性、还原、烷基化和胰蛋白酶解。将 SIL 肽以等摩尔浓度混合，并以 8 种不同浓度 (每种 SIL 肽浓度为 6.25、12.5、25、62.5、125、250、12500、125000 amol/µg) 加入样品酶解物中，用于定量分析。

LC/MS 分析

使用 9 分钟液相色谱梯度，通过 6495C 三重四极杆 LC/MS 在 dMRM 模式下分析样品。表 1 和表 2 详细列出了色谱和质谱分析的实验条件。使用与 Skyline 和 Agilent MassHunter 工作站软件集成的安捷伦自动化工具对 LC-dMRM 方法进行自动优化。

数据处理

使用 Agilent MassHunter 工作站软件和 Skyline 软件进行多肽定量的数据分析。

表 2. Agilent 6495C 三重四极杆 dMRM 方法

参数	设置
离子模式	喷射流, 正离子
气体温度	150 °C
干燥气流速	19 L/min
雾化器气体	35 psi
鞘气温度	250 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V
喷嘴电压	0 V
高/低压力 RF 电压	200/110 V
Delta EMV	200 V
Q1 和 Q3 分辨率	Unit/Unit
分析周期	500 ms
最小/最大驻留时间	28.85 ms/60.39 ms

结果与讨论

LC-dMRM 方法开发

为了评估 HCP 分析的定量性能，使用 AssayMAP Bravo 自动化系统使纯化的 mAb 经历变性、还原、烷基化和胰蛋白酶酶解。将该样品酶解物在以下实验中用作 mAb 背景基质。将三种 SIL 标准肽加入样品酶解物中进行标准曲线分析，包括两种与 SUMO1 和 SYHC 外源蛋白匹配的肽和一种与内源性 HCP（即 CHO 蛋白质 S100-A11）匹配的肽（表 3）^[2]。所有 SIL 肽标准品的纯度大于 95%。

使用 MassHunter 和 Skyline 自动化工作流程优化 LC-dMRM 方法（图 1）。在此工作流程中，首先在 Skyline 软件中创建目标肽段和离子对。使用自动化工具自动创建和执行 MRM 方法和任务列表，以确定多肽保留时间，优化碰撞能量，分析数据并导出最终 LC/MS 方法^[3]。

mAb 基质中 SIL 肽标准品的定量分析

在 mAb 背景基质中评估定量分析三种 SIL 肽标准品的灵敏度性能。空白进样建立系统清洁度后，对所有浓度进行重复进样 (n = 5)，浓度范围为 6.25 amol/μg 至 125 fmol/μg，每次进样的载样量为 8 μg（表 4）。所有目标蛋白质的标准曲线范围从低至亚 ppm 到超过 1000 ppm，涵盖了与 HCP 分析相关的较宽范围。确定了所有样品 (n = 40) 的保留时间 (RT) 重现性，以及每种浓度的峰面积重现性和定量分析准确度：

使用安捷伦自动化工具，只需三步即可轻松实现自动 MRM

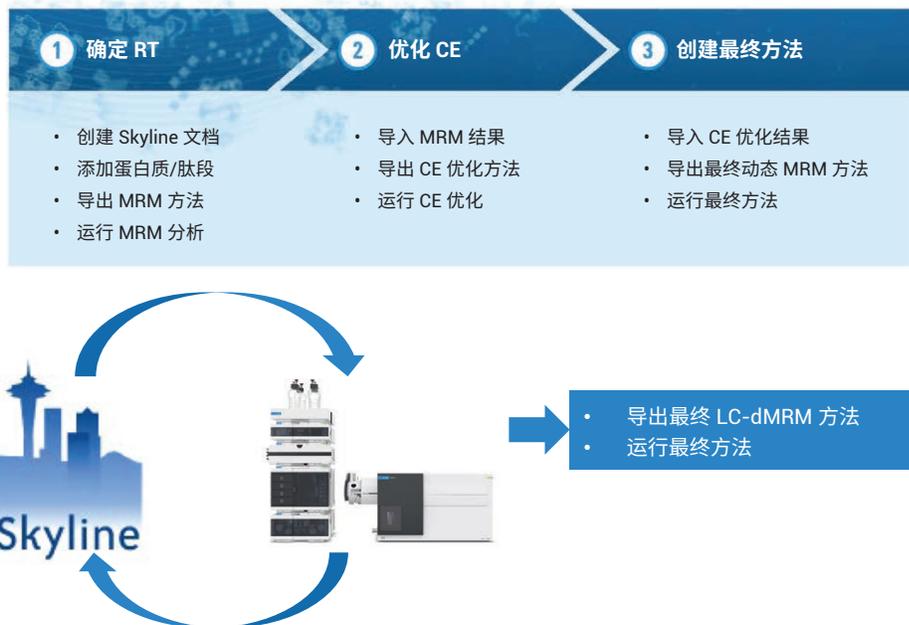


图 1. Skyline 上的安捷伦自动化工具

表 3. 目标蛋白质、肽和离子对

目标蛋白质	蛋白质来源	目标肽段序列	SIL 肽质量 (%)	监测离子对 (m/z)
SUMO1_HUMAN	UPS2 蛋白质标准品	LLEYLEEK	98.2	575.3 → 1036.6
				575.3 → 923.5
				575.3 → 810.4
				575.3 → 681.3
				579.3 → 1044.6
				579.3 → 931.5
				579.3 → 818.4
579.3 → 689.4				
SYHC_HUMAN	UPS2 蛋白质标准品	VFDVIIR	96.2	431.3 → 762.5
				431.3 → 615.4
				431.3 → 500.4
				431.3 → 401.3
				436.3 → 772.5
				436.3 → 625.4
				436.3 → 510.4
436.3 → 411.3				
蛋白质 S100-A11 (G3HUU6)	CHO 细胞	DPGVLDLR	95.1	386.2 → 559.3
				386.2 → 502.3
				386.2 → 403.2
				391.2 → 569.3
				391.2 → 512.3
391.2 → 413.2				

- 所测试的浓度具有出色的线性，LLEYLEEK 的 $R^2 = 0.9993$ ，VFDVIIR 的 $R^2 = 0.9990$ ，DPGVLDR 的 $R^2 = 0.9995$ (图 2A 至图 4A)
- 所有浓度均表现出出色的精度和准确度，包括定量下限 (LLOQ) (表 4)
- 全部三种蛋白质在低浓度下具有高灵敏度，LLOQ 低至亚 ppm 级 (图 2B 至图 4B 和表 4，SUMO1_HUMAN 为 0.48 ppm，SYHC_HUMAN 为 0.7 ppm，CHO 蛋白质 S100-A11 为 0.13 ppm)
- SIL 肽 VFDVIIR 和 DPGVLDR 存在一些背景基质干扰。即便如此，目标蛋白质仍获得了亚 ppm 的 LLOQ (图 3B 和图 4B)
- 所有 40 次进样均具有出色的 RT 重现性 (LLEYLEEK 的 RSD = 0.06%，VFDVIIR 的 RSD = 0.08%，DPGVLDR 的 RSD = 0.47%)

本实验所用色谱柱的载样容量大于 $8 \mu\text{g}^{[2]}$ 。因此，如由需要，可柱上进样更高载样量来实现更低的 LLOQ 浓度。

表 4. mAb 基质中 SIL 肽的精度和准确度。LLOQ 浓度以红色突出显示

蛋白质名称/分子量	SUMO1_HUMAN/38815 Da			SYHC_HUMAN/58233 Da			蛋白质 S100-A11 (G3HUU6)/11241 Da		
	LLEYLEEK			VFDVIIR			DPGVLDR		
SIL 肽加标浓度 (amol/ μg)	%RSD (n = 5)	%准确度	蛋白质浓度* (ppm)	%RSD (n = 5)	%准确度	蛋白质浓度* (ppm)	%RSD (n = 5)	%准确度	蛋白质浓度* (ppm)
6.25	11.3	144.0	0.24	18.1	160.1	0.35	15.8	137.5	0.07
12.5	14.5	110.2	0.48	3.3	114.8	0.70	8.2	106.2	0.13
25	3.4	98.2	0.95	8.7	92.9	1.40	8.3	103.2	0.27
62.5	1.5	84.2	2.38	3.7	80.5	3.50	5.3	82.9	0.67
125	4.0	80.3	4.77	2.7	80.1	7.00	9.0	87.8	1.34
250	2.2	81.5	9.53	3.1	80.1	14.01	4.9	88.1	2.67
12500	2.3	94.0	476.45	1.2	90.9	700.25	1.2	93.8	133.63
125000	1.9	100.7	4764.54	0.6	101.0	7002.52	0.6	100.7	1336.27

* 根据 SIL 多肽纯度调整

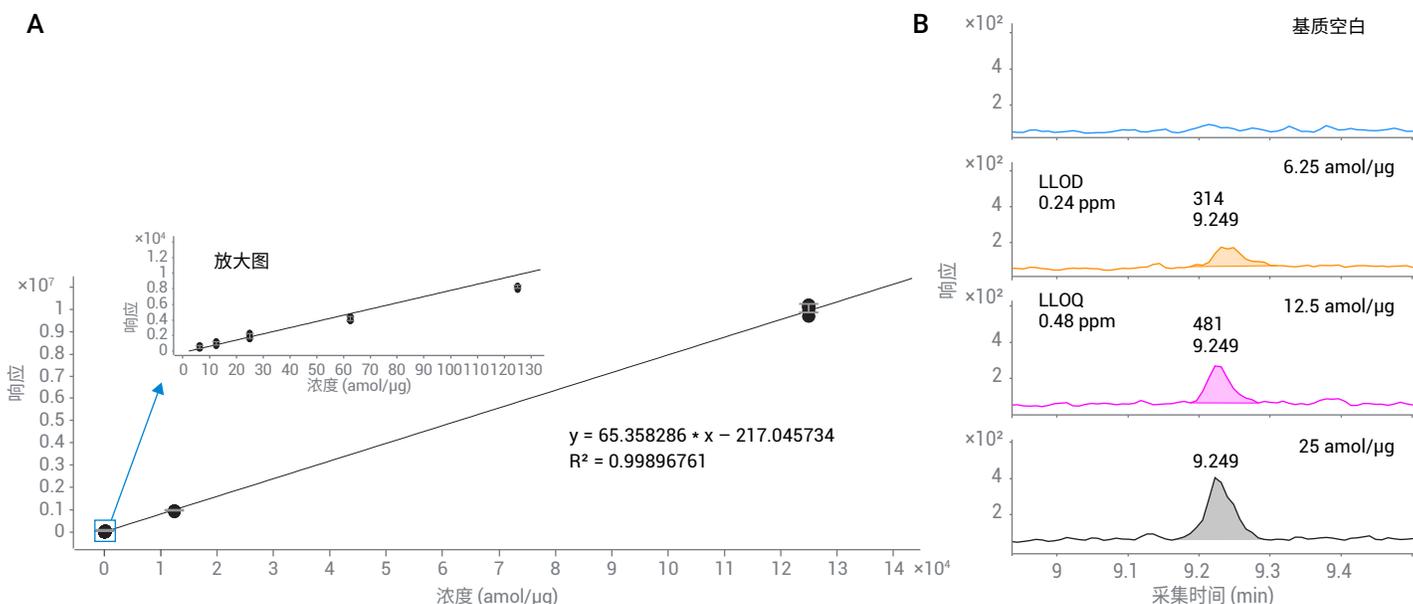


图 2. 胰蛋白酶酶解后的 mAb 基质中重型肽标准品 LLEYLEEK 的定量分析结果。A) 标准曲线，附带插图显示低浓度曲线的详细信息。B) 显示出 LOD 和 LLOQ 的叠加提取离子色谱图

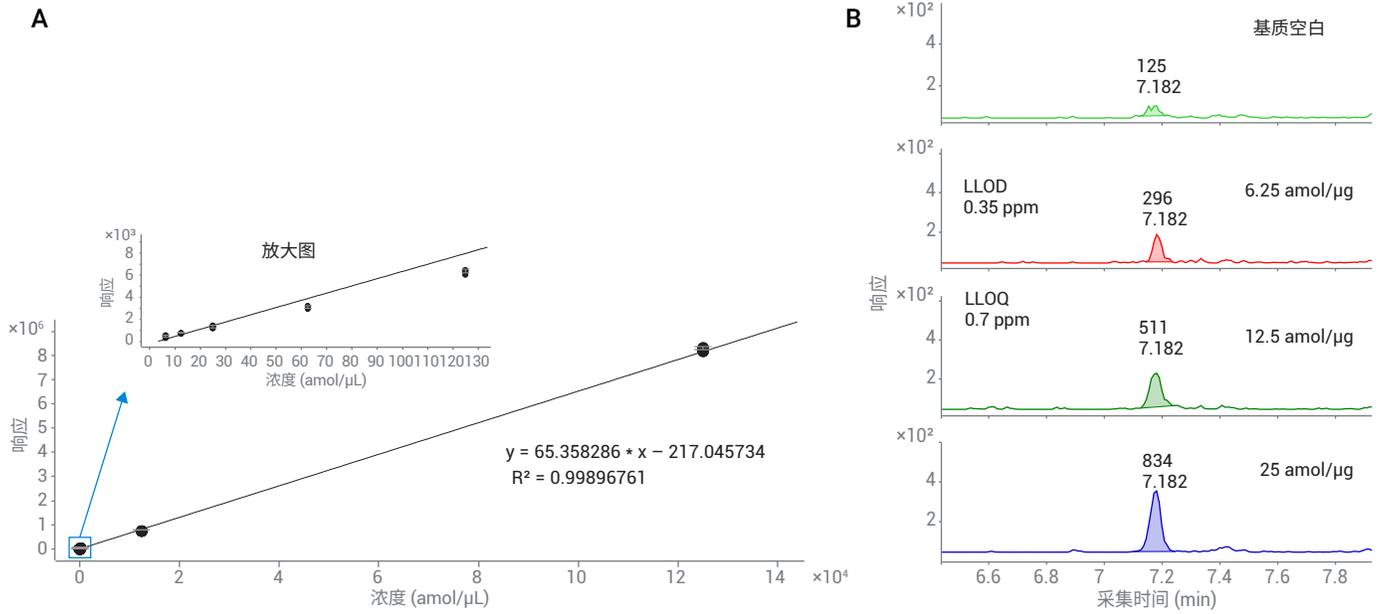


图 3. 胰蛋白酶酶解后的 mAb 基质中重型肽标准品 VFDVIIR 的定量分析结果。A) 标准曲线，附带插图显示低浓度曲线的详细信息。B) 显示出 LOD 和 LLOQ 的叠加提取离子色谱图

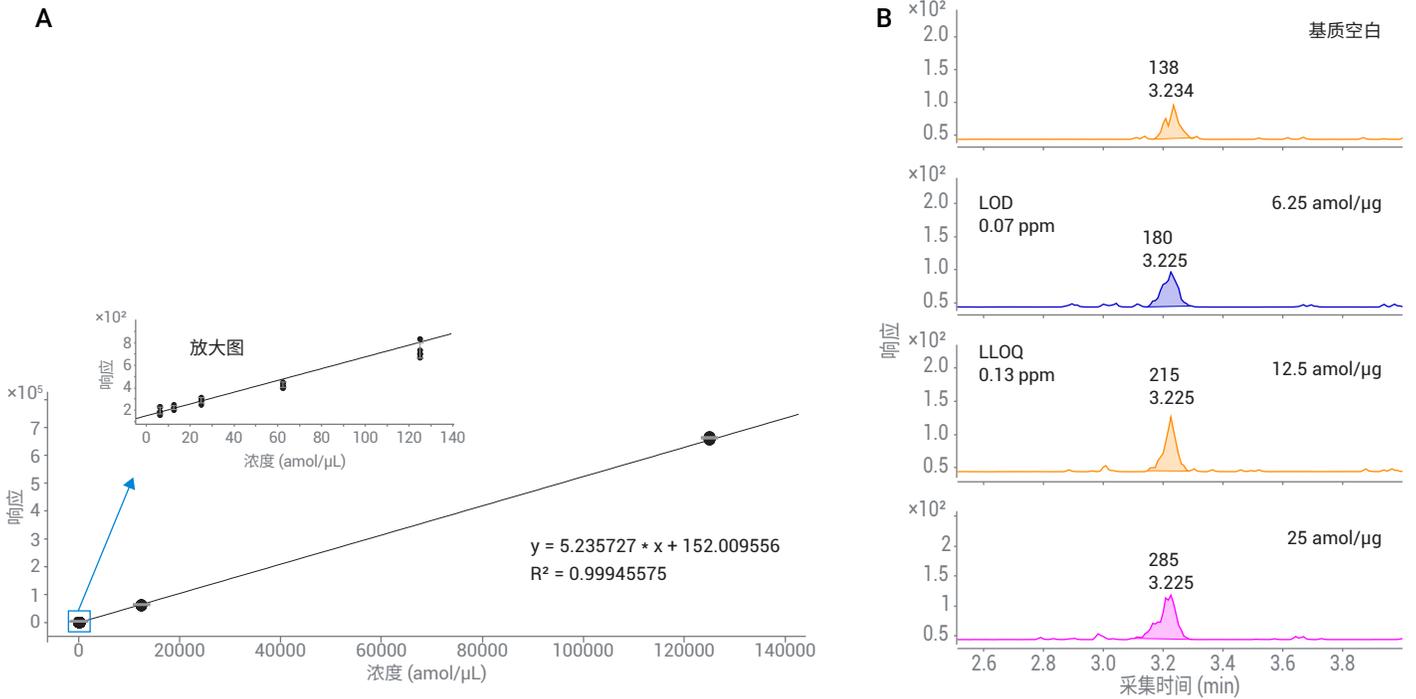


图 4. 胰蛋白酶酶解后的 mAb 基质中重型肽标准品 DPGVLDR 的定量分析结果。A) 标准曲线，附带插图显示低浓度曲线的详细信息。B) 显示出 LOD 和 LLOQ 的叠加提取离子色谱图

对蛋白质进行绝对定量分析

生物药物生产过程中需要监测和控制宿主细胞蛋白质杂质浓度。在此过程中，测量目标 HCP 的绝对浓度十分重要。只要有合适的参比标样，基于质谱的分析对该应用具有极高的特异性和准确性。由于 SIL 标准肽的可用性和成本，与目标蛋白质序列相匹配的 SIL 标准肽被广泛应用于绝对定量分析。

我们对先前 HCP 发现工作中鉴定出的内源性 HCP（即 CHO 蛋白质 S100-A11）进行了绝对定量分析^[2]。采用两种方法计算绝对蛋白质浓度。在第一种方法中，使用了内源性肽 DPGVLDR 的平均响应和图 4A 中的标准曲线方程确定肽的绝对浓度。在第二种方法中，使用相同 LC/MS 运行中的轻型肽和重型肽之间的响应比来确定内源性肽浓度（图 5）。与预期结果

相同，这两种方法产生了类似的 CHO 蛋白质 S100-A11 的蛋白质浓度（1.05 与 1.47 ppm）。这些结果进一步证明了：

- 安捷伦 HCP 发现 workflow 能够鉴定个位数 ppm 级的 HCP^[2]
- 6495C 三重四极杆 LC/MS 系统是一种可靠的低浓度肽定量分析方法

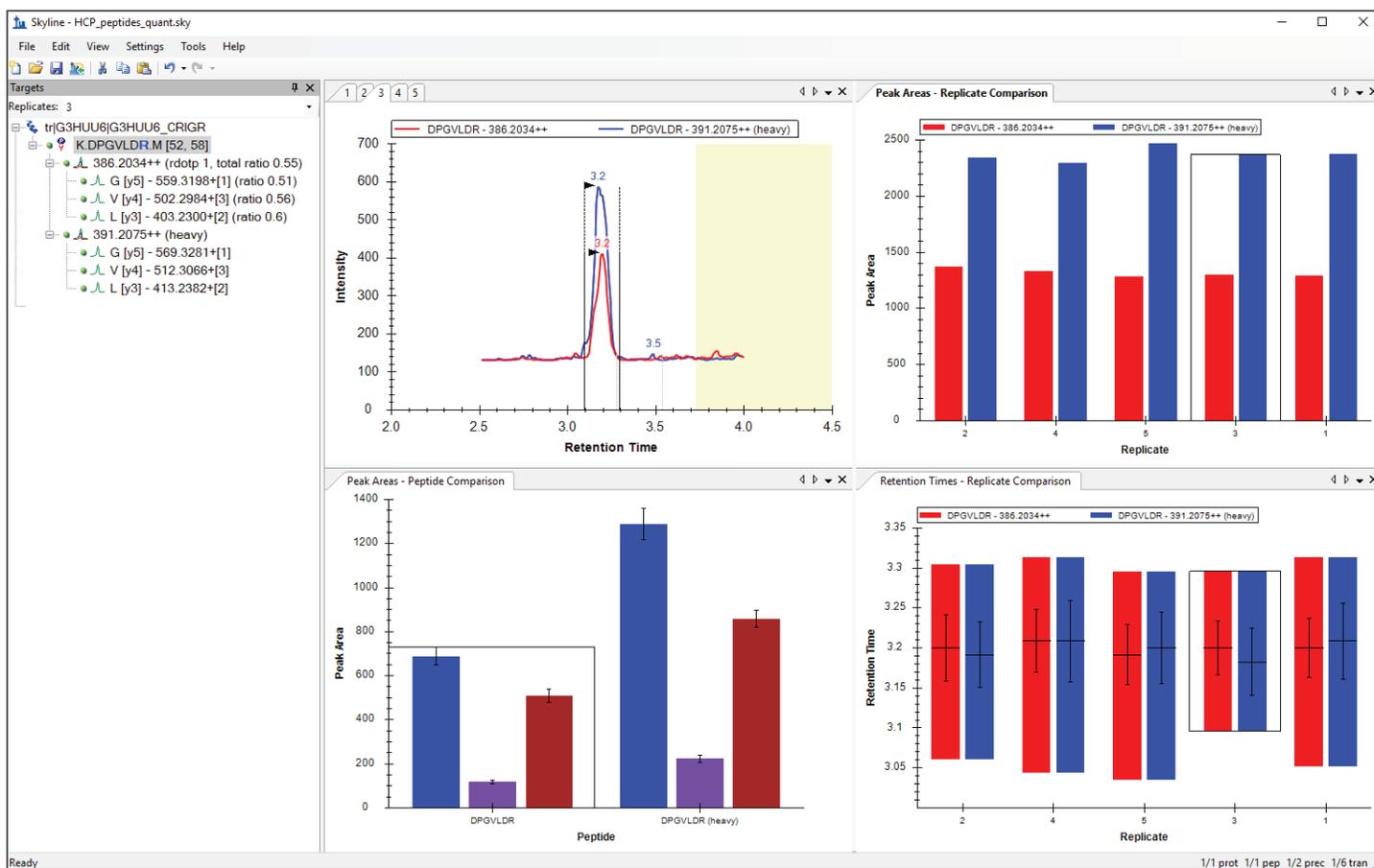


图 5. 加标 250 amol/μg SIL 肽 DPGVLDR 的 mAb 基质中 CHO 蛋白质 S100-A11 轻型肽和重型肽的峰面积比较

结论

本文展示了用于 HCP 定量分析的安捷伦工作流程解决方案的性能。采用以任务为中心的自动化方案的 AssayMAP Bravo 平台为样品前处理自动化带来了前所未有的重现性、可扩展性、灵活性和简便易用性。Agilent 1290 Infinity II 液相色谱仪是新一代 UHPLC 系统，具有更出色的色谱分离度和保留时间精度。Skyline 软件和 Agilent MassHunter 软件无缝集成，结合使用自动化工具为优化 LC-dMRM 方法提供了简单的解决方案。使用 Agilent 6495C 三重四极杆 LC/MS 系统证明了亚 ppm 级浓度 HCP 的准确定量分析。Skyline 和 MassHunter 软件的结合已证明是靶向数据分析的强大工具。

参考文献

1. ICH Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products
2. 使用 Agilent AssayMAP Bravo 和 6545XT AdvanceBio LC/Q-TOF 分析宿主细胞蛋白质，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5991-9300ZHCN，**2018**
3. Agilent Triple Quadrupole LC/MS Peptide Quantitation with Skyline (利用 Skyline 进行安捷伦三重四极杆 LC/MS 肽定量分析)，*安捷伦科技公司应用简报*，出版号 5990-9887EN，**2017**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019年9月24日，中国出版
5994-1369ZHCN

