

多糖基化位点抗体药物物质控中基于单四级杆的多属性分析方法开发与验证

王福贵^{1,2}, 刘涛^{1,2,3,5}, 李锦豪^{2,3}, 徐梦娇^{1,2}, 付蓉蓉^{1,2}, 赵香^{1,2}, 聂爱英⁷,
宋兰坤⁸, 陈熙⁸, 冀芦沙^{1,2,3}, 钱卫珠^{1,2,3}, 侯盛^{1,2,3}, 李军^{1,2,3}, 徐忠升⁶,
范文强⁶, 张大鹏^{1,2,3,4}, 徐进^{1,2,3}, 郭清城^{1,2,3,6}

(1. 聊城大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 山东 聊城 252059; 2. 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203; 3. 温州医科大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 浙江 温州 325035;
4. 张江生物技术有限公司 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 上海 201203; 5. 复旦大学 华山医院 肿瘤科, 上海 200040; 6. 泰州迈博太科药业有限公司, 江苏 泰州 225316; 7. 沃特世科技(上海)有限公司, 上海 200126; 8. 安捷伦科技(中国)有限公司, 上海 200131)

摘要 抗体药物已经成为生物制品的重要组成部分, 此类产品具有复杂的质量属性, 尤其是具有多糖基化位点的抗体药物, 其质量控制面临更高挑战。虽然基于高分辨质谱的多属性分析方法(Multi-attribute method, MAM)已在抗体药物的质控中获得应用, 但针对多糖基化位点抗体药物的快速且简便的检测技术仍较为少见。开发一种基于单四级杆的多属性分析方法, 对于提升这类药物的质控效率具有重要意义。本研究以双糖基化位点的治疗类单抗CMAB009为模型。通过基于高分辨质谱的MAM对其进行了深入的预表征分析, 成功获取了其质量属性。随后将预表征信息用于基于单四级杆的MAM开发。该方法在单次分析中有效监测了多种产品质量属性, 其准确性通过基于高分辨质谱的方法进行了确认。随后我们对该方法进行了严格的方法学验证。验证结果显示, 该方法具有良好的专属性、线性、准确度以及精密度等。基于单四级杆的MAM不仅有效地解决了多糖基化位点单抗药物的多属性检测难题, 还展示了一定的方法普适性, 为不同糖基化位点抗体药物的质量控制提供了一种新的、简便的技术方案。本研究结果预计将推动相关技术平台的改进和理念的更新, 从而增强产品开发和质控的整体能力。

关键词 抗体药物; 多属性分析方法; 质量控制; CMAB009; 单四级杆

中图分类号 R917

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Development and Validation of a Quadrupole Dalton-Based Multi-Attribute Method for the Quality Control of an Antibody Drug with Multiple Glycosylation Sites

收稿日期: 2024-04-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFC2501700); 国家自然科学基金项目(22304067); 山东省自然科学基金项目(ZR2021LSW001, ZR2021MC017, ZR2021MB097, ZR2020KH019, ZR20230B257, ZR2023QB196)资助

通信作者: 郭清城, 男, 汉族, 博士, 研究方向: 抗体药物与靶向治疗, E-mail: gqc, smmu@163.com; 徐进, 男, 汉族, 博士, 高级工程师, 研究方向: 大分子药物质量控制, E-mail: jin. xu@mabpharm.net; 张大鹏, 男, 汉族, 博士, 副研究员, 研究方向: 抗体药物与靶向治疗, E-mail: bigbirdzcn@163.com。

WANG Fugui^{1,2}, LIU Tao^{1,2,3,5}, LI Jinhao^{2,3}, XU Mengjiao^{1,2}, FU Rongrong^{1,2},
ZHAO Xiang^{1,2}, NIE Aiyang⁷, SONG Lankun⁸, CHEN Xi⁸, JI Lusha^{1,2,3},
QIAN Weizhu^{1,2,3}, HOU Sheng^{1,2,3}, LI Jun^{1,2,3}, XU Zhongsheng⁶,
FAN Wenqiang⁶, ZHANG Dapeng^{1,2,3,4}, XU Jin^{1,2,3}, GUO Qingcheng^{1,2,3,6}

(1. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-scale Manufacturing, School of Pharmaceutical Sciences, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-scale Manufacturing, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-scale Manufacturing, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 5. Department of Oncology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 6. Taizhou Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 7. Waters Corporation, Shanghai 200126, China; 8. Agilent Technologies (China) Co., Ltd., Shanghai 200131, China)

Abstract Antibody drugs are pivotal in biopharmaceuticals, featuring complex quality attributes that complicate quality control, especially those with multiple glycosylation sites. Although high-resolution mass spectrometry-based multi-attribute methods (MAM) are established for quality control, rapid and straightforward testing methods for such antibodies are limited. This study introduces a Quadrupole Dalton-based MAM, enhancing quality control efficiency significantly. We used the therapeutic monoclonal antibody CMAB009, with dual glycosylation sites, as a model. Extensive pre-characterization with high-resolution MAM captured its primary quality attributes effectively. This data informed the development of a Quadrupole Dalton-based MAM that successfully monitored multiple quality attributes in a single analysis. Its accuracy, verified against high-resolution mass spectrometry, and thorough methodological validation, confirmed its high specificity, linearity, accuracy, and precision. This Quadrupole Dalton-based MAM not only addresses the challenges in multi-attribute testing of monoclonal antibodies with multiple glycosylation sites but also offers a new, simplified approach to quality control for various antibody drugs. This research is poised to enhance technology platforms and inspire conceptual innovations, thus boosting overall product development and quality control capabilities.

Key words antibody drug; multi-attribute method; quality control; CMAB009; quadrupole dalton

0 引言

治疗性抗体药物由于其高度复杂的分子结构,生产、储存等过程中易受多种理化或生化因素的影响,常在特定的位点发生如糖化(Glycation)、糖基化(Glycosylation)、氧化(Oxidation)、脱酰胺(Deamidation)及末端修饰(Terminal modification)等翻译后修饰(Posttranslational modification, PTMs),形成多种变异体。这些变异体作为产品质量属性(Product quality attribute, PQA)的重要组成部分,微小的变异可能显著影响产品的理化性质、生物活性和稳定性,甚至引发免疫原性问题。所以识别和量化抗体的某些质量属性具有客观的必要性,从而有效保障药物的安全性和有效性。

多糖基化位点的抗体药物通常展现出更高的修饰复杂性,这种复杂性往往还会由于不同的表达系统进一步增加,这使得多糖基化抗体药物的质量控制面临更大挑战。尽管传统的分析方法,如毛细管电泳法(CE)、离子交换色谱法(IEX)、亲水相互作用色谱法(HILIC)、反相高效液相色谱法(RP)、体积排阻色谱法(SEC)和疏水相互作用色谱法(HIC)在产品质量控制中广泛使用,但他们通常只针对特定的质量属性,并且在检测多糖基化位点时存在局限性。特别是在检测复杂蛋白的单一质量属性时,常产生包含多个成分的复

杂峰,这可能会掩盖单个关键质量属性(CQA)的真实特征。鉴于这些挑战,开发能够提供更广泛检测维度、更高灵敏度和特异性的新技术变得尤为重要。采用“快、准、全”(Broad-spectrum、Rapid and Accurate)的质控理念及平台技术,能够更准确地识别和量化多种质量属性,从而提高整体的质量控制效率,加强药品安全性的保障。

近年来,随着新技术的进步,特别是质谱技术在分辨率和稳定性的显著提升,基于高分辨率质谱仪的多属性分析方法(Multi-attribute method, MAM)已经开始直接或间接用于单抗产品多种质量属性的控制。这种方法能够从单个分析中获取多个质量属性的数据,显著减少了产品质量控制所需的分析次数,一定程度上有利于分析成本降低,并提升分析效率。MAM数据还可提供与传统方法相同或更深的产品质量理解。基于高分辨质谱的MAM方法可在完整及肽图水平对抗体药物进行质控。基于完整蛋白多属性方法(I-MAM)可通过去卷积结果和色谱保留时间进行鉴定分析,并通过响应强度实现属性量化分析。而且,在多种质量属性上和传统检测方法具有一致性,如位点特异性糖基化的量化结果与传统HILIC法基本一致。而经典的基于肽图的MAM分析方法,能够提供最丰富的产品质量信息,尽管这种“自下而上”的分析策略牺牲了一些整体蛋白信息并增加了操作的复杂性,通过建立自动化的样品处理平台及优化样品处理方法,可有效解决这些问题,并能同时监测抗体药物的氧化、脱酰胺、异构化和糖基化修饰等,为基于肽图的MAM的应用提供了更广阔的可能性。但性能优越的高分辨率质谱,往往设备维护成本更高和数据分析更复杂,限制了其在当前制药行业质量控制(QC)实验室中的普及。与此相比,单四级杆检测器/质谱仪以其低成本、小占地面积及操作的简易性,在大分子药物QC中已获得一定应用。这种设备,通过灵活的MS全扫描(Full scan)或选择离子扫描(SIR)模式进行目标肽段质荷比(m/z)追踪,与液相分析相比,增加了检测的维度,提升了检测的灵敏度和选择性^[33,34]。在Scan模式下的定量限(LOQ)接近1%,SIR模式可能更优,单四级杆MAM分析呈现出广泛的应用可行性。

针对多糖基化位点抗体药物的质量控制挑战,本研究以一种双糖基化位点的治疗类单抗CMAB009(西妥昔单抗改良新药候选药物)为模型,开发了一种基于单四级杆检测器的多属性分析方法,该方法能有效监测CMAB009的多种产品质量属性,并通过与高分辨MAM分析以及传统检测的结果对比,确认了该方法准确性。对于复杂的糖基化修饰,将单四级杆MAM的结果与高分辨MAM以及传统HILIC的结果相比,证明了新方法作为传统方法的补充或替代的可行性,为不同糖基化位点抗体药物的质量控制提供了一种新的、简便的技术方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品及工具酶:CMAB009、IgG4亚型抗PD-1抗体由本实验室提供,胰蛋白酶(上海张江生物技术有限公司)。

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH 13 nm C4, 1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 50 mm(Waters); ACQUITY UPLC Peptide BEH 13 nm C18, 1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm(Waters); ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide Column, 13 nm, 1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 150 mm(Waters); Sephadex G25 脱盐(Cytiva)。

试剂:甲酸(LC-MS级),购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;乙腈(LC-MS级),三氟乙酸(TFA LC-MS级)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;碳酸氢铵(AR级)、甲酸铵(AR级)、盐酸胍(AR级),购自国药集团化学试剂有限公司;二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺(MIA),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;组氨酸,购自上海协和氨基酸有限公司。

1.2 仪器设备

ACQUITY UPLC H-Class、单四级杆检测器(QDA检测器)及色谱采集软件 Empower 3、Xevo G2-S Q-TOF 质谱仪及数据处理软件 Biopharmalynx (Waters公司); 1290 Infinity II Bio UHPLC 超高效生物液相色谱系统/6545XT AdvanceBio Q-TOF LC/MS (Agilent); 1290 Infinity I 生物液相色谱系统、Infinity

Lab LC/MSD iO 单四级杆质谱仪及 Agilent OpenLab Data Analysis 软件 (Agilent); XSR205DU 电子分析天平(梅特勒托利多)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂溶液和缓冲液制备。稀释缓冲液(50 mmol/L NH_4FA pH 6.0)、变性缓冲液(8 mol/L 盐酸胍, 0.2 mol/L 组氨酸 pH 6.0)、脱盐置换缓冲液:(50 mmol/L 碳酸氢铵 pH 8.0)、1 mol/L 二硫苏糖醇(DTT)母液、2.9 mol/L 碘乙酸钠(MIA)母液。

1.3.2 肽图样品制备。500 μg CMAB009(≥ 5 mg/mL)30 ku 超滤离心管置换至稀释缓冲液,补加缓冲液至 100 μL ,稀释后样品加入 375 μL 变性缓冲液,加入 7.2 μL 1 mol/L DTT,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 60 min。室温冷却后,加入 8.5 μL 2.9 mol/L MIA,避光室温孵育 45 min。加入 17.8 μL 1 mol/L DTT 终止反应。Sephadex G25 脱盐至 50 mmol/L 碳酸氢铵缓冲液 pH 8.0。1:10(m:m)的比例添加胰蛋白酶,在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 4 h。2 μL FA 终止反应。17 000 g 离心 10 min 后上机分析。

1.3.3 单四级杆 MAM 方法和参数设置。UPLC-单四级杆检测器方法及参数设置:色谱柱为 UPLC BEH 13 nm C18,1.7 μm 2.1 mm $\times$ 100 mm Column(Waters),流动相为 A:0.1% FA 水溶液和 B:0.1% FA 乙腈溶液;液相梯度程序为 80 min 内流动相 B 由 1% 升至 37%。流速为 0.2 mL/min,柱温 45 $^\circ\text{C}$ 。QDA 检测器参数设置为:毛细管电压,0.8 kV;锥体电压,20 V;源温度,600 $^\circ\text{C}$;脱溶剂气体流量,800 L/h;扫描范围,300~1 250 u;应用 Full scan 和 SIR 模式获取数据。使用 Empower 3 软件控制 LC-UV-QDA 系统及数据分析。

单四级杆检测仪方法及参数设置:

FA 方法:1290 Infinity II LC-Infinity Lab LC/MSD iO 单四级杆检测仪方法及参数设置:色谱柱为 UPLC BEH 13 nm C18 1.7 μm 2.1 mm $\times$ 150 mm Column(Waters),流动相为 A:0.1% FA 水溶液和 B:0.1% FA 乙腈溶液;液相梯度程序为 90 min 内流动相 B 由 2% 升至 40%。流速为 0.2 mL/min,柱温 60 $^\circ\text{C}$ 。MSD iQ 检测器参数设置为:毛细管电压,3.5 kV;干燥器温度,325 $^\circ\text{C}$;雾化气压力,40 psi;干燥器气流量,10 L/min;扫描范围,50~1450 u;应用 Scan 和 SIM 模式获取数据。使用 Agilent OpenLab Data Analysis 软件控制 LC-UV-MSD iQ 系统及数据分析。

TFA 方法:1290 Infinity II LC-Infinity Lab LC/MSD iQ 单四级杆检测仪方法及参数设置:色谱柱为 UPLC BEH 13 nm C18 1.7 μm 2.1 mm $\times$ 150 mm Column(Waters),流动相为 A:0.1% TFA 水溶液和 B:0.1% TFA 乙腈溶液;液相梯度程序为 90 min 内流动相 B 由 2% 升至 40%。流速为 0.2 mL/min,柱温 60 $^\circ\text{C}$ 。MSD iQ 检测器参数设置为:毛细管电压,3.5 kV;干燥器温度,325 $^\circ\text{C}$;雾化气压力,40 psi;干燥器气流量,10 L/min;扫描范围,50~1 450 u;应用 Scan 和 SIM 模式获取数据。使用 Agilent OpenLab Data Analysis 软件控制 LC-UV-MSD iQ 系统及数据分析。

1.3.4 高分辨率质谱法获得靶肽数据。通过使用 UPLC Xevo G2-S Q-TOF(Waters)和 1290 Infinity II/6545XT AdvanceBio Q-TOF(Agilent)LC-MS/MS 系统,获取 CMAB009 单抗中有关糖基化、糖化、氧化、脱氨基化、末端修饰等修饰肽以及特征肽(CDR 肽)数据。流动相:A1(99.9% 水+0.1% FA)、B1(99.9% ACN+0.1% FA)。分析柱:UPLC BEH 13 nm C18 1.7 μm 2.1 mm $\times$ 100 mm 柱(Waters),线性梯度 80 min 内流动相 B 由 1% 升至 37%。流速 0.2 mL/min,上样量为 5 μL 。正离子模式数据采集,采集范围 150~2 000 u。数据分析采用相应质谱分析软件。

1.3.5 靶标肽段选择。治疗性单克隆抗体的互补决定区(CDR)序列的片段常用用于治疗性单克隆抗体的鉴别,肽序列长度一般 6~20 个氨基酸;所选靶标肽序列尽量不包含连续或交替的精氨酸、赖氨酸,以及脯氨酸-精氨酸、脯氨酸-赖氨酸,避免酶切不完全;靶标肽 LC-MS/MS 需易于离子化和碎裂,并且质谱响应高。甲硫氨酸、天冬酰胺、色氨酸和谷氨酰胺等易被修饰的氨基酸常作为治疗性单克隆抗体常见修饰的一部分,根据修饰位点所处肽段进行选择,糖基化肽段根据糖基化修饰保守序列进行选择。

1.3.6 数据分析。N-糖基化修饰和其他翻译后修饰水平均可通过对目标肽段的一级质谱响应强度/峰面积进行计算,二级质谱信息可实现对肽段和修饰位点的确认。由于单四级杆 MAM 与传统方法、高分辨 MAM 数据的差异性,需要对所得数据进行计算处理。糖基化比例(%)=目标糖型的峰面积/监测到的各种糖型的峰面积之和 $\times 100$;翻译后修饰水平(%)=修饰肽的相应强度/(修饰肽峰面积+非修饰肽峰面积) $\times 100$ 。

1.4 方法学验证

1.4.1 系统适用性与专属性。以 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液加适量的胰蛋白酶处理作为空白对照,空白对照应无干扰;重复进针 6 次系统适用性对照品溶液,考察每针对照品溶液中氧化、脱酰胺、末端修饰、Fc 糖基化的岩藻二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸糖型水平,并计算 RSD% 值($n=6$)。

1.4.2 精密度。重复性:平行制备 6 份样品溶液,考察 6 份平行样品溶液中氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸糖型水平,并计算 RSD% 值($n=6$);中间精密度:不同天平行制备 6 份样品溶液,考察与重复性样品总共 12 份样品溶液中氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸水平,并计算 RSD% 值($n=12$)。

1.4.3 准确度。计算单四级杆 MAM 检测的氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸结果与 Q-TOF MAM 结果进行对比。基于单四级杆的 MAM 中糖基化水平与传统游离寡糖水平的 HILIC 结果对比。

1.4.4 线性和范围。将脱盐后样品浓缩至 400 $\mu\text{g/mL}$,酶切后样品稀释为 300、200、100、75、50、40、20、10 $\mu\text{g/mL}$,通过与非修饰肽具有显著分离且响应最低的 L:T11 脱酰胺肽峰面积与样品浓度进行线性回归。结合线性、准确度和精密度进行范围确定,在确定的范围内,L:T11 脱酰胺肽段应具有良好的线性、准确度和精密度。

1.4.5 检测限和定量限。根据 L:T11 脱酰胺肽的提取离子谱图信噪比确定检测限和定量限,检测限可接受的信噪比为 3:1,定量限可接受的信噪比为 10:1。

1.4.6 耐用性。将样品置于 8 $^{\circ}\text{C}$ 自动进样器中 4、24 h 和改变柱温(40、45、50 $^{\circ}\text{C}$),其他条件不变的情况下,各进三针考察氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸水平,并计算 RSD% 值($n=9$)。

2 结果与分析

2.1 方法开发

2.1.1 确认关键质量属性并筛选最佳质荷比。由于单四级杆检测器(QDA)是由色谱数据软件 Empower 3 控制的单四级杆质谱检测器,较低的采集范围(50~1 250 u),且 Empower 3 软件缺乏去卷积功能,通过高分辨质谱对目标肽保留时间(RT)和质荷比(m/z)的直接确定。研究中使用 Q-TOF 高分辨质谱仪对胰蛋白酶消化后的 CMAB009 进行预表征,确定并获取 CDR 肽、末端修饰肽、氧化肽、脱酰胺肽及糖基化肽等肽段序列、分子量、保留时间及修饰水平等信息,如表 1、2、3、4 所示。由于 Q-TOF 与单四级杆扫描质量范围不同,Q-TOF 上获取的高响应 m/z 值并不一定在 QDA 扫描范围内,需要进行 m/z 的筛选。通过分子量计算公式计算出目标肽段的多电荷离子的 m/z 值,在 QDA Full scan 模式下获得总离子流图,并通过提取目标肽段多个电荷 m/z 值筛选出单四级杆范围内的高响应的 m/z 。

基于单四级杆质谱的多属性分析方法,同样根据高分辨质谱所得预表征信息进行方法开发。

2.1.2 关键质量属性的监测。单四级杆检测器检测:如图 1 所示,对于 CDR 肽、氧化肽、脱酰胺肽、末端修饰肽在单四级杆的 Scan 模式采集并通过创建衍生通道的方法提取筛选出的高响应目标肽 m/z 。6 个 CDR 肽均可以被识别,其中 H:T9 和 H:T2 肽段极性相近而无法基线分离。对修饰肽的监测可在衍生通道中输入采集切换时间,在特定时间切换用来提取不同的 m/z ,从而避免了因分子量差异小而导致色谱峰的重叠。

由表 5、6 可知,基于高分辨质谱 MAM 与基于单四级杆 MAM 对于糖基化、脱氨基、氧化、C-末端赖氨酸截除、N-末端焦谷氨酸环化检测结果具有一定的可比性,其中单四级杆 MAM 方法主要通过提取质量范围内目标肽段最高响应 m/z 的离子,即以高响应 m/z 值代表整体修饰水平进行计算。与基于高分辨质谱 MAM 结果相比,基于单四级杆 MAM 检测的 H:T18 氧化修饰水平偏高且具有较高的 CV 值(21.13%),样品处理过程中氧化位点可能会引入额外的修饰,从而导致氧化水平升高和较高的可变性。与基于高分辨质谱 MAM 结果相比,L:T11 脱酰胺存在较高的 CV 值(15.80%),L:T11 脱酰胺肽具有较低的响应和峰面积,仪器中噪声干扰对积分定量影响稍大。

表 1 CDR 肽段信息
Table 1 The CDR peptides of CMAB009

Peptide tag	L:T3	L:T6	L:T7	H:T2	H:T4	H:T9
Sequence of peptide	ASQSIGTN IHWYQQR	YASESI SGIPSR	FSGSGSGTFTLSINS	QSGPGLVQP	GLEWLGVWS	ALTYDYDEFA
			VESEDIADYYCQQ	SQSLSTCTVS	GGNTDYNT	YWGQGTLV
			NNNWPTTF GAGTK	GSLTNYGV HWVR	PFTSR	TVSAASTK
Retention time/min	35.45	29.68	61.58	62.97	68.69	63.38
Observed mass/u	1 788.88	1 266.64	4 566.08	3 563.76	2 370.23	2 905.40
m/z	597.29	634.32	1 142.71	891.94	857.75	969.48
Charge	3	2	4	4	3	3

表 2 翻译后修饰肽段信息
Table 2 Post-translational modifications

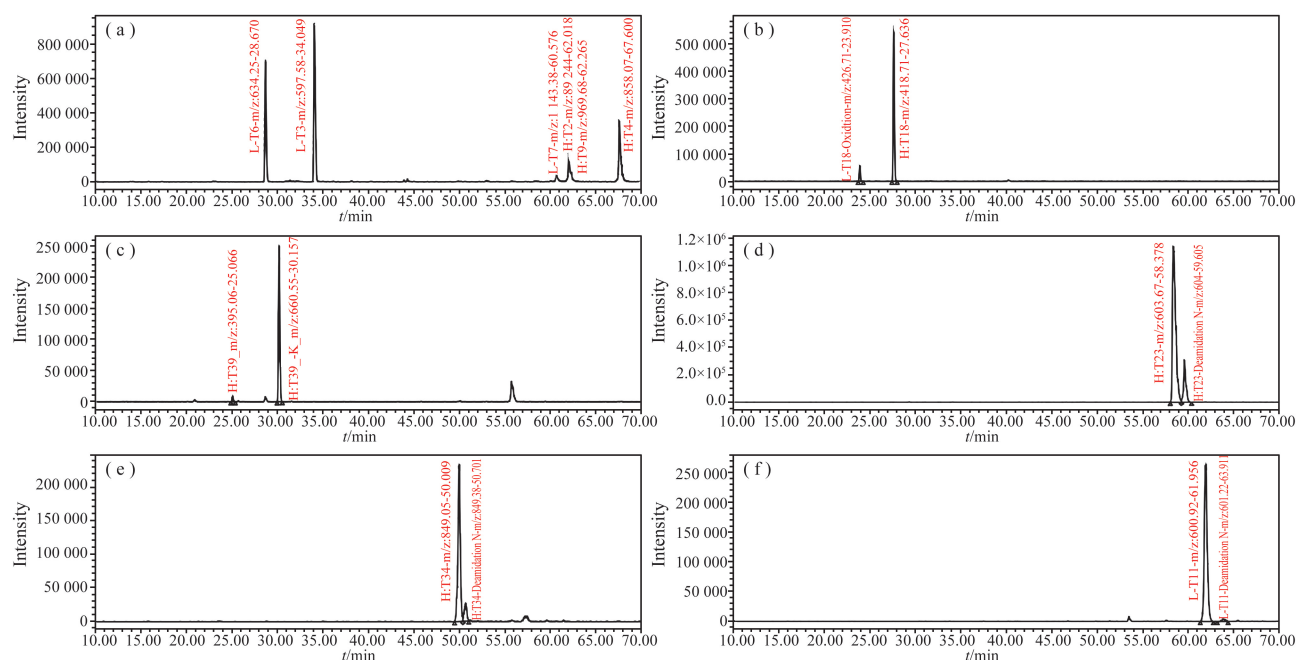
Name	Oxidation		N-Pyr Q		C-Lys				Deamidation			
Peptide tag	H:T18	H:T18_O	H:T1	H:T1_Q	H:T39	H:T39_K	L:T11	L:T11 D	H:T23	H:T23 D	H:T34	H:T34 D
Sequence of peptide	ASQSIGTNI HWYQQR		YASESISGIPSR		FSGSGSGTFTLS	INSVESEDIADYY CQQNNNWPTT FGAGTK	QSGPGLVQPSQS	LSITCTVSGSLTN YGVHWVR	GLEWLGVI	WSGGNTDY NTPFTSR	ALTYDYDEFA	YWGQGTLV VSAASTK
Retention time/min	28.22	24.41	15.13	24.89	25.13	30.05	63.00	63.70	58.30	59.60	50.89	51.58
m/z	418.50	426.50	616.40	599.40	790.48	660.67	900.40	900.90	603.70	604.00	849.05	849.40

表 3 Fc 糖肽信息
Table 3 Fc glycopeptide information

Fc glycosylation	G0+H	G0F+H	G0F-GlcNAc+H	G1F+H	G2F+H	G0-GlcNAc+H	G1+H	Man5
Sequence of peptide	EEQYNSTYR							
Observed mass/u	2 487.99	2 634.05	2 430.97	2 796.10	2 958.15	2 284.91	2 650.04	2 405.94
m/z(3+)	830.33	879.02	811.32	933.03	987.05	762.64	884.35	802.98

表 4 Fab 糖肽信息
Table 4 Fab glycolpeptide information

Fab glycosylation	G2F+H	G2F+2SA+H	G2F+SA+H	Man5+H	G1F+H	G0F
Sequence of peptide	MNSLQSNDAIYYCAR					
Observed mass/u	3 676.48	4 258.66	3 967.56	3 124.25	3 514.41	3 352.35
m/z(4+)	920.12	1 065.66	992.89	782.06	879.60	839.09



注:(a)CDR 肽图谱;(b)H:T18 氧化肽段的提取离子谱图;(c)C-末端赖氨酸截图肽的提取离子谱图;(d、e、f)提取的 H:T23、H:T34、L:T11 三个脱氨基肽段的提取离子谱图。

Notes: (a) Extracted ion chromatogram of the CDR peptides; (b) Extracted ion chromatogram of the oxidized H:T18 peptide; (c) Extracted ion chromatogram of the C-terminal lysine clipping peptide; (d, e, f) Extracted ion chromatogram of the H:T23, H:T34, L:T11 deamidated peptides.

图 1 基于单四级杆的 MAM 用于 CMAB009 关键肽段监测

Fig. 1 A quadrupole dalton-based MAM for monitoring the critical peptides of CMAB009

表 5 不同 MAM 方法对于 CMAB009 单抗 PTMs 检测结果

Table 5 The results of different MAM methods for CMAB009 PTMs

Modification	Q-TOF MAM		QDA MAM	
	Mean(%)	CV(%)	Mean(%)	CV(%)
H:T1_Pyr Q	97.10	1.45	99.52	0.32
H:T39_K	94.52	0.59	98.58	1.76
H:T18_OxidationM	3.78	6.12	6.52	21.13
HC:T23_Deamidation N[14]	5.63	8.67	10.52	5.85
HC:T34_Deamidation N	5.82	12.56	5.08	8.52
LC:T11_Deamidation N	2.37	7.87	2.22	15.80

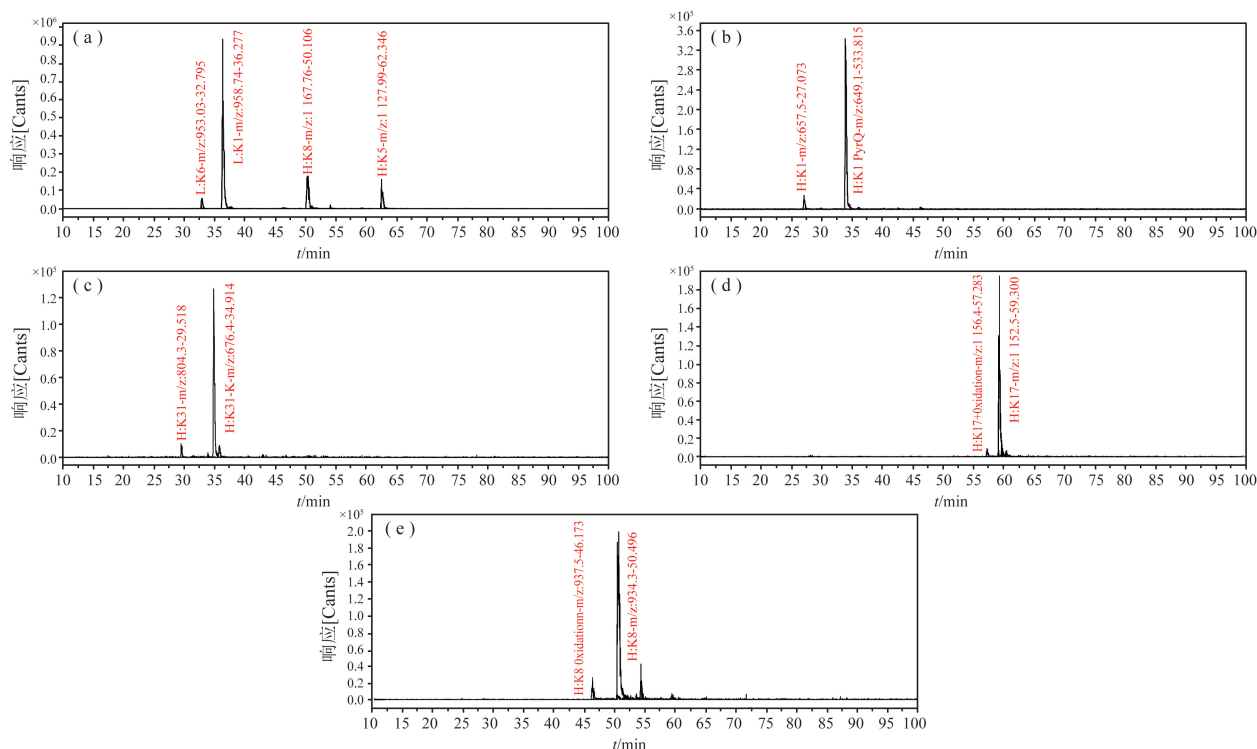
表 6 CMAB009 单抗糖基化修饰检测结果对比

Table 6 Comparison of glycosylation modification results

Modification	MAM (Q-TOF)		MAM (Quadrupole Dalton)		HILIC	
	Mean(%)	CV(%)	Mean(%)	CV(%)	Mean(%)	CV(%)
Sum_Fuc_All	90.50	0.74	84.50	1.90	90.18	0.67
Sum_Ant Fuc_All	9.20	6.12	16.44	4.03	9.16	6.81
Sum_High_Man_All	2.26	12.21	1.14	16.06	2.16	11.59
Sum_Sialic Acid_All	58.08	2.56	55.94	18.64	57.86	1.85

单四级杆质谱仪检测:我们还按照单四级杆检测器的检测方式,采用单四级杆质谱仪进行了检测,不同

品牌仪器进行关键质量属性监测,结果呈现类似性(数据未提供)。为了确认该方法的通用性,除了不同品牌仪器,我们还在一种 IgG4 亚型抗 PD-1 抗体中进行了关键质量属性监测。如图 2 所示,该方法可以对不同的关键肽段进行监测及定量。说明对于不同的抗体或不同的仪器品牌,该方法均具有较好的通用性。



注:(a) CDR 肽图谱;(b) N 末端焦谷氨酸环化的提取离子色谱图(c) C-末端赖氨酸截除肽的提取离子谱图;(d、e) 两个氧化肽段的提取离子谱图。

Notes: (a) Extracted ion chromatogram of the CDR peptides; (b) Extracted ion chromatograms of N-terminal pyroglutamic acid cyclization; (c) Extracted ion chromatograms of the C-terminal lysine clipping peptide; (d, e) Extracted ion chromatograms of two oxidized peptides.

图 2 FA 对单四级杆质谱仪检测抗 PD-1 抗体的关键质量属性的影响

Fig. 2 Effect of FA on critical quality attributes of Anti-PD-1 antibody detected by a single quadrupole mass spectrometer

三氟乙酸(TFA)是液相色谱中重要的离子对试剂,尤其适用于肽和小蛋白质的分析。然而,在 LC-MS 检测系统中,TFA 可通过抑制电喷雾离子源(ESI)中分析物的离子化,从而降低检测灵敏度。为了检验 TFA 是否也适用于该方法,我们将 FA 采用 TFA 替换,测试了 TFA 使用的影响。如图 3 结果显示 TFA 替换后,各关键修饰肽段均能得到较好检测,仅在信号强度上有所减弱,这也和已有的报道一致^[17]。由图 2d 可见,TFA 条件下部分氧化肽段的检测会出现偏高,所以各修饰的一致性还需个例讨论。

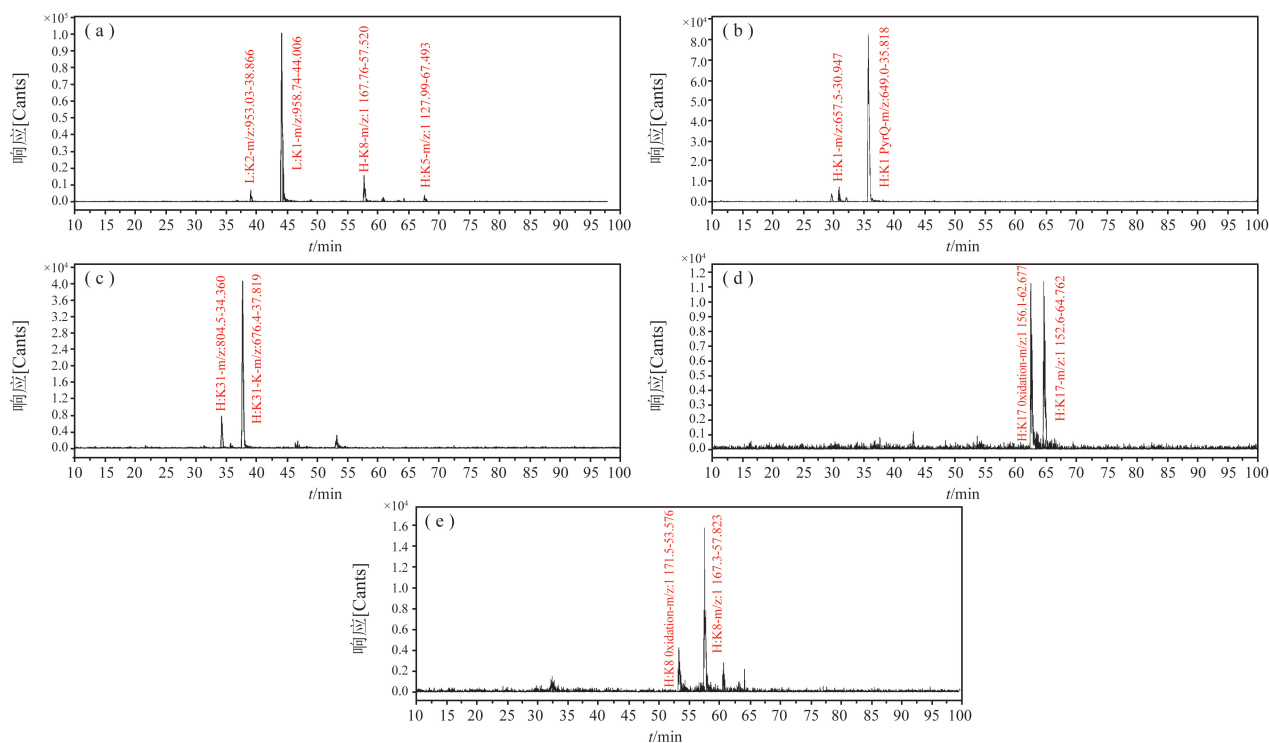
2.2 方法学验证

以多糖基化位点抗体药物 CMAB009 为模型单抗,以单四级杆检测器为代表进行方法学验证,验证结果呈现如下。

2.2.1 系统适用性和专属性。系统适用性结果如表 7 所示,检测到重复进样 6 针系统适用性对照品溶液中低响应的 L:T11 氧化肽段和 Fc 糖肽 Man5 的 RSD 分别为 14.85% 和 12.51%,其他靶肽均具有较小的 RSD 值($RSD \leq 20\%$)。空白对照对于 CMAB009 多属性监测没有干扰。结果表明,系统适用性和专属性良好。

2.2.2 精密度。重复性结果如表 8 所示,平行 6 份样品溶液中氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸水平平均具有较好的 RSD% ($RSD \leq 20\%$)。中间精密度结果如表 9 所示,同一人员不同天平行制备的 6 份样品溶液,考察与重复性样品总共 12

份样品溶液中氧化、脱酰胺、末端修饰Fc糖基化的岩藻二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及Fab糖基化中总唾液酸水平,并且均具有良好的 $RSD_{n=12}\%$ 值($RSD \leq 20\%$),低水平的PTMs可能显示出较高的RSD值。



注:(a) CDR 肽图谱;(b) N 末端焦谷氨酸环化的提取离子色谱图(c) C-末端赖氨酸截除肽的提取离子谱图;(d,e) 两个氧化肽段的提取离子谱图。

Notes: (a) Extracted ion chromatogram of the CDR peptides; (b) Extracted ion chromatograms of N-terminal pyroglutamic acid cyclization; (c) Extracted ion chromatograms of the C-terminal lysine clipping peptide; (d, e) Extracted ion chromatograms of two oxidized peptides.

图3 TFA对单四级杆质谱仪检测抗PD-1抗体关键质量属性的影响

Fig. 3 Effect of TFA on the detection of critical quality attributes of Anti-PD-1 antibody by a single quadrupole mass spectrometer

表7 系统适用性结果

Table 7 System suitability results

Modification (%)	Needle No.						RSD
	1	2	3	4	5	6	$n=6$
H: T1_Pyr Q	99.00	99.30	99.88	99.55	99.69	99.71	0.32
H: T39_K	95.50	97.50	99.61	99.65	99.59	99.63	1.76
H: T18_Oxidation	6.36	6.56	6.84	7.33	7.15	7.46	6.29
HC: T23_Deamidation N	9.47	11.37	10.50	10.43	10.62	10.75	5.85
HC: T34_Deamidation N	4.90	4.90	4.50	5.79	5.13	5.25	8.52
LC: T11_Deamidation N	2.65	2.65	1.98	1.96	1.98	2.20	14.85
Sum_Fuc_All	90.25	90.37	90.42	91.75	91.40	91.02	0.68
Sum_Ant Fuc_All	9.75	9.63	9.58	8.25	8.60	8.98	6.78
Sum_High Man_All(Man5)	1.78	1.89	2.34	2.01	1.77	2.30	12.51
Fab_Sum_Sialic Acid_All	58.34	57.60	58.36	58.10	55.85	58.91	1.85

表 8 重复性测试结果
Table 8 Repeatability results

Modification (%)	Sample						RSD
	1	2	3	4	5	6	$n=6$
H:T1_Pyr Q	98.79	98.56	98.76	98.13	97.82	97.99	0.42
H:T39_K	95.45	97.39	96.99	98.37	95.67	95.40	1.27
H:T18_Oxidation	7.34	7.35	8.21	6.53	6.98	6.77	8.97
HC:T23_Deamidation N	11.06	10.87	9.94	10.11	9.65	10.55	5.34
HC:T34_Deamidation N	6.24	5.26	6.07	6.87	5.68	6.28	9.09
LC:T11_Deamidation N	2.07	2.15	2.21	1.83	2.45	2.36	10.09
Sum_Fuc_All	91.40	90.41	90.40	91.38	91.33	91.28	0.54
Sum_Ant Fuc_All	8.60	9.59	9.60	8.62	8.67	8.72	5.45
Sum_High Man_All(Man5)	2.17	2.18	2.17	2.23	2.16	1.56	12.28
Fab_Sum_Sialic Acid_All	58.34	57.46	58.36	58.01	55.85	57.60	1.62

表 9 中间精密度测试结果
Table 9 Intermediate precision results

Modification (%)	Sample						RSD	RSD
	1	2	3	4	5	6	$n=6$	$n=12$
H:T1_Pyr Q	97.88	97.44	97.40	99.07	98.59	98.54	0.70	0.56
H:T39_K	97.96	98.18	94.74	96.67	94.41	94.19	1.89	1.56
H:T18_Oxidation	7.33	7.65	7.45	6.75	8.46	8.27	8.25	8.62
HC:T23_Deamidation N	10.73	11.54	9.99	9.28	10.23	9.67	7.86	6.42
HC:T34_Deamidation N	8.98	5.40	5.41	7.78	5.36	5.91	13.53	11.43
LC:T11_Deamidation N	2.37	2.58	2.05	2.48	1.97	2.58	11.42	10.97
Sum_Fuc_All	91.20	92.41	90.89	92.99	92.08	92.96	0.96	0.96
Sum_Ant Fuc_All	8.80	7.59	9.11	7.01	7.92	7.04	11.17	10.38
Sum_High Man_All(Man5)	2.39	2.16	1.68	2.36	2.01	1.85	13.61	12.35
Fab_Sum_Sialic Acid_All	56.23	56.40	55.89	57.35	57.56	56.45	1.16	1.61

2.2.3 准确度。为了确保基于 QDA 的 MAM 与传统方法或高分辨 MAM 具有相当或更高的质量属性监控能力,这里将 QDA MAM 检测的氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸结果与 Q-TOF MAM 所得结果认作真实值进行对比。同时,糖型检测中与传统游离寡糖水平的 HILIC 结果对比。准确度结果如表 10 所示,基于 QDA 的 MAM 方法对于多种质量属性的检测结果与高分辨 MAM 及传统 HILIC 的检测结果基本一致。

2.2.4 线性和范围。通过与非修饰肽具有显著分离且响应最低的 L:T11 脱酰胺肽为线性评估的代表,以峰面积与样品浓度进行线性回归,线性拟合图谱如图 4 所示,以酶切样品浓度为横坐标,L:T11 脱酰胺肽段峰面积为纵坐标进行线性分析,线性回归方程为 $y=315.3x+237.56$;相关系数 $R^2=0.9921(\geq 0.990)$;结果表明,在 $50\sim 400\text{ }\mu\text{g/mL}$ 范围内,本方法线性良好。在较低的样品浓度下,L:T11 脱酰胺肽峰面积受噪声干扰大,影响定量准确性。

表 10 准确度测试结果

Table 10 Accuracy results

Modification (%)	MAM (Q-TOF)	MAM (Quadrupole	HILIC	Quadrupole	Quadrupole
	Mean	Dalton) Mean	Mean	Dalton /HILIC	Dalton /Q-TOF
H;T1_Pyr Q	97.10	97.57	N/A	N/A	1.00
H;T39_K	94.52	96.96	N/A	N/A	1.03
H;T18_Oxidation	5.03	7.48	N/A	N/A	1.49
HC;T23_Deamidation N	11.00	10.75	N/A	N/A	0.98
HC;T34_Deamidation N	6.50	6.20	N/A	N/A	0.95
LC;T11_Deamidation N	2.37	2.33	N/A	N/A	0.98
Sum_Fuc_All	90.80	91.50	90.84	1.01	1.01
Sum_Ant Fuc_All	9.20	8.50	9.16	0.93	0.92
Sum_High Man_All	2.26	2.08	2.16	0.96	0.92
Fab_Sum_Sialic Acid_All	58.08	56.17	57.86	0.97	0.97

N/A: not available.

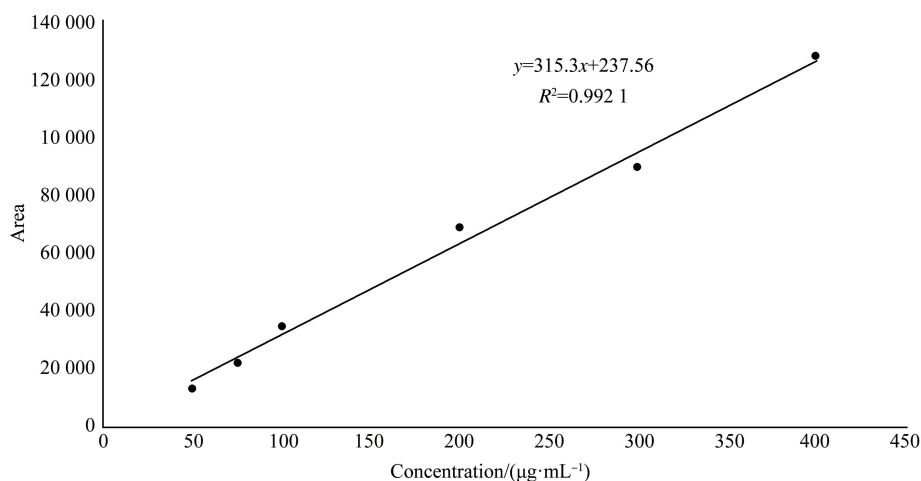


图 4 方法学验证线性图谱

Fig. 4 Methodological validation of linear maps

2.2.5 检测限和定量限。信号响应较低的 L:T11 脱酰胺肽作为代表性肽段,通过提取离子谱图信噪比确定检测限和定量限,检测限可接受的信噪比为 3:1,定量限可接受的信噪比为 10:1。结果表明,本方法检测限为 20 μg/mL;定量限为 100 μg/mL。

2.2.6 耐用性。将样品置于 8℃ 自动进样器中 4、24 h 的耐用性结果如表 11 所示,三种处理下的 12 份样品溶液氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸水平均具有较好的 RSD%(RSD ≤ 20%)。氧化肽段和脱酰胺肽段在储存过程中会有微量增加,从而存在较大的变异性。

改变柱温(40、45、50℃)的耐用性结果如表 12 所示,三种柱温条件下的 12 份样品溶液氧化、脱酰胺、末端修饰 Fc 糖基化的岩藻糖二天线寡糖、去核心岩藻糖、高甘露糖(Man5)及 Fab 糖基化中总唾液酸水平均具有较好的 RSD%(RSD ≤ 20%)。有研究表明,温度的升高会导致蛋白氧化和脱酰胺水平的升高,且脱酰胺更容易受到温度变化的影响。总而言之,本方法具有良好的耐用性。

表 11 耐用性_放置时间

Table 11 The stability statistics of analytes in different conditions (Storage temperature)

Modification(%)	0 h			4 h			24 h			RSD <i>n</i> = 12
H;T1_Pyr Q	97.88	97.44	97.40	97.86	98.28	97.17	97.39	97.78	99.22	0.64
H;T39_-K	97.96	98.18	94.74	93.50	95.28	95.74	95.36	94.25	97.07	1.70
H;T18_Oxidation	7.33	7.65	7.45	7.89	8.38	9.67	8.19	9.12	9.49	10.55
HC;T23_Deamidation N	10.73	11.54	9.99	11.42	9.99	10.56	10.05	12.36	10.35	7.69
HC;T34_Deamidation N	7.79	5.40	5.41	4.99	6.09	7.50	7.39	6.67	6.03	8.64
LC;T11_Deamidation N	2.37	2.58	2.05	2.41	1.85	2.10	2.63	2.07	1.99	12.41
Sum_Fuc_All	84.73	87.96	88.83	84.09	84.83	85.46	84.16	88.75	84.32	2.34
Sum_Ant Fuc_All	8.80	7.59	9.11	7.47	8.31	8.94	9.44	8.78	7.30	9.32
Sum_HighMan_All(Man5)	2.39	2.16	1.68	2.06	2.13	2.34	2.22	2.17	2.27	9.59
Sum_Sialic Acid_All	56.23	56.40	55.89	61.98	59.04	58.85	55.58	57.60	60.61	3.88

表 12 耐用性结果_柱温

Table 12 The stability statistics of analytes in different conditions (Column temperature)

Modification (%)	40 ℃			45 ℃			50 ℃			RSD <i>n</i> = 12
H;T1_Pyr Q	97.22	98.93	97.83	97.88	97.44	97.40	97.23	97.77	98.82	0.65
H;T39_-K	95.46	96.73	94.77	97.96	98.18	94.74	96.24	95.5	95.42	1.33
H;T18_Oxidation	8.96	7.17	9.52	7.33	7.65	7.45	8.56	9.03	8.77	10.56
HC;T23_Deamidation N	10.43	10.47	9.99	10.73	11.54	9.99	10.63	11.92	12.62	8.29
HC;T34_Deamidation N	5.19	5.65	5.73	6.98	6.35	5.98	6.90	7.13	7.20	11.67
LC;T11_Deamidation N	2.08	2.50	2.20	2.37	2.58	2.05	2.55	2.67	2.69	10.24
Sum_Fuc_All	86.10	86.91	83.37	84.73	87.96	88.83	88.52	85.18	84.46	2.25
Sum_Ant Fuc_All	8.18	8.18	9.13	8.80	7.59	9.11	7.97	9.36	8.62	7.05
Sum_High Man_All(Man5)	2.46	2.48	2.16	2.39	2.16	1.68	2.27	2.14	2.42	11.14
Sum_Sialic Acid_All	59.01	61.20	60.88	56.23	56.40	55.89	61.01	61.56	60.89	4.06

3 结论

本研究成功开发并验证了一种基于单四级杆质谱的多属性分析方法,用于多糖基化抗体药物的质量控制。通过对于多糖基化位点抗体样品处理方法的优化以及使用高分辨 Q-TOF 质谱对多糖基化位点模型单抗进行预表征,我们确定了模型抗体中的关键质量属性,包括 CDR 肽段以及氧化、脱酰胺、末端修饰和糖基化修饰。利用这些预表征数据,我们在单四级杆检测器/质谱仪上进行相应检测,通过对于单四级杆方法调整优化实现了对于 CDR 特征性肽和修饰肽的监测及定量,结果表明,本方法与使用高分辨率质谱的 MAM 结果具有可比性,并且在糖型检测上与传统 HILIC 法检测结果具有可比性,能够作为传统方法的替代或补充,同时我们还使用不同品牌单四级杆检测器/质谱仪,并对不同抗体进行了检测评估,结果说明该方法具有一定的普适性特征。最后,通过对本方法进行详细的方法学验证,结果表明,本方法具有良好的系统适用性、专属性、准确度、精密度、线性及耐用性。不仅确定了此方法的检测范围和 LOD、LOQ,而且还展示了其在包括多糖基化位点抗体药物在内的抗体药物质量控制中的广泛应用潜力,能显著简化质控流程并提高操作

效率。这些研究成果为单四级杆质谱在包括多糖基化位点抗体在内的抗体药物质量控制中的应用提供了新的视角,并预计将推动相关技术平台的进一步改进与创新,从而加强产品开发和质量控制的整体能力。

参 考 文 献

- [1] 吴霖萍,汪泓,陈钢,等. 治疗性单克隆抗体常见翻译后修饰变异体的分析策略进展[J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(11): 1545-1558.
- [2] LIU T, XU J, GUO Q C, et al. Identification, efficacy, and stability evaluation of succinimide modification with a high abundance in the framework region of golimumab[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 826923.
- [3] WANG X K, XU J, GUO Q C, et al. Improving product quality and productivity of an antibody-based biotherapeutic using inverted frustoconical shaking bioreactors[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1352098.
- [4] LIU T, LI Y T, XU J, et al. Mass spectrometry-based Multi-Attribute Method for mutation analysis in the early development of therapeutic proteins[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2022, 220: 115018.
- [5] 张红梅,张峰,武刚,等. 抗 EpCAM+CD3 双特异性抗体关键表征解析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(04): 620-632.
- [6] LI Y T, FU T, LIU T, et al. Characterization of alanine to valine sequence variants in the Fc region of Nivolumab biosimilar produced in Chinese hamster ovary cells[J]. *MAbs*, 2016, 8(5): 951-960.
- [7] ZHANG R, TANG C J, GUO H Z, et al. A novel glycosylated anti-CD20 monoclonal antibody from transgenic cattle[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 1-11.
- [8] WANG H, WU L P, WANG C. Biosimilar or Not: Physicochemical and biological characterization of mabthera and its two biosimilar candidates[J]. *ACS Pharmacology & Translational Science*, 2021, 4(2): 790-801.
- [9] 王冲,郭怀祖. 不同细胞系表达的抗 EGFR 单抗糖基化结构对比分析[J]. 生物工程学报, 2017, 33(6): 1018-1027.
- [10] FU R R, XU J, GUO Q C, et al. Highly drug/target-tolerant neutralizing antibody (NAb) assay development through target-based drug depletion and drug-based NAb extraction for an anti-EGFR therapeutic monoclonal antibody. [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2024, 241: 116006.
- [11] 吴霖萍,汪泓,陈钢,等. 阿达木单抗理化特性的关键质量属性分析[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(3): 322-332.
- [12] 程倩,贾戴辉,张博慧,等. 利用 β -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶快速酶切分析中国仓鼠卵巢细胞表达的西妥昔单抗抗原结合区的聚糖比例[J]. 中国色谱杂志, 2022, 40(20): 175-181.
- [13] 王文波,武刚,于传飞,等. 亲水相互作用超高效液相色谱法分析单抗 N 糖谱的方法学联合验证[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(24): 2028-2033.
- [14] GUAN X Y, ERIS T, ZHANG L, et al. A high-resolution Multi-Attribute Method for product characterization, process characterization, and quality control of therapeutic proteins[J]. *Analytical Biochemistry*, 2022, 643: 114575.
- [15] ROGSTAD S, YAN H H, Wang X S, et al. Multi-Attribute Method for quality control of therapeutic proteins[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(22): 14170-14177.
- [16] 汪泓,徐进,尹红锐,等. 多属性分析方法应用于治疗类抗体药物质量控制的考量与前景[J]. 药学学报, 2020, 55(9): 2092-2098.
- [17] ZHANG J J, Qin T, Xu L, et al. Development and validation of a peptide mapping method for the characterization of Adalimumab with QDa detector[J]. *Chromatographia*, 2016, 79(7-8): 395-403.
- [18] 徐梦娇,刘涛,徐进 等. 英夫利西单抗糖化方法开发验证及其在抗体药物中的普适性[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2024, 37(5): 155-169.
- [19] LIU T, GUO H Z, ZHU L, et al. Fast characterization of Fc-containing proteins by Middle-Down Mass spectrometry following IdeS digestion[J]. *Chromatographia*, 2016, 79(21-22): 1491-1505.
- [20] LIU B N, GUO H Z, ZHANG J J, et al. In-depth characterization of a Pro-Antibody-Drug conjugate by LC-MS[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13(8): 2702-2710.
- [21] WANG T, CHU L, LI W Z, et al. Application of a quantitative LC-MS Multi-Attribute Method for monitoring site-specific Glycan heterogeneity on a monoclonal antibody containing two N-linked glycosylation sites[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(6): 3562-3567.
- [22] MARTELET A, GARRIGUE V, ZHANG Z, et al. Multi-Attribute Method based characterization of Antibody Drug Conjugates (ADC) at the intact and subunit levels[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2021, 201: 114094.
- [23] JAKES C, MILLAN-MARTIN S, CARILLO S, et al. Tracking the behavior of monoclonal antibody product quality attributes using a Multi-Attribute Method workflow[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2021, 32(8): 1998-2012.
- [24] ROGERS R S, ABERNATHY M, RICHARDSON D D, et al. A view on the importance of "Multi-Attribute Method" for measuring pu-

- riety of biopharmaceuticals and improving overall control strategy[J]. AAPS Journal, 2017, 20(1): 7-15.
- [25] CARILLO S, CRISCUOLO A, FUSSL F, et al. Intact Multi-Attribute Method (iMAM): a flexible tool for the analysis of monoclonal antibodies[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2022, 177: 241-248.
- [26] LANTER C, LEV M, CAO L, et al. Rapid Intact Mass based Multi-Attribute Method in support of mAb upstream process development [J]. Journal of Biotechnology, 2020, 314-315: 63-70.
- [27] PEIRAN L, ZHU X, WU W. Subunit Mass Analysis for Monitoring Multiple Attributes of monoclonal antibodies [J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2019; 33(1):31-40.
- [28] SONG Y E, DUBOIS H, HOFFMANN M, et al. Automated mass spectrometry Multi-Attribute Method analyses for process development and characterization of mAbs[J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2021, 1166: 122540.
- [29] DONG J, MIGLIORE N, MEHRMAN S J, et al. High-throughput, automated protein a purification platform with multi-attribute LC-MS analysis for advanced cell culture process monitoring[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(17): 8673-9.
- [30] LI X W, RAWAL B, RIVERA S, et al. Improvements on sample preparation and peptide separation for reduced Peptide mapping based Multi-Attribute Method analysis of therapeutic monoclonal antibodies using Lysyl endopeptidase digestion[J]. Journal of Chromatography A, 2022, 1675: 463161.
- [31] MILLAN-MARTIN S, JAKES C, CARILLO S, et al. Inter-laboratory study of an optimised peptide mapping workflow using automated Trypsin digestion for monitoring monoclonal antibody product quality attributes[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020, 412 (25): 6833-6848.
- [32] WANG Y, LI X J, LIU Y H, et al. Simultaneous monitoring of Oxidation, Deamidation, Isomerization, and Glycosylation of monoclonal antibodies by liquid chromatography mass spectrometry method with ultrafast Tryptic digestion[J]. MAb, 2016, 8(8): 1477-1486.
- [33] DELANEY K, BIRDSALL R E, YU Y Q. 利用 EmpowerTM 软件简化和自动检测生物制药肽图中的样品间差异[Z]. 沃特世应用纪要, 2022: 720007610ZH.
- [34] KOSHEL B M, BIRDSALL R E, YU Y Q. 在产品确认和工艺检测中使用 ACQUITY QDa 质谱检测器通过单次分析进行多属性监测 [Z]. 沃特世应用纪要, 2016: 720005919ZH.
- [35] ZHANG Z Q, CHAN P K, RICHARDSON J, et al. An evaluation of instrument types for mass spectrometry-based multi-attribute analysis of biotherapeutics[J]. MAb, 2020, 12(1): 1783062.
- [36] XU W C, JIMENEZ R B, MOWERY R, et al. A quadrupole dalton-based Multi-Attribute Method for product characterization, process development, and quality control of therapeutic proteins[J]. MAb, 2017, 9(7): 1186-1196.
- [37] SHI Y K, LI J, XU J M, et al. CMAB009 plus irinotecan versus irinotecan-only as second-line treatment after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer patients: promising findings from a prospective, open-label, randomized, phase III trial[J]. Cancer Communications, 2019, 39(1): 28.
- [38] 何小慧, 石远凯, 秦燕, 等. 重组抗表皮生长因子人鼠嵌合单克隆抗体治疗晚期恶性肿瘤 I 期临床试验[J]. 中国医学杂志, 2011, 91 (33): 2333-2335.
- [39] CARVALHO S B, GOMES R A, PFENNINGER A, et al. Multi-Attribute Method implementation using a high resolution mass spectrometry platform: from sample preparation to batch analysis[J]. PLoS One, 2022, 17(1): e0262711.
- [40] QIAN C, NIU B, JIMENEZ R B, et al. Fully automated peptide mapping Multi-Attribute Method by liquid chromatography-mass spectrometry with robotic liquid handling system[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 198: 113988.

(责任编辑:刘庆松)