

文章编号 1672-6634(2024)05-0155-14

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2024030008

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

徐梦娇^{1,2}, 刘涛^{1,2,3,5}, 徐进^{1,2,3}, 郭清城^{1,2,3,6}, 付蓉蓉^{1,2}, 赵香^{1,2},
王福贵^{1,2}, 宋兰坤⁷, 冀芦沙^{1,2,3}, 钱卫珠^{1,2,3}, 侯盛^{1,2,3},
李军^{1,2,3}, 张大鹏^{1,2,3}, 郭怀祖^{1,2,3,4}

(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. 安捷伦科技(中国)有限公司, 上海 200131)

摘要 糖化修饰作为一种非酶促糖修饰, 通过还原性糖与蛋白氨基酸残基共价结合, 普遍发生于抗体药物生产储存等过程, 显著影响产品的质量和功能。硼酸亲和色谱(BAC)法虽然是检测抗体类药物糖化修饰的主要技术, 但其在测定英夫利西单抗糖化水平时仍面临准确性挑战, 在一定程度上限制了其在质量控制上的应用。本研究深入探讨了影响该单抗 BAC 方法准确性的因素, 明确了该单抗 BAC 方法糖化检测不准确的原因, 并针对性地对流动相的组成和浓度进行了优化, 成功开发出一种改进的 BAC 方法, 能够更精准地测定英夫利西单抗的糖化水平。该方法的准确性通过基于质谱的快速多属性方法确认, 并通过了严格的方法学验证。验证结果表明该方法具有良好的准确性、精密度、耐用性等。此外, 通过对不同类型抗体药物进行测试, 证实了该方法在常规抗体药物糖化检测中的广泛适用性。本研究不仅解决了英夫利西单抗糖化检测的关键技术难题, 还确认了该方法的普适性, 为抗体药物的质量控制提供了一种新的快速、准确的技术方案。这些研究结果有助于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能力。

关键词 英夫利西单抗; 糖化; 硼酸亲和色谱; 抗体药物; 质量控制; 普适性

中图分类号 R966

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Development and Validation of a Glycation Analysis Method for Infliximab and Its Universal Application Across Antibody Drugs

XU Mengjiao^{1,2}, LIU Tao^{1,2,3,5}, XU Jin^{1,2,3}, GUO Qingcheng^{1,2,3,6},

收稿日期: 2024-03-13

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: 郭怀祖, 男, 汉族, 博士, 教授, 上海产业菁英高层次人才, 研究方向: 抗体药物与靶向治疗, E-mail: guohuaizu@163.com; 李军, 男, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 肿瘤免疫与靶向治疗, E-mail: lijun1982@lucn.cn; 张大鹏, 男, 汉族, 博士, 教授, 研究方向: 抗体药物与靶向治疗, E-mail: bigbirdzcn@163.com。

FU Rongrong^{1,2}, ZHAO Xiang^{1,2}, WANG Fugui^{1,2}, SONG Lankun⁷,
JI Lusha^{1,2,3}, QIAN Weizhu^{1,2,3}, HOU Sheng^{1,2,3}, LI Jun^{1,2,3},
ZHANG Dapeng^{1,2,3}, GUO Huaizu^{1,2,3,5}

(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. Agilent Technologies (China) Co., Ltd., Shanghai 200131, China)

Abstract Glycation, a pivotal non-enzymatic modification process characterized by the covalent attachment of reducing sugars to amino acid residues in proteins, is prevalent during the manufacturing and storage phases of antibody therapeutics. This process can critically impact drug quality and efficacy. Although boronate affinity chromatography (BAC) is a widely adopted method to assess glycation modifications in antibody drugs, its use in precisely quantifying infliximab glycation levels has encountered significant accuracy issues, impeding its effectiveness in quality control. Addressing this, our research dissected the elements influencing BAC precision for infliximab, pinpointing specific inaccuracies in glycation detection. Targeted optimization of the mobile phase constituents and concentrations culminated in the establishment of a refined BAC technique. This novel method allows for a more exact quantification of glycation levels in infliximab, with its reliability qualified by a mass spectrometry-based rapid multi-attribute approach, followed by rigorous methodological validation. Our results underscore the method's exceptional accuracy, precision, and resilience. Extensive testing on a variety of antibody drugs further established the method's versatile suitability for standard glycation assessment. This research not only overcomes seminal technical hurdles in infliximab glycation analysis but also affirms the method's universal applicability. It introduces an expedited, precise strategy for antibody drug quality management, promising to expedite enhancements in technological frameworks and intellectual paradigms, thus fortifying product development and quality oversight capabilities.

Key words Infliximab; Glycation; Boronate affinity chromatography; Antibody therapeutics; Quality control; Universal application

近年来,由于抗体药物其卓越的靶向能力和较低的不良反应风险,在治疗领域取得了显著进展,尤其是在癌症、自身免疫疾病和代谢失调等多种疾病的治疗方面^[1-3]。然而,在抗体药物生产、储存等过程中,理化条件的多样性可能导致一系列翻译后修饰的出现,如糖基化、糖化、氧化、脱酰胺、异构化等,这些修饰可能会对药物的功能带来不同程度的影响^[4-6]。其中糖化作为一种重要的修饰,受到越来越多的关注。

糖化不同于糖基化,糖化是还原性糖共价结合到氨基酸残基(主要是赖氨酸)的一种非酶促糖修饰反应,而糖基化是在糖基转移酶作用下发生的非糖生物分子与糖共价结合的糖修饰反应。抗体药物的糖化受多种因素的影响,包括氨基酸序列、培养和制备工艺的变化等。例如,在细胞培养过程中,培养基的 pH、温度和葡萄糖的浓度等因素会影响糖化反应^[7-9],其中葡萄糖的影响最为直接^[10]。在药物存贮阶段,温度、湿度和时间也会对抗体糖化产生不同程度的影响,制剂配方中的成分,如蔗糖,其也可能在酸性和高温条件下水解为还原型单糖从而加速糖化进程,即使是冻干试剂在不同储存条件下也可能引发糖化,而冻干工艺本身也可能对糖化水平产生影响^[11]。

糖化可能影响抗体药物的结构、理化性质、稳定性以及功能活性^[12,13]。例如,抗体发生糖化修饰后会使赖氨酸残基的正电荷丢失,进而影响整体电荷分布。研究表明,糖化的抗体可能会通过改变抗体分子表面电荷以及疏水性从而导致聚体形成^[14],进而影响批间一致性甚至功能活性。糖化对不同抗体的影响各异,有报道显示,糖化可降低抗体与抗原的亲和力,显著增加解离速率^[15],也有研究表明,经强制糖化处理后,抗体的Fc功能活性并未受影响^[16]。糖化普遍发生于抗体药物生产储存等过程,对产品的质量和功能可能会产生显著的影响。另外,糖化是一种可逆反应,在某些条件下可以减少糖化水平^[17],目前并未有研究表明特定氨基酸序列与糖化的关联,因此针对不同抗体的糖化影响,还需要进行客观的风险评估,尤其对于糖化比例较高的抗体需额外关注。

与糖基化的研究相比,抗体类药物糖化相关研究相对较少。目前,糖化检测的方法主要有硼酸亲和色谱(Boronate affinity chromatography, BAC)、离子交换色谱、毛细管等电聚焦电泳、硝基四氮唑蓝还原试验(NBT Reduction Assay)和液质联用(Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)等^[18,19]。其中,BAC法由于操作简单、设备应用广泛等优势,常被用于抗体药物糖化组分的分离、纯化和检测等。硼酸亲和柱在填料基质上键合了m-氨基苯硼酸官能团,利用硼酸与顺式二羟基化合物之间的共价配位作用实现分离纯化。在碱性环境中,苯基硼酸基团会水解,形成带负电荷的四面体硼酸盐,容易与邻近的含有1,2-顺式二醇的分子生成稳定的五元环络合物而被介质吸附^[20];在酸性条件下,络合物被打开,糖化组分从介质解离,或在含有高浓度的另一种顺式二醇化合物(例如山梨醇)的碱性溶液中洗脱,实现分离目的。但在分析过程中,通常存在非特异性相互作用的干扰^[21],例如由于硼酸亲和色谱柱上的苯基硼酸官能团由硼酸中的一个羟基替换为苯环,而苯环的存在可能会与蛋白中的芳香氨基酸残基之间发生疏水相互作用,以及碱性条件下阴离子硼酸基团与蛋白所带正电荷之间可能存在离子相互作用,这些因素均可能会对糖化的检测产生干扰,影响检测的准确性和峰型表现,因此方法开发时需要考虑多种影响因素。

TNF α 在多种炎症性疾病的发生发展中作用关键,目前已上市的有多个针对TNF α 的抗体类药物^[22],其中作为全球首个上市的抗TNF α 药物英夫利西单抗(Infliximab),其针对膜型TNF α 的亲和力处于明显的优势,在多种疾病特别是炎症性肠病上表现优秀^[21-25]。这也推动了英夫利西单抗及其生物类似药的快速发展^[26,27]。BAC法虽然是检测抗体类药物糖化修饰的主要技术,但其在测定英夫利西单抗糖化水平时仍面临准确性存疑的挑战。已有的英夫利西单抗糖化检测的相关报道中,基于质量肽图谱或亚单位质谱的检测方法其糖化水平常处于较低水平^[28,29],而使用BAC测得的糖化比例却接近100%^[30],针对英夫利西单抗,已有糖化方法存在测不了或测不准的问题,目前对英夫利西单抗糖化进行准确定量的BAC方法仍罕有报道,这在一定程度上限制了其在质量控制上的应用。

本研究针对英夫利西单抗这一特殊的人鼠嵌合单抗药物,考虑到其糖化特性对药物安全性和功效的重要性,以及传统BAC技术在检测上存在的局限性,进行了深入的方法学研究并优化。我们识别并解析了影响传统BAC技术准确性的主要因素,并针对性地调整了流动相组成和浓度,成功开发出一种改良的BAC方法,这种新方法能够更为精确地测定英夫利西单抗的糖化水平。为了确保方法的准确性,本研究还采用了基于质谱的快速多属性方法(Multi-attribute method, MAM)进行确认^[19,31,32],并进行了系统的方法学验证,包括但不限于准确性、精密度、稳定性等^[33,34]。此外,本研究不仅考察了改进的BAC方法在英夫利西单抗上的应用,还探讨了其与其他抗体类药物糖化分析中的潜在适用性。通过对不同抗体类药物进行系列测试,明确该方法的广泛适用性。通过这些研究工作,本研究不仅解决了英夫利西单抗糖化检测的具体技术难题,还推广了一种新的、快速准确的抗体药物质量控制技术方案。这些成果将促进相关技术平台的进步和理念的更新,强化产品开发和质量控制的能力,对于抗体药物分析领域具有重要的实用价值和理论意义。

1 材料与方法

1.1 设备

Agilent 1260 Infinity II;色谱柱:TSK Boronate-5PW(7.5 mm $\times$ 75 mm)(TOSOH),ACQUITY UP-LC Protein BEH C4 30 nm 1.7 μ m,2.1 mm $\times$ 50 mm,ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m,2.1 mm $\times$ 100 mm(Waters);台式离心机(Thermo, FRESCO 17型);斡旋混匀器(IKA, MS3 digital型);电子天平

(METTLER TOLEDO, MS1003S/01 型);超纯水仪(Millipore, Milli-Q REFERENCE A+型);pH 计(METTLER TOLEDO SevenCompact S210-K 型);ACQUITY UPLC I-Class PLUS 和 ACQUITY I CLASS RDa 以及 Xevo G2-S QToF 系统(Waters)。

1.2 材料

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)(Merck 公司);羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)(Sigma 公司);山梨醇(Sigma 公司);氯化钠(NaCl)(国药集团化学试剂有限公司);碳酸氢铵(NH_4HCO_3)(国药集团化学试剂有限公司);葡萄糖(上海精析化工科技有限公司);超滤离心管 UFC5010BK (Millipore);英夫利西单抗(上海张江生物技术有限公司);糖苷酶(PNGase F/Endo F2)、胰蛋白酶(上海张江生物技术有限公司);甲醇(Fisher Chemical)。

1.3 样品制备

1.3.1 BAC 样品制备。使用 30 ku 超滤离心管将样品置换 3 次以上于 A 相缓冲溶液 50 mmol/L HEPES 和 200 mmol/L NaCl, pH 8.7(根据探索条件加以调整)中,调终浓度 15 mg/mL;17 000 g, 10 min 离心后,取上清上样,上样量 150 μg 。

1.3.2 BAC 强制糖化样品制备。将英夫利西单抗置换于含有 200 mmol/L 葡萄糖的 200 mmol/L 的碳酸氢铵缓冲溶液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 周,30 ku 超滤离心管将样品置换 3 次于 A 相缓冲溶液中,终浓度 15 mg/mL;17 000 g, 10 min 离心后,取上清上样。

1.3.3 质谱(MS)法样品制备。质量肽图谱:取 100 μg 样品经变性、还原、烷基化以及终止烷基化后,将样品置换至 50 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.0)溶液中,至终浓度约为 0.2 mg/mL,取 200 μg 样品,按 1:10(m:m)比例加胰蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4~6 h,加入甲酸至终浓度为 0.5%~1.0%,终止酶切反应。17 000 g, 10 min 离心后,取上清检测,上样量 0.5~2.0 μg 。

Endo F2 酶切:取 100 μg 样品至 30 ku 超滤离心管,50 mmol/L NH_4FA (pH 4.5)置换 4~5 次至样品终浓度 1 mg/mL;按 1:50(m:m)加入 Endo F2;涡旋混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 8 h;17 000 g, 10 min 离心后,取上清检测,上样量 5.0~10.0 μg 。

PNGase F 酶切:取 100 μg 样品至 30 ku 超滤离心管,用 50 mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.0)置换 4~5 次至样品终浓度 1 mg/mL;按 1:10(m:m)加入 PNGase F;涡旋混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 16 h;17 000 g, 10 min 离心后,取上清检测,上样量 5.0~10.0 μg 。

1.4 实验方法

1.4.1 基于 BAC 方法前期探索阶段。柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL/min;UV 检测波长:280 nm;流动相 A:以 50 mmol/L HEPES, 200 mmol/L NaCl, pH 8.7 为基础进行增减;流动相 B:流动相 A 中加入 500 mmol/L 山梨醇;流动相 C:超纯水;流动相 D:0.8 mol/L NaCl;梯度洗脱程序(0~10 min, 100% 流动相 A;10~15 min, 0%~100% 流动相 B;15~20 min, 100% 流动相 B;20~21 min, 0%~100% 流动相 C;21~25 min, 100% 流动相 C;25~26 min, 0%~100% 流动相 D;26~30 min, 100% 流动相 D;30~31 min, 0%~100% 流动相 C;31~36 min, 100% 流动相 C;36~37 min, 0%~100% 流动相 A;37~50 min, 100% 流动相 A);进样量:150 μg ;糖化比例=(糖化峰面积/糖化和非糖化峰面积之和) $\times$ 100%。

1.4.2 BAC 方法 Tris 梯度优化。柱温:40 $^{\circ}\text{C}$;流速:1 mL/min;检测波长 280 nm;流动相 A:50 mmol/L HEPES, 200 mmol/L NaCl 和 125 mmol/L Tris, 流动相 B:50 mmol/L HEPES 和 200 mmol/L NaCl, 流动相 C:50 mmol/L HEPES, 200 mmol/L NaCl, 125 mmol/L Tris, 500 mmol/L 山梨醇;梯度洗脱(0~10 min, 100% B;10~60 min, 0~100% A;60~65 min, 0~100% C;65~75 min, 100% C;75~76 min, 0~100% B;76~86 min, 100% B),进样量 150 μg 。

1.4.3 基于 MS 的检测方法。质量肽图谱:ACQUITY UPLC I-Class PLUS 液相;流速:0.2 mL/min;柱温:45 $^{\circ}\text{C}$;色谱柱:ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm;流动相 A:99.9% H_2O 和 0.1% FA;流动相 B:99.9% ACN 和 0.1% FA;梯度时间 80 min,洗脱梯度为 1%~37% B;检测波长 214 nm;Xevo G2-S QToF 质谱,正离子模式进行数据采集,采集范围为 50~2 500 m/z。

基于 MS 的快速 MAM: ACQUITY UPLC I-Class PLUS 液相;流速:0.4 mL/min;柱温:80 °C;色谱柱: ACQUITY UPLC Protein BEH C4 30 nm, 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 50 mm, 1/pkg;流动相 A:99.9% H₂O 和 0.1% FA;流动相 B:99.9% ACN 和 0.1% FA;梯度(0~6 min, 10% B; 6~7 min, 10%~95% B; 7~8 min, 95% B);检测波长 280 nm;ACQUITY I CLASS RDa 质谱,正离子模式进行数据采集,采集范围为 400~7 000 m/z。

2 结果与讨论

2.1 影响传统 BAC 法准确性的因素

2.1.1 现有方法的问题。目前,针对英夫利西单抗的糖化检测方法主要为基于质谱的方法以及 BAC 法,已有报道显示(表 1),这两种方法检测结果呈现多样性和变异性^[28-30](表 1)。其中基于质谱的糖化检测方法所测得的糖化比例常处于一个较低的水平,基于肽段水平所检测的原研以及生物类似药的糖化比例差异较大,且存在较大的批间变异性,这也可能与其比较复杂的样品处理过程例如变性、还原、烷基化以及酶解等有关,对于糖化这种可逆修饰,复杂的样品处理,不可避免地会对其检测产生一定的影响;基于 BAC 糖化测定方法,报道中的三批原研产品以及三批英夫利西单抗生物类似药糖化比例均接近 100%^[30],与基于 MS 方法的检测结果差异较大,且 100% 的糖化比例,也不符合抗体的常规表现。

表 1 英夫利西单抗糖化比例汇总表

Table 1 Summary table of infliximab glycation ratios

样品	方法	糖化比例(%)	参考资料
US Remicade	LC-MS (Subunit)	LC: 0.8 $\pm$ 0.1, HC: 0.8 $\pm$ 0.1	FDA Advisory Committee Briefing Document, February 9, 2016, CT-P13 (infliximab biosimilar): briefing document for the Arthritis Advisory Committee
EU Remicade		LC: 0.7 $\pm$ 0.0, HC: 0.8 $\pm$ 0.1	
CT-P13*		LC: 2.4 $\pm$ 0.1, HC: 4.0 $\pm$ 0.2	
DP1	LC-MS (Peptide)	0.256	Martín S M, Zaborowska I, Jakes C, et al. Comparability study for the determination of post-translational modifications of infliximab innovator and biosimilars by automated high-throughput peptide mapping analysis[1]
DP2		3.648	
BS1*		16.522	
BS2*		0	
RC1	LC-MS (Subunit)	HC: 0.8/LC: 0.8	Pisupati K. Stability and Structural Analysis of hGH and Infliximab for Controlled Release Depots and Biosimilars[D]. , 2016
RS1*		HC: 4.0/LC: 2.4	
RC1/RC2/RC4	BAC	99.65/99.90/99.95	
RS1*/RS3*/RS4*		99.41/99.89/99.71	

注: * 生物类似药。

为验证先前报道中所采用的检测方法的可靠性,我们重复了所使用的 BAC 方法。如图 1(a)所示,我们采用含有 400 mmol/L NaCl 和 100 mmol/L 磷酸钠的平衡液(pH 值为 8),结果显示糖化比例接近 100%,这与先前的报道一致^[30]。一项关于 IgG2 抗体糖化水平评估的研究也使用了相同的 400 mmol/L NaCl 和 100 mmol/L 磷酸钠平衡液。文中指出,尽管先前使用 HEPES 缓冲液的 BAC 方法已用于评估抗体的糖化水平,但对于该研究中的抗体而言,HEPES 并不是一个表现良好的缓冲液。相反,在 pH 8.5 的磷酸钠缓冲液中表现最佳^[35]。

为了进一步确认 BAC 方法的可行性,参考关于 BAC 糖化的相关研究^[10,11,36-38],A 相平衡液基本均由 HEPES/EPPS 和 NaCl 组成,有时额外添加不超过 25 mmol/L 的 Tris;而对于 pH 的选择,现有报告指出硼酸亲和和保留峰面积百分比与抗体的等电点(pI)之间没有明显的相关性,在碱性条件下(pH 8.6),pI 值不是决定抗体与硼酸柱结合的关键因素,当在 pH 8.6 或 8.7 的流动相下,糖化的抗体组分将在硼酸柱上完全保留^[38]。综合这些信息,最终我们选择的通用糖化检测方法为:50 mmol/L HEPES 和 200 mmol/L NaCl, pH 8.7 作为初始的 A 相平衡溶液,如图 1(b)所示,所测定的英夫利西单抗糖化比例仍接近 100%。这与我们采用质量肽图谱所检测的糖化水平(10%左右)差异明显[图 1(c)]。在相同条件下,将此方法应用于同为嵌合

型 IgG1 的对照抗体,如图 1(d)所示,此方法能够很好地分离对照抗体的非糖化和糖化组分,表明对于英夫利西单抗,现有的硼酸亲和条件不适用,因此需要对其进行特定的方法优化。

为了明确英夫利西单抗糖化检测问题的确切原因,我们细致研究了可能影响 BAC 法的多个因素,包括糖基化、疏水相互作用、离子相互作用和配基相关的非特异性相互作用,并对它们进行了逐一的探索。

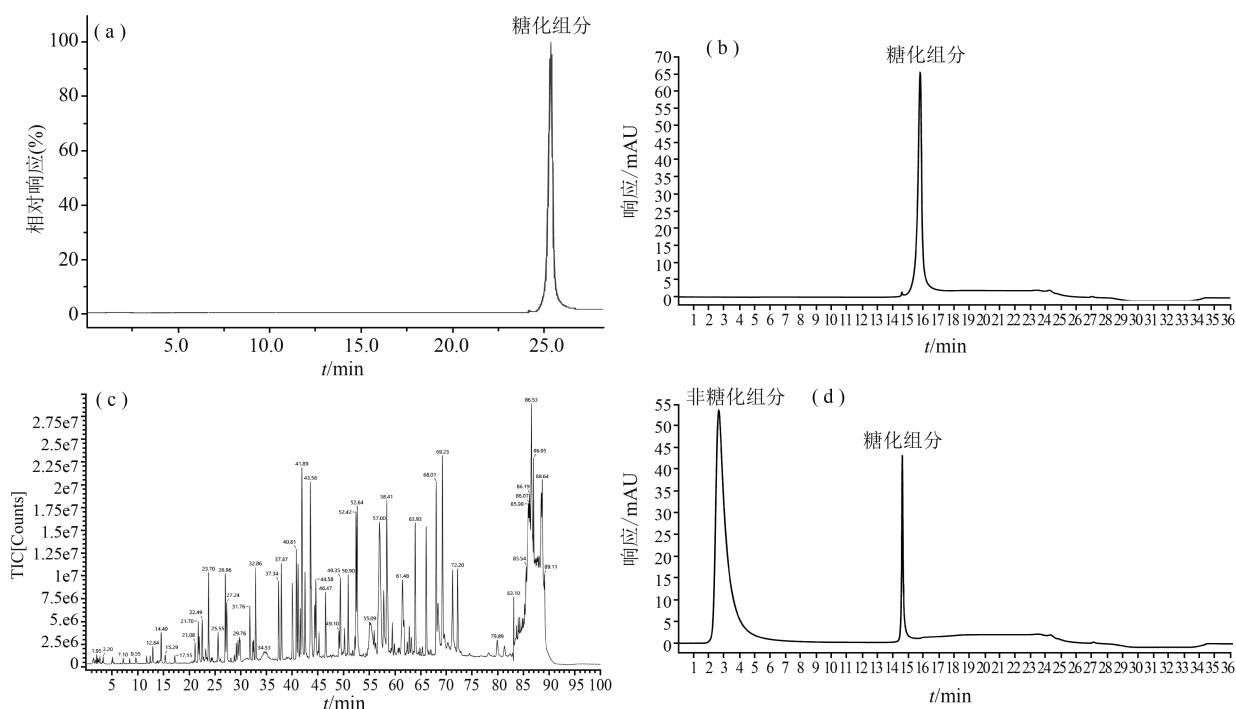


图 1 (a) 基于已报道方法的 BAC 图谱;(b) 抗体常规方法的 BAC 图谱;(c) 质量肽图谱糖化分析;(d) 对照抗体常规方法 BAC 图谱

Fig. 1 (a) BAC Chromatogram based on reported method; (b) BAC chromatogram based on conventional method; (c) Glycation analysis based on mass spectrometry peptide mapping; (d) BAC chromatogram of a control antibody based on conventional method

2.1.2 糖基化因素。以往研究对于糖基化对糖化检测结果的影响存在争论^[21]。有研究表明,BAC 可以分离糖基化膜蛋白,并在进一步表征之前用于纯化糖蛋白;也有研究指出,硼酸盐配体能特异性地结合糖化蛋白^[42];因此我们分别通过 Endo F2 和 PNGase F 对英夫利西单抗进行去糖基化处理,以验证糖基化修饰是否是导致定量不准确的关键原因。结果如图 2(a)所示,即使去糖后,检测到的糖化水平仍接近 100%,表明糖基化修饰并非是影响英夫利西单抗糖化定量准确性的主要因素。

2.1.3 疏水相互作用。BAC 柱上的苯基硼酸官能团由硼酸中的一个羟基替换为苯环,而苯环的存在可能会与糖化蛋白中的芳香氨基酸残基之间存在疏水相互作用从而干扰糖化的检测。根据已有报道,在缓冲溶液中添加低至中等水平的甲醇,可以很容易抑制非特异性疏水相互作用引起的干扰,同时不影响苯基硼酸与顺式二醇的亲合性^[21]。因此我们在初始流动相基础上添加不同浓度的有机相,验证是否是疏水相互作用影响了其检测。实验如图 2(b)表明,即使在含有 20%有机相(甲醇或异丙醇)的条件下,糖化水平仍接近 100%,说明疏水相互作用并非主要问题。

2.1.4 离子相互作用。碱性条件下阴离子硼酸基团与蛋白所带正电荷之间可能存在离子相互作用,通常情况下可通过添加一定浓度的盐溶液消除蛋白与硼酸盐之间的这种非特异性吸附。因此,我们加入不同浓度的 NaCl,如图 2(c)所示,无论是添加 300 mmol/L 还是 500 mmol/L,糖化比例仍然是 100%。因此,离子相互作用不是英夫利西单抗糖化检测问题的主要影响因素。

2.1.5 配基相关的非特异性相互作用。不同抗体其氨基酸序列不同,高级结构和表面电荷分布存在差异,这些都会影响 BAC 对糖化比例的测定。目前条件下,英夫利西单抗糖化和非糖化组分均与硼酸亲和柱有强相互作用。硼酸亲和柱之所以能够结合糖化抗体,是因为苯基硼酸官能团能与其含有的呈近似共面构型的

顺式二醇形成强的硼酸酯键,而山梨醇中具有相似的结构,可以通过添加高浓度的山梨醇来打破这种相互作用,并实现糖化和非糖化组分的分离。

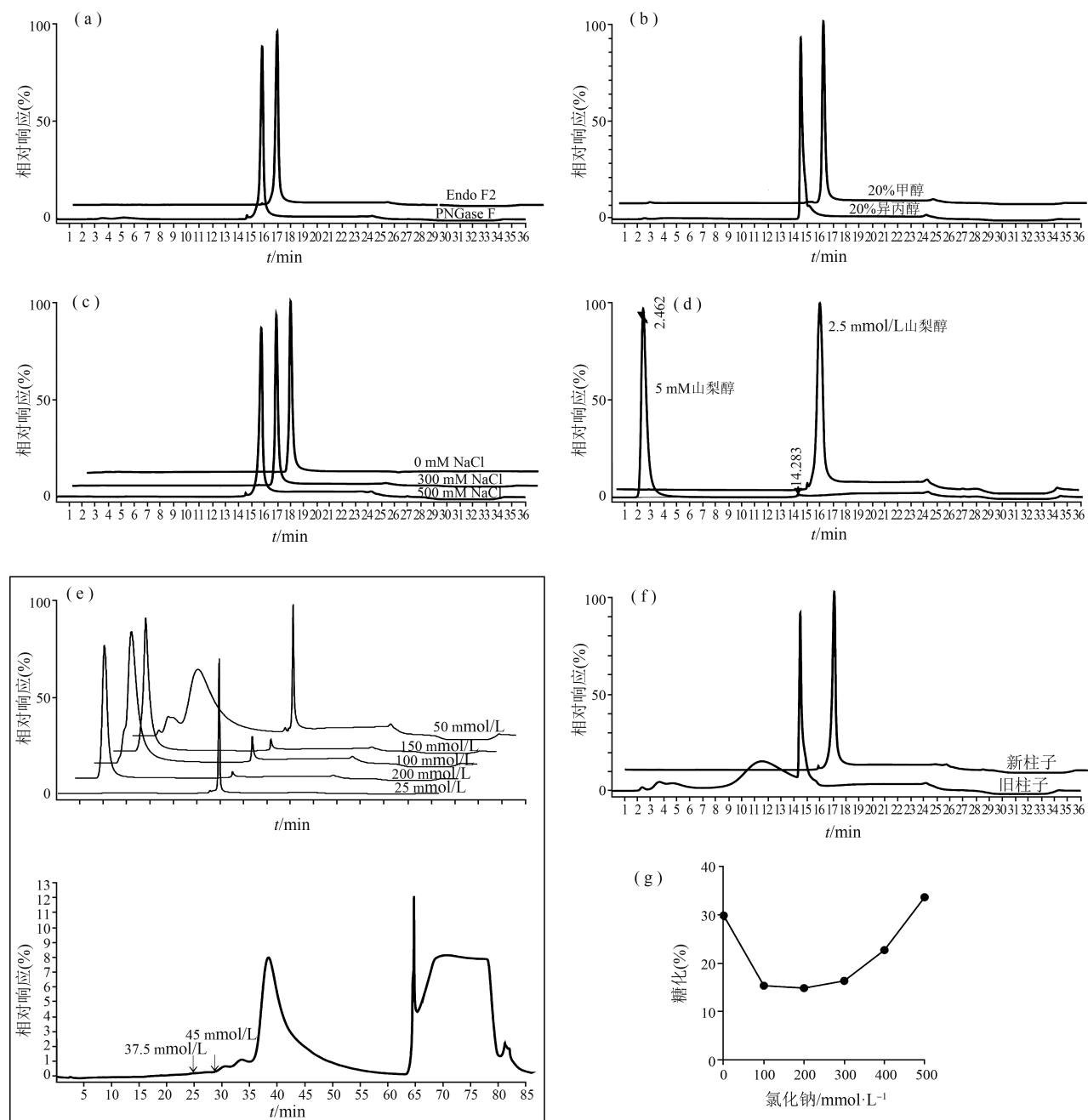


图2 方法学优化(a) 糖基化影响;(b) 疏水相互作用;(c) 离子相互作用;(d) 非特异性相互作用;
(e) Tris 浓度优化;(f) 新旧柱子对比;(g) NaCl 浓度优化;

Fig. 2 Methodology optimization (a) Deglycosylation; (b) Hydrophobic interaction; (c) Ions interaction; (d) Non-specific Interaction; (e) Optimization of Tris concentration; (f) Comparison of results from new and old chromatography columns; (g) Optimization of NaCl concentration

我们在初始流动性中加入较低浓度的山梨醇如图 2(d),发现 5 mmol/L 山梨醇即可破坏英夫利西单抗与硼酸亲和柱之间的强相互作用。因此我们推测,英夫利西单抗糖化检测问题可能是由于非糖化英夫利西单抗组分与 BAC 配基间非特异性相互作用所引起。为了验证这一推测,我们进一步尝试了三羟甲基氨基甲烷(Tris),由一个甲基基团与三个羟甲基基团连接而成,相较于山梨醇是一种较为温和的洗脱试剂,对硼酸官能团具有弱亲和力,是一种常用的非特异性相互作用屏蔽试剂^[38,43-45],已有报道一般添加不超过

25 mmol/L 的 Tris^[37]。如图 2(e)上图所示,我们先通过添加 25 mmol/L Tris 发现糖化比例保持不变,而 Tris 提升一倍浓度后,出现糖化、非糖化组分的分离趋势,再增加一倍浓度,BAC 流穿组分占比逐步增加,直到添加至 200 mmol/L Tris,此时 BAC 洗脱峰仅占比约 1.30%。

考虑到 Tris 浓度过高会破坏糖化抗体与硼酸亲和柱之间的相互作用,而低浓度又不足以抑制非特异吸附,因此我们进一步通过建立 Tris 线性变化梯度来确认 Tris 的合适浓度。结果如图 2(e)下图所示,在 25 min 处开始出现第一个非特异性峰,经计算此时 Tris 浓度约 37.5 mmol/L,直到 45 mmol/L 后有明显紫外信号出现,最终我们在此范围内选择 40 mmol/L 作为确定的 Tris 浓度。

根据配基相关的非特异相互作用推测,如果配基密度较低,其非特异性相互作用应该相应减弱,为了进一步验证英夫利西单抗与硼酸亲和柱之间的相互作用,并考虑到色谱柱在反复使用过程中可能会发生配基流失,我们利用了一根使用 800 次以上的旧色谱柱开展实验。在 50 mmol/L HEPES 和 200 mmol/L NaCl 的常规初始流动相条件下,我们对新旧色谱柱进行了比较性分析。如图 2(f)所示,新旧柱子展现出明显的性能差异,旧柱子在糖化和非糖化组分的分离上显示出趋势性的改善,可能是由于随着色谱柱的老化,配基密度减少,其非特异性相互作用有所下降。这一结果强化了我们关于英夫利西单抗与硼酸亲和柱之间存在显著相互作用的假设。这也从侧面说明了 BAC 柱使用次数的增加,在非方法学优化时,对于英夫利西单抗糖化检测可能是个有利因素。

我们深入探讨了影响英夫利西单抗 BAC 方法准确性的因素,明确了配基相关的非特异性相互作用是影响该单抗 BAC 方法糖化检测不准确的确切原因,针对该原因,我们针对性地对流动相的组成和浓度进行了优化,明确了 40 mmol/L Tris 足以抵消该非特异性相互作用。

2.2 英夫利西单抗糖化 BAC 方法开发及性能确认

2.2.1 英夫利西单抗糖化检测 BAC 法。在确认了关键因素后,我们进一步优化了检测方法。HEPES 作为一种常用的碱性缓冲剂,在此前的研究中并未显示对糖化分析产生显著的干扰。为了平衡 NaCl 对阴离子硼酸基团和蛋白质正电荷之间离子相互作用的抑制作用以及其作为分散剂可能破坏抗体三级结构的风险,我们进一步研究了 NaCl 的添加量对 BAC 法的影响。在 50 mmol/L HEPES 和 40 mmol/L Tris, pH 8.7 的条件下,我们尝试从 0 mmol/L 至 500 mmol/L 的多个 NaCl 浓度。结果显示,在图 2(g)中可见,随着 NaCl 浓度的增加,英夫利西单抗的糖化比例呈现先下降后趋于稳定,再随后上升的趋势,我们确定 200 mmol/L NaCl 为最适宜的浓度。

最终,我们优化的英夫利西单抗糖化检测方法参数如:

柱温:40 °C; 流速:1 mL/min; UV 检测波长:280 nm; 流动相 A:50 mmol/L HEPES, 200 mmol/L NaCl, 40 mmol/L Tris, pH 8.7; 流动相 B:流动相 A 中加入 500 mmol/L 山梨醇; 流动相 C:超纯水; 流动相 D:0.8 mmol/L NaCl; 梯度洗脱程序:0~25 min, 100% 流动相 A; 25~26 min, 0%~100% 流动相 B; 26~30 min, 100% 流动相 B; 30~31 min, 0%~100% 流动相 C; 31~35 min, 100% 流动相 C; 35~36 min, 0%~100% 流动相 D; 36~40 min, 100% 流动相 D; 40~41 min, 0%~100% 流动相 C; 41~45 min, 100% 流动相 C; 45~46 min, 0%~100% 流动相 A; 46~55 min, 100% 流动相 A。进样量:150 µg。总运行时间:55 min。采用优化后的条件,可有效进行英夫利西单抗的糖化检测,同时减少了非特异性相互作用以及可能的结构破坏。

2.2.2 基于质谱的快速 MAM 进行 BAC 法性能确认。如图 3(a)所示,BAC 根据以上确定条件所测得的英夫利西单抗糖化比例为 14.92%。由于糖基化中 G0F 糖苷与 G1F 相差一个半乳糖,其分子量与发生糖化所增加的分子量一致,都为 162 u,因此图 3(b)通过 Endo F2 去糖基化修饰后的基于质谱的快速 MAM 对英夫利西单抗糖化进行了定量确认,检测结果为 14.42%,对比结果显示基于质谱的方法与 BAC 所测得的糖化比例基本一致,具有很好的相关性。

2.2.3 BAC 法组分收峰鉴定。通过多次进样收集了英夫利西单抗糖化和非糖化组分,浓缩重新上样,BAC 法测定,如图 4(a)证明我们所收集的 BAC 流穿组分为非糖化抗体,BAC 洗脱峰组分为糖化抗体。图 4(b)通过基于质谱的快速 MAM 对于糖化组分再次验证,表明我们所建立的 BAC 可对英夫利西单抗糖化和非

糖化组分进行有效的分离,方法学具有很好的分辨性能。

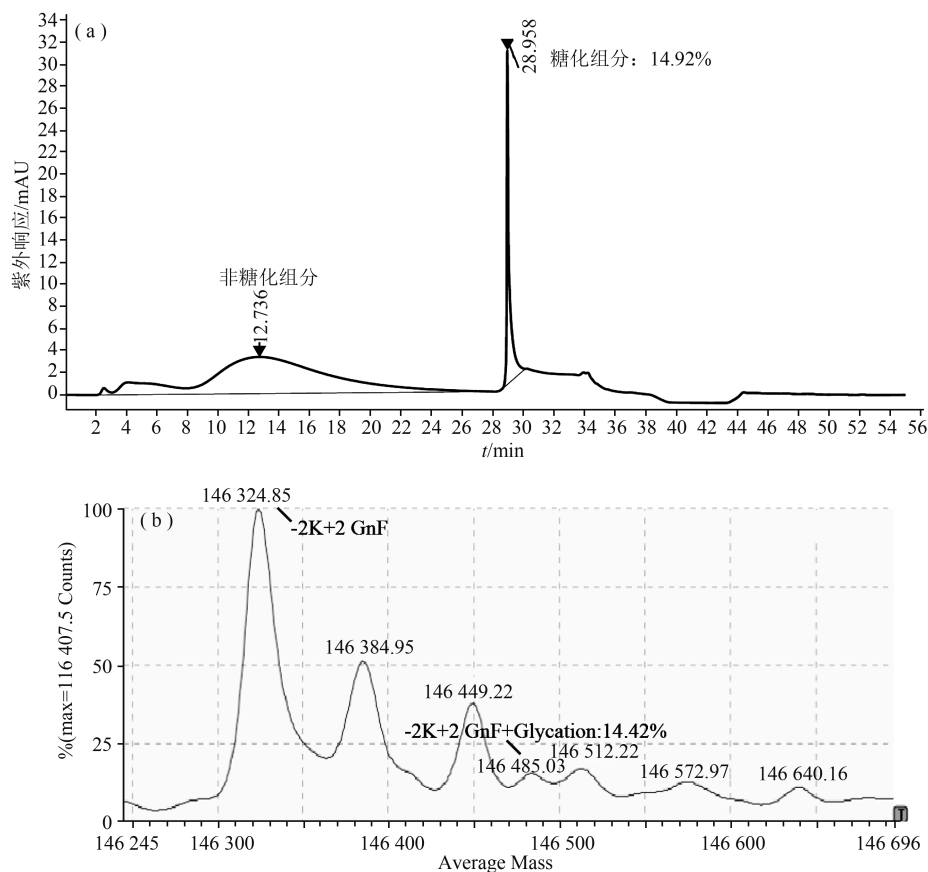


图3 (a) 优化流动相后的BAC图谱;(b) 基于MS的快速MAM图谱

Fig. 3 (a) BAC chromatogram with optimized mobile phase; (b) Rapid MS-based MAM

2.3 英夫利西单抗糖化BAC法方法学验证

2.3.1 精密度。(1) 重复性。在规定范围内,取同一浓度6份供试品,考察6份供试品溶液中糖化抗体的含量,并计算其RSD值($n=6$)。结果如表2显示,6份供试品溶液中糖化抗体含量为 $(14.78 \pm 0.09)\%$,其 $RSD_{n=6} = 0.62\%$ (可接受标准RSD值不大于 2.0%),结果表明该方法的重复性良好。(2) 中间精密度。由另一位实验员配制平行6份供试品溶液,考察6份供试品溶液中糖化抗体的含量,并计算其RSD值($n=6$),同时计算与重复性实验一起12份供试品溶液中糖化含量的RSD值($n=12$)。结果如表3显示6份供试品溶液中糖化抗体含量为 $(14.74 \pm 0.19)\%$,其 $RSD_{n=6} = 1.31\%$,与重复性共12份供试品溶液中糖化含量的 $RSD_{n=12} = 0.98\%$,RSD值均小于 2.0% ,结果表明该方法的中间精密度良好。

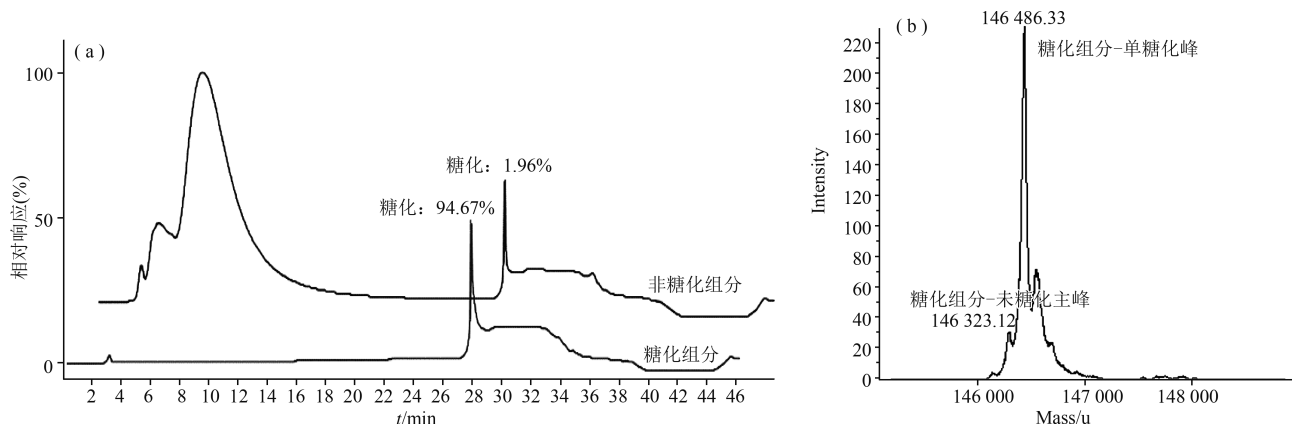


图4 (a) BAC收峰鉴定;(b) 基于MS的快速MAM收峰鉴定

Fig. 4 (a) BAC peak identification; (b) Peak verification based on rapid MS-based MAM

2.3.2 准确度。用流动相 A 分别稀释收集的非糖化和糖化样品至分别含 30%,15%,7.50%、3.75%、1.88%糖化的样品,每个含量的样品各平行配制 3 份,作为准确度测定溶液,按照色谱条件进样检测,计算糖化组分的回收率来评价准确性。糖化组分的回收率=(检测的糖化比例值/理论的糖化比例值)×100%。结果见表 4,不同糖化比例样品的回收率均在 90%~110%的可接受范围内,并且各水平准确度溶液回收率的 RSD 值在 0.61%~4.99%之间,均小于 5.0%,本方法准确性良好。

表 2 重复性验证结果

Table 2 Validation results for repeatability

供试品	糖化抗体含量(%)	AV±SD(%)	RSD(%)
1	14.80	14.78±0.09	0.62
2	14.77		
3	14.74		
4	14.73		
5	14.96		
6	14.71		

表 3 中间精密度验证结果

Table 3 Validation results for intermediate precision validation

供试品	糖化抗体含量(%)	AV±SD(%)	RSD(%,n=6)	RSD(%,n=12)
1	14.96	14.74±0.19	1.31	0.98
2	14.97			
3	14.52			
4	14.61			
5	14.61			
6	14.79			

表 4 准确度验证结果

Table 4 Validation results for accuracy

糖化峰理论值(%)	糖化峰实测值 AV±SD(%)	糖化峰实测值 RSD(%)	回收率 AV±SD(%)	回收率 RSD(%)
30	30.08±0.18	0.61	100.25±0.61	0.61
15	15.27±0.21	1.36	101.78±1.39	1.36
7.5	7.69±0.15	1.90	102.47±1.95	1.90
3.75	3.73±0.15	3.89	99.39±3.86	3.89
1.88	1.89±0.09	4.99	100.84±5.04	4.99

2.3.3 线性。对“2.3.2”项中不同配比制备的糖化样品进行检测,以糖化组分峰面积百分比的理论值对其相应的实测值进行线性回归,利用拟合曲线的 R² 评价线性。结果如图 5 所示,糖化组分的相关系数为 0.999 4,证明本方法的线性良好。

表 5 耐用性分析(柱温)

Table 5 Robustness evaluation(Column temperature)

柱温/℃	糖化峰实测值 AV±SD(%)	糖化峰实测值 RSD(%)	不同柱温间 AV±SD(%)	不同柱温间 RSD(%)
38	14.23±0.00	0.02	14.66±0.35	2.37
40	14.85±0.04	0.28		
42	14.90±0.20	1.33		

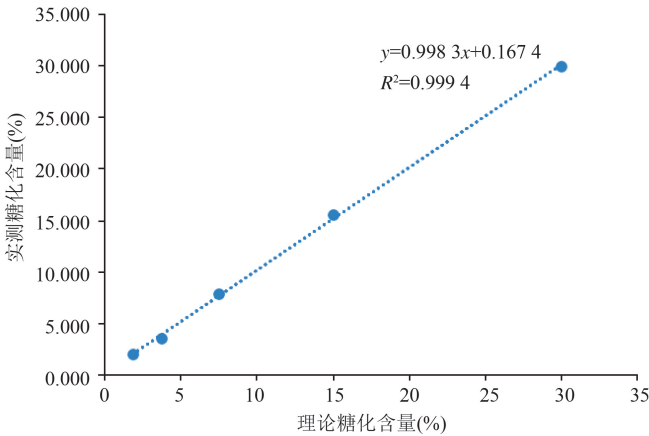


图 5 线性图谱
Fig.5 Linearity

2.3.4 耐用性。分别用柱温(38、40、42 °C)和 HEPES 浓度(40、50、60 mmol/L)考察该方法的耐用性。改变柱温、HEPES 浓度分别对英夫利西单抗检测 3 次,结果见表 5 和 6。在 38、40、42 °C 三种不同柱温时,英夫利西单抗糖化峰面积百分比的 RSD 值为 2.37%;当 HEPES 浓度为 90、100、110 mmol/L 时,英夫利西单抗糖化峰面积百分比的 RSD 值为 0.90%,耐用性较好。

表 6 耐用性分析(HEPES)

Table 6 Robustness evaluation (HEPES)

HEPES 浓度/ (mmol · L ⁻¹)	糖化峰实测值 AV±SD(%)	糖化峰实测值 RSD(%)	不同浓度间 AV±SD(%)	不同浓度间 RSD(%)
40	14.54±0.02	0.15		
50	14.75±0.02	0.14	14.59±0.13	0.90
60	14.47±0.06	0.39		

表 7 系统适用性验证结果(n=6)

Table 7 Validation results for system suitability

针数	糖化抗体含量(%)	AV±SD(%)	RSD(%)
1	14.74		
2	14.76		
3	14.83		
4	14.90	14.82±0.06	0.43
5	14.86		
6	14.87		

2.3.5 系统适用性。空白对照无干扰峰,系统适用性对照品的色谱图与参考图谱相似。将对照品溶液重复进样 6 针,考察每针对照品溶液中糖化抗体色谱峰的面积百分比含量,并计算 RSD 值($n \geq 3$)。结果见表 7,检测糖化抗体百分含量的 RSD 值为 0.43%(RSD 值 $\leq 2.0\%$),系统适用性较好。另外,可根据实际情况设置其他色谱系统的适用性参数包括比如塔板数、分离度、灵敏度、拖尾因子等。

2.4 英夫利西单抗糖化 BAC 法在抗体药物中的普适性

为了进一步了解此方法是否具备广泛适用性,对 8 种不同类型的抗体类药物进行了糖化测定。其中 mAb1 和 mAb2 是 IgG1 单克隆抗体,mAb3 属于 IgG2 单克隆抗体,mAb4 和 mAb5 是 IgG4 单克隆抗体,mAb6 和 mAb7 是融合蛋白,mAb8 是一种抗体偶联药物。除 mAb2 以外其他均存在 N 糖基化修饰,mAb6 还同时具有 O 糖基化修饰,具体信息详见表 8。

表 8 不同抗体类药物汇总

Table 8 Summary of different antibodies

抗体	类型	糖基化修饰
mAb1	全人源 IgG1 单克隆抗体	含 N 糖
mAb2	人源化 IgG1 单克隆抗体	不含 N 糖
mAb3	全人源 IgG2 单克隆抗体	含 N 糖
mAb4	人源化 IgG4 单克隆抗体	含 N 糖
mAb5	人源化 IgG4 单克隆抗体	含 N 糖
mAb6	IgG1 的 Fc 融合蛋白	含 N 糖,O 糖
mAb7	IgG2 的 Fc 融合蛋白	含 N 糖
mAb8	抗体偶联药物	含 N 糖

通过 2.2.1 方法测定,结果如图 6 所示,除 mAb2 和 mAb8 以外,所有其他抗体在我们优化的 BAC 条件下均实现了非糖化和糖化组分的有效分离。mAb2 显示两个色谱峰,但是色谱峰有明显的后移,这可能是

由于其糖基化位点经过突变,导致缺乏糖基化修饰而增加了疏水性,NaCl 浓度较高,现有条件不能充分抑制其较强的疏水相互作用,但不影响糖化组分的分离及检测。至于 mAb8,由于其偶联疏水性药物,其疏水性更强,糖化和非糖化组分未能有效分离,需要进一步有机溶剂的添加,从而达到进一步分离(数据未提供)。

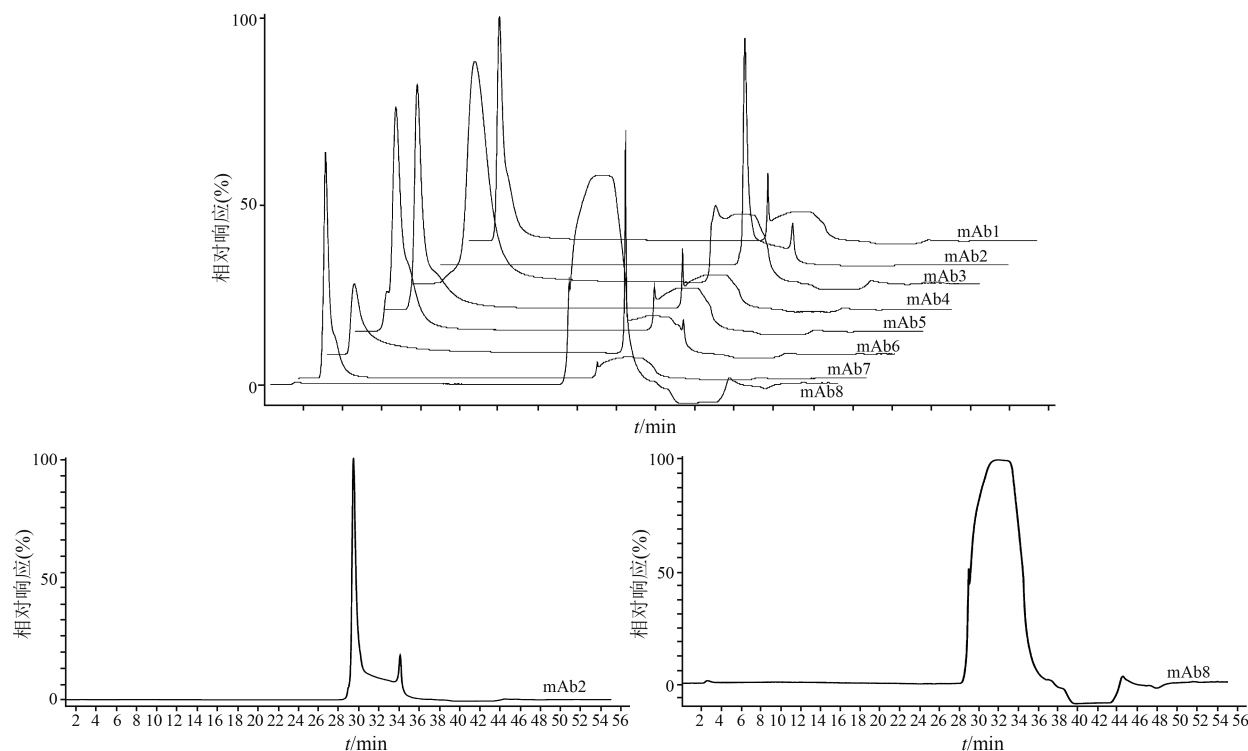


图 6 BAC 方法普适性

Fig. 6 Universality of the BAC method

总结来说,我们改进的 BAC 糖化分析方法适用于绝大多数抗体类药物。然而,对于那些具有较高疏水性的抗体偶联药物,可能还需要进一步的优化。此外,为了确保检测方法的精确性,建议结合质谱等技术对方法进行确认/验证。

3 结论

糖化是一种普遍的翻译后修饰过程,它在药物的生产和存储过程中普遍发生。BAC 因其操作简便、成本低廉等优点,成为实验室常用的分析糖化修饰的方法。然而,现有方法在准确检测英夫利西单抗的糖化上存在一定挑战。本研究针对这一问题,通过综合考虑各种影响因素,成功建立了一个基于 BAC 的英夫利西单抗糖化分析新方法。相较于其他抗体药物,英夫利西单抗与硼酸亲和柱之间的配基相关的非特异性相互作用干扰了糖化与非糖化组分的有效分离,从而限制了传统方法的适用性。为了确认新方法的准确性,我们还采用了基于质谱的快速 MAM 进行方法学性能确认,通过一系列的系方法学验证,证明了该方法的准确性、精密度和稳定性等。此外,我们的研究结果表明,该方法对于包括 Fc 融合蛋白在内的其他多数抗体药物也具有较好的普适性。尽管如此,对于一些特殊的抗体药物,如抗体药物偶联物(Antibody-drug conjugates, ADCs),该方法可能仍需进一步的优化。

综上所述,我们开发的基于 BAC 的改良糖化分析方法不仅完善了英夫利西单抗等药物的糖化修饰质控(Quality control, QC)分析,而且对于提升 QC 实验室的工作效率和方法的推广应用都具有重要价值,对于药物前期开发和放行质量控制也有着积极的促进作用。

参 考 文 献

- [1] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2021, 20(7): 491-495.

- [2] YE H, LIU S, XU J, et al. Efficacy and Safety of CMAB008 Compared with Innovator Infliximab in Patients with Moderate-to-Severe Rheumatoid Arthritis Receiving Concomitant Methotrexate; A Randomized, Double-blind, Multi-center, Phase III Non-inferiority Study [J]. *Rheumatol Ther*, 2023, 10(3): 757-773.
- [3] SHI Y, LI J, XU J, 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 Commun (Lond)*, 2019, 39(1): 28-34.
- [4] LIU S, LIU X. IgG N-glycans [J]. *Adv Clin Chem*, 2021, 105: 1-47.
- [5] 王梦荷,郑路,孟领航,等. O-GlcNAc糖基化修饰的研究进展 [J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2024, 37(1): 92-101.
- [6] LIU T, XU J, GUO Q, 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.
- [7] 汪泓,尹红锐,陈益乐,等. 治疗类糖蛋白的糖基化分析 [J]. *药学报*, 2021, 56(10): 2779-2786.
- [8] SHRIVASTAVA A, JOSHI S, GUTTMAN A, et al. N-Glycosylation of monoclonal antibody therapeutics; a comprehensive review on significance and characterization [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1209: 339828.
- [9] MELO-BRAGA M N, CARVALHO M B, FERREIRA M C E, et al. Unveiling the multifaceted landscape of N-glycosylation in antibody variable domains; Insights and implications [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 257(Pt 1): 128362.
- [10] ZHANG B, YANG Y, YUK I, et al. Unveiling a glycation hot spot in a recombinant humanized monoclonal antibody [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(7): 2379-2390.
- [11] AWOTWE-OTOO D, AGARABI C, READ E K, et al. Product and process understanding to relate the effect of freezing method on glycation and aggregation of lyophilized monoclonal antibody formulations [J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015, 490(1/2): 341-350.
- [12] 王文波,夏喜杰,武刚,等. 单抗药物的糖化修饰及其影响 [J]. *中国药事*, 2023, 37(02): 231-238.
- [13] WEI B, BERNING K, QUAN C, et al. Glycation of antibodies: modification, methods and potential effects on biological functions [J]. *mAbs*, 2017, 9(4): 586-594.
- [14] BANKS D D, HAMBLY D M, SCAVEZZE J L, et al. The effect of sucrose hydrolysis on the stability of protein therapeutics during accelerated formulation studies [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 98(12): 4501-4510.
- [15] KENNEDY D M, SKILLEN A W, SELF C H. Glycation of monoclonal antibodies impairs their ability to bind antigen [J]. *Clin Exp Immunol*, 1994, 98(2): 245-251.
- [16] GOETZE A M, LIU Y D, ARROLL T, et al. Rates and impact of human antibody glycation in vivo [J]. *Glycobiology*, 2011, 22(2): 221-234.
- [17] HEVÉR H, DARULA Z, MEDZIHRADSKY K F. Characterization of Site-Specific N-Glycosylation [J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1934: 93-125.
- [18] PRIEGO CAPOTE F, SANCHEZ J C. Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins [J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2008, 28(1): 135-146.
- [19] LIU T, GUO H, 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] 李涛,张睿,聂纪豪,等. 4-乙烯基苯硼酸聚合物纳米材料的制备及其在果糖检测中的应用 [J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2022, 35(4): 83-89.
- [21] ESPINA-BENITEZ M B, RANDON J, DEMESMAY C, et al. Back to BAC: Insights into boronate affinity chromatography interaction mechanisms [J]. *Separation & Purification Reviews*, 2017, 47(3): 214-228.
- [22] AN Q, ZHENG Y, ZHAO Y, et al. Physicochemical characterization and phase I study of CMAB008, an infliximab biosimilar produced by a different expression system [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 791-805.
- [23] SHEALY D J, CAI A, STAQUET K, et al. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor α [J]. *MAbs*, 2010, 2(4): 428-439.
- [24] HU S, LIANG S, GUO H, et al. Comparison of the inhibition mechanisms of adalimumab and infliximab in treating tumor necrosis factor α -associated diseases from a molecular view [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(38): 27059-27067.
- [25] LIANG S, DAI J, HOU S, et al. Structural basis for treating tumor necrosis factor α (TNF α)-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(19): 13799-13807.
- [26] SU Y, LI J, WANG C, et al. Population pharmacokinetics of CMAB008 (an Infliximab Biosimilar) and Remicade(®) in healthy sub-

- jects and patients with moderately to severely active rheumatoid arthritis [J]. *Adv Ther*, 2023, 40(3): 1005-1018.
- [27] ZHOU R, CHEN Q, HOU S, et al. A Randomized, double-Blind, parallel controlled, single-dose phase I study comparing the pharmacokinetics, safety, and immunogenicity of the infliximab biosimilar CMAB008 and the reference product in healthy Chinese male subjects [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2022, 11(9): 1028-1035.
- [28] DOCUMENT B, COMMITTEE F T A A. CT-P13 (infliximab biosimilar) [Z]. FDA Advisory Committee Briefing Document, 2016.
- [29] MARTIN S M, ZABOROWSKA I, JAKES C, et al. Comparability study for the determination of post-translational modifications of infliximab innovator and biosimilars by automated high-throughput peptide mapping analysis [J]. *Thermo Scientific Application Note*, 2018: 21849.
- [30] PISUPATI K. Stability and structural analysis of hGH and infliximab for controlled release depots and biosimilars [D]. University of Michigan, Horace H. Rackham School of Graduate Studies, 2016.
- [31] LIU T, LI Y, XU J, et al. Mass spectrometry-based multi-attribute method for mutation analysis in the early development of therapeutic proteins [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 220: 115018.
- [32] 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]. *药学报*, 2020, 55(9): 2092-8.
- [33] T G I H. Validation of Analytical Procedures Q2 (R2) [M]. ICH: Geneva, Switzerland, 2023.
- [34] H G I C H. Analytical Procedure Development Q14 [M]. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Geneva, Switzerland, 2022.
- [35] BRADY L J, MARTINEZ T, BALLAND A. Characterization of nonenzymatic glycation on a monoclonal antibody [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(24): 9403-9413.
- [36] VISKI K, GENGLICZKI Z, LENKEY K, et al. Parallel development of chromatographic and mass-spectrometric methods for quantitative analysis of glycation on an IgG1 monoclonal antibody [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1032: 198-204.
- [37] QUAN C, ALCALA E, PETKOVSKA I, et al. A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior [J]. *Anal Biochem*, 2008, 373(2): 179-191.
- [38] ZHANG B, MATHEWSON S, CHEN H. Two-dimensional liquid chromatographic methods to examine phenylboronate interactions with recombinant antibodies [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(30): 5676-5686.
- [39] STRICKLIN G P, WELGUS H G. Human skin fibroblast collagenase inhibitor. Purification and biochemical characterization [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1983, 258(20): 12252-12258.
- [40] MYÖHÄNEN T A, BOURIOTIS V, DEAN P D. Affinity chromatography of yeast α -glucosidase using ligand-mediated chromatography on immobilized phenylboronic acids [J]. *Biochemical Journal*, 1981, 197(3): 683-688.
- [41] WILLIAMS G T, JOHNSTONE A P, DEAN P D. Fractionation of membrane proteins on phenylboronic acid-agarose [J]. *Biochemical Journal*, 1982, 205(1): 167-171.
- [42] GOULD B J, HALL P M. m-Aminophenylboronate affinity ligands distinguish between nonenzymically glycosylated proteins and glycoproteins [J]. *Clinica Chimica Acta*, 1987, 163(2): 225-230.
- [43] LI Y, LARSSON E L, JUNGVID H, et al. Shielding of protein-boronate interactions during boronate chromatography of neoglycoproteins [J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 909(2): 137-145.
- [44] ZHANG Q, SCHEPMOES A A, BROCK J W, et al. Improved methods for the enrichment and analysis of glycated peptides [J]. *Anal Chem*, 2008, 80(24): 9822-9829.
- [45] TAKÁTSY A, BÖDDI K, NAGY L, et al. Enrichment of Amadori products derived from the nonenzymatic glycation of proteins using microscale boronate affinity chromatography [J]. *Anal Biochem*, 2009, 393(1): 8-22.

(责任编辑:刘庆松)