

创新的LC/MS系统方案改进剖析蛋白质类生物药物的工作流程

Asish B. Chakraborty, Hongwei Xie, St John Skilton, John C. Gebler, and Weibin Chen
Waters Corporation

在生物药物开发过程中，需要进行大量的分析检测来进行生物分子的确证。由于生物药物固有的复杂性，剖析大分子比小分子要困难得多。因此，为了满足法规要求、保护知识产权或者在工艺改变时进行比较研究，需要使用大量的仪器方法来完全确证生物大分子药物。

剖析复杂的生物药物的关键在于对现有的不同分析技术联合使用，根据生物分子特定的理化性质进行分析。由于剖析生物分子的过程包含多种分析方法，因此需要一套整体的工作流程来可靠地采集生物分子的相关信息。这样的流程不仅包括高性能的仪器，还需要生物信息学软件技术，以便在常规分析中获得全面的的确证数据。



由于LC/MS能够揭示生物药物的结构和稳定性，因此该技术对更深层次剖析生物药物有非常重要的作用。LC/MS的分析结果可用来证明生物药物产品的质量好坏，产品是否一致，还可以确证是否为目的蛋白，或者是不需要的蛋白质变异体。结构分析对生产过程的监控尤为重要，这是因为在优化工艺的过程中，微小的变化都可能对蛋白质的结果产生影响。而且，每一个化学家都知道，在进行蛋白质药物制剂的开发时，如何确保药物具有足够的稳定性是很有挑战性的，因为蛋白药物中的大量的官能团很容易发生化学降解。

沃特世为剖析生物药物提供完整的、一站式服务的分析方案。我们投入大量的资源充分且深入地了解生物制药行业的应用需求，为提高研究者发现和生产治疗用生物药物的能力进行有针对性的技术创新，开发了能够针对生物制药市场应用的LC与MS解决方案。而且，沃特世专注于将高性能的仪器系统和软件整合在一起，满足实验室目前的分析需求，同时还能满足实验室未来的需求，这样的方案同以拼装单独的模块仅能满足眼前的需求是截然不同的。

本文将重点介绍两个独特的LC/MS系统应用方案：完整蛋白质谱分析和肽图分析，用于人源化单克隆抗体（mAb）的确证，检测单抗的细微变化。每一个应用方案都包括整体的工作流程（图1）的介绍。

此工作流程具有如下特点：将沃特世的系统方案无缝地整合在一起，包括能够同时提升分离度、灵敏度和分析速度的超高效液相色谱（UPLC®），专用色谱柱，提供灵敏且精确质量的MS，MSE和MS/MS检测的Xevo™ QToF MS系统和行业领先的生物制药信息学软件。将上述方案在此工作流程中联合使用可极大地提高实验室效率。

下面的每一部分都是剖析人源化单克隆抗体的分析操作，您可以充分体会到即使不是质谱专家或者没有质谱背景的科研人员，也能在常规分析中得到高质量数据信息。



图1 沃特世LC/MS工作流程概述：从样品制备到数据分析。仪器与软件的配合将每个步骤无缝连接起来

完整蛋白质谱分析

确认不同生产批次单克隆抗体之间的差异

LC/MS联用为进行生物药物开发的科学家提供详细、精确且容易解读的信息。例如，通过一个快速的LC/MS完整蛋白质谱分析可以帮助确定该生物分子是否进行了正确的表达以及是否发生了翻译后修饰；通过LC/MS完整蛋白质谱分析还可得到蛋白质非均一性的整体情况以及不同糖型的相对含量。

完整蛋白质谱分析可用于对照相似的细胞系在可对比的条件下表达出来的不同单抗的糖型差异。了解蛋白药物的糖型分布可以节省药物开发时间，降低成本。对于最终的蛋白质药物，完整蛋白质谱分析可以快速方便地对蛋白质进行鉴定。能够提供蛋白质药物在整个生产过程中的对比结果，并证明其具有可比性，是满足法规要求，拿到生产批文的关键因素。

在蛋白药物开发过程中，完整蛋白质谱分析的价值在很大程度上取决于分析方法的效率：

- LC系统必须能够在需要的时候对复杂蛋白混合物提供良好的分离；如果需要纯蛋白样品进行快速分子量分析，LC系统需要能够有效地从不同样品和不同基质的样品中去除干扰MS分析的物质
- 用于完整蛋白质谱分析的MS系统需要容易使用，灵敏度高，且质量范围宽，以便对不同大小的蛋白分子量进行精确检测
- 更重要的是，由于完整蛋白的质谱图通常呈多电荷分布，研究者需要高效的信息学软件工具，该软件能够自动且准确地将多电荷质谱图转换为零电荷蛋白质量，并提供不同蛋白异构体的丰度相关信息

虽然完整蛋白质谱分析是一个很普通的分析，高效的工作流程依然是十分必要的。这个工作流程需要能够采集高性能的LC/MS数据并进行数据处理。只有这样，完整蛋白分子量分析才容易操作，常规分析即可获得高品质的信息来支持药物开发。

以前由于缺乏容易使用的软件工具，完整蛋白质谱分析和后续的数据解析主要由LC/MS专家来进行。如果没有极好的经验与知识，研究者将很难获得数据，更不用说将原始数据转化为有用的信息了。

沃特世最近推出的完整蛋白质谱分析方案完全改变了这种局面，我们为非LC/MS专业人员设计了一套整体的针对完整蛋白质谱分析的工作流程，此方案包括UPLC色谱分离、蛋白分离柱/脱盐柱、Xevo QToF MS进行精确质量检测，以及BiopharmaLynx™软件用于进行数据分析。

下面将通过具体应用实例介绍这套工作流程的使用，我们对人源化单克隆抗体（IgG1）进行了完整蛋白质谱分析，分析目的是评估多种IgG治疗抗体药物的不同糖型，样品仅仅需要进行快速的在线脱盐处理。下面是具体的实验：

实验部分

样品（IgG1）

人源化单克隆抗体样品存储在缓冲液中（21.0mg/mL），将此样品用50mM的碳酸氢铵稀释至0.5mg/mL后进行完整蛋白质谱分析。

LC条件

LC系统：	沃特世 ACQUITY UPLC系统
色谱柱：	MassPREP™ Micro 脱盐柱2.1 x 5 mm, 20 µm, 1000Å
流动相A：	0.1% 甲酸（水）
流动相B：	0.1% 甲酸（乙腈）

流速: 0.2 mL/min
柱温: 完整IgG蛋白为80°C
梯度: 1.5分钟内B的比例从10升至90% (总运行时间4分钟), 样品为完整单抗

MS条件

MS系统: 沃特世 Xevo QTof MS
离子化模式: ESI +
毛细管电压: 3.0 kV
锥孔电压: 45 V
脱溶剂气温度: 350°C
源温度: 120°C
脱溶剂气流速: 800 L/hr
数据采集范围: 600-4500 (m/z)

信息学/数据处理软件

基于MassLynx™ 软件平台的BiopharmaLynx应用程序管理器, 1.2版本

结果与讨论

当单抗等大分子蛋白进行电喷雾离子化时会形成多电荷离子, 图2A显示了一个生产批次IgG1的电荷分布质谱图。信号最强的峰带50个正电荷, 当我们更细致地查看图2A的右上角插入的带47个正电荷的峰的放大图谱时可发现它含有多个峰, 图2A中带不同电荷的每个峰都包含多个峰。图2B显示了将图谱通过MaxEnt1软件去卷积处理后的结果, 它清晰地显示了IgG1的糖基化非均一性。使用去卷积处理后得到的图谱才可以用来对照不同批次单抗的糖型变异。

图3显示了传统Q-ToF MS与Xevo QTof MS对同一个IgG1进行完整蛋白分析得到的质谱图, 两个图谱都显示了多电荷离子峰分布。尽管两个图谱很相似, 但可以看出Xevo QTof MS的灵敏度比传统的QTof高6倍。

完整蛋白质谱分析方案可用于评估单抗药物多个生产批次的糖型差异, 多批次IgG间的比较需要快速分析大量样品, 所用的方法必须能够在较短时间内提供可以直观地说明所生产的蛋白药物具有可比性。

在线脱盐LC/MS方法¹与BiopharmaLynx联合使用即可达到此要求, Xevo QTof MS在短短的4分钟运行时间即可完成数据采集, 然后通过BiopharmaLynx软件内包含的MaxEnt1算法自动对采集到的大数据组进行处理。通常125次连续进样采集到的数据 (8 小时数据采集时间), BiopharmaLynx在30分钟内即可完成数据处理, 并生成可用信息。与手

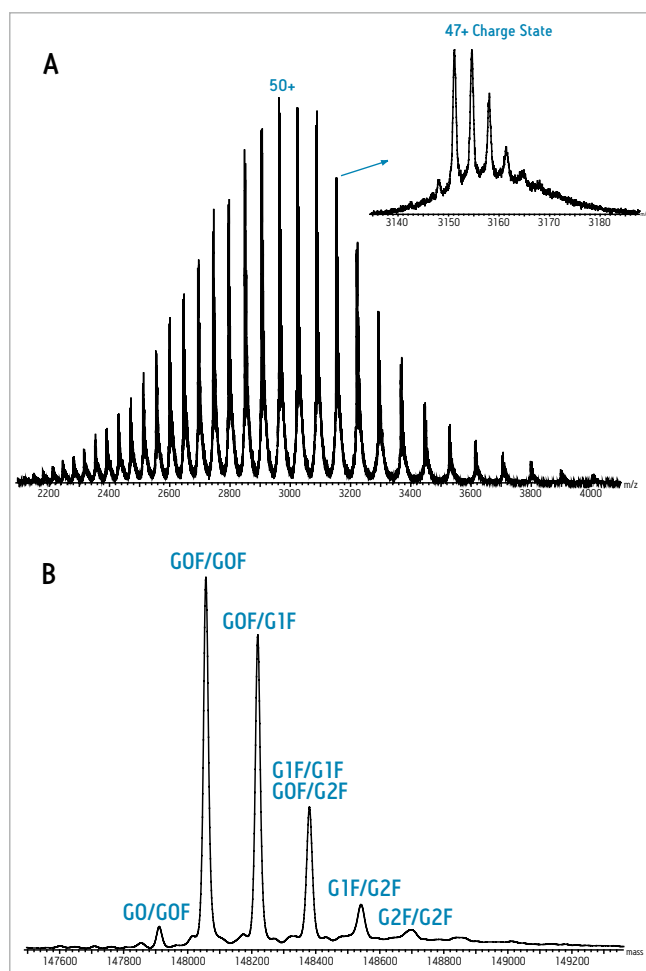


图2 (A) 完整IgG1的ESI-QTOF质谱图 (0.5 µg上样量), 在2100-4100 m/z范围的多电荷质分布谱图, 信号最强的峰带50个正电荷。右上角是带47个正电荷峰的放大图谱, 可以查看细节, 在MaxEnt1进行去卷积处理前就可发现此蛋白抗体至少有6种主要的变异体。(B) 完整IgG1的MaxEnt1去卷积质谱图, 可以知道所发现的主要变异体来源是多聚糖的非均一性

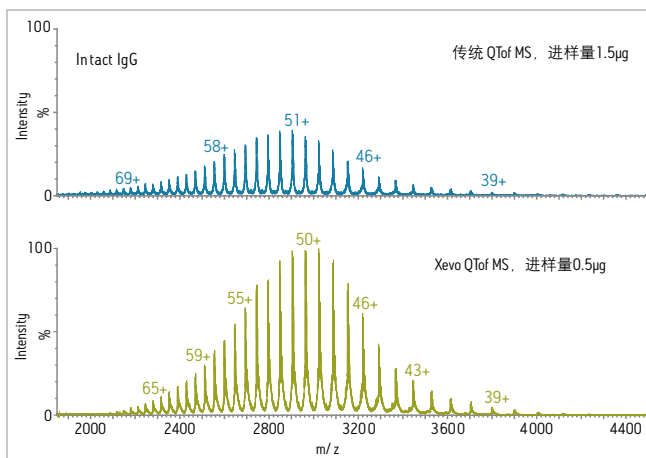


图3 Xevo QTof MS 分析完整蛋白的灵敏度比传统的串联四极杆飞行时间质谱高6倍

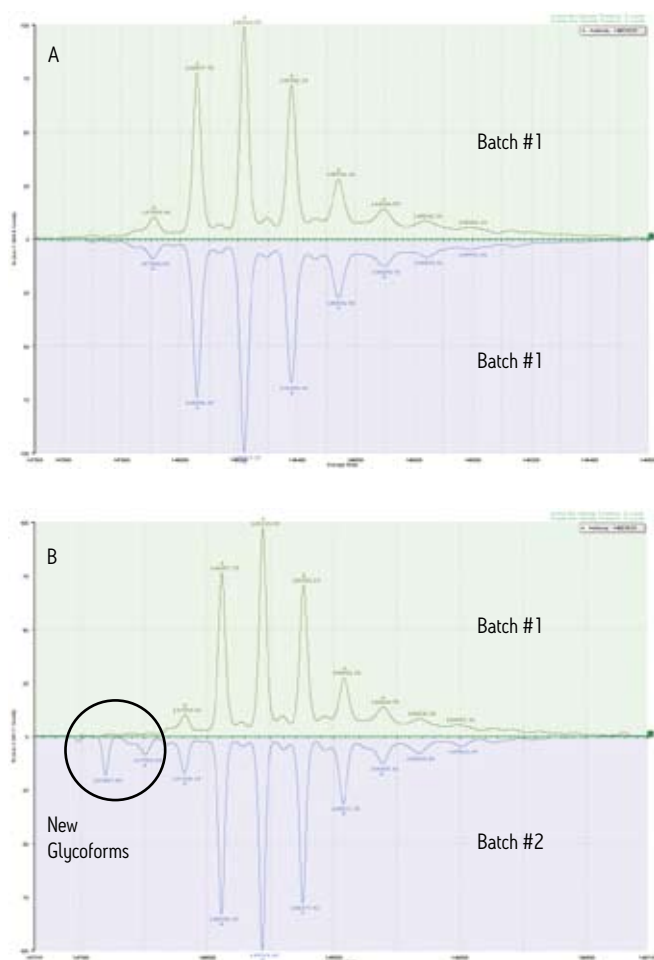


图4 (A) 经MaxEnt1进行去卷积处理后的同一批次样品重复进样的质谱图对比 (B) 经MaxEnt1进行去卷积处理后两批相似样品的质谱图对比。在#2批次中可以看到两种丰度较低的新的糖型

工去卷积的操作相比，BiopharmaLynx软件自动进行参数设置，可适配每个单独的数据文件。另外，大的数据组可设定统一的参数进行处理，避免了人为偏差。

图4A为镜像作图，显示了同一生产批次的IgG1去卷积图谱的对照情况。BiopharmaLynx独有的交互性浏览界面可将一对数据组（色谱图或质谱图）上下叠放或者以镜像排布以方便目测对比检查。此外，数据经处理后还可通过表格提供完整蛋白的相关信息如糖型变异体丰度。

使用软件的对照功能可快速得到多个样品与已确证的对照品的对比结果，同时自动为生成直观易读的报告。由于图4A的两组数据来自同一生产批次的IgG，理论上应该没有差异，实际的对比结果同预计结果一致。而图4B的两个不同批次的IgG1的去卷积图谱中可以发现一些糖基化的细微差异，并且进行了标记。

本文以人源化单克隆抗体的分析为例介绍了沃特世LC/MS分析完整蛋白的通用工作流程，耐用且可靠的超高

效液相色谱系统如ACQUITY UPLC系统，高灵敏度的质谱Xevo QTof MS系统以及自动化数据处理、注释的软件BiopharmaLynx起着关键的作用。生物制药企业可以得到全面的信息，从而缩短药物从开发、生产到上市的时间。

肽图分析

LC/MS与单抗微小变化的检测

肽图分析是剖析生物药物非常关键的技术，它提供生物分子的全面信息。肽图分析的应用包括根据肽片段的洗脱模式鉴定蛋白质、确定翻译后修饰、遗传稳定性，与质谱联用可以用来确定蛋白质的序列。

典型的肽图分析工作流程如下：蛋白首先通过胰蛋白酶或其他蛋白酶水解得到肽段混合物，经液相色谱分离后（多数为反相LC），再通过UV/VIS或质谱进行检测。与传统的LC-UV/VIS方法相比，LC/MS分析显著提高了肽图分析的信息量和内容：MS检测可区别色谱分离中发生“共流出”的肽段，MS/MS可用于识别低丰度的修饰并确定其修饰化位点以及个别氨基酸的变异。

虽然LC/MS肽图分析是检测和识别蛋白质类药物微小变化的有效工具，许多机构仍然致力于开发可靠且重复性好的分析流程。样品制备不善，色谱分析方法不对，分离度差，检测技术不适合以及使用耗时的手工方式进行数据的注释都会弱化该技术的应用。

在充分理解LC/MS肽图分析实验的基础上，我们在完整蛋白质谱分析方案中提到的仪器系统是肽图分析的可靠工具，稳定耐用的工作流程可以极大地改进肽图分析结果。肽图分析流程如下：用RapiGest™ SF辅助蛋白质的酶水解过程，高分离度的ACQUITY UPLC进行肽段的色谱分离，Xevo QTof MS的MS^E技术进行所有洗脱肽段以及每个肽段相应的碎片离子的准确质量检测，以及使用BiopharmaLynx自动进行数据处理和解析。

本文通过单克隆抗体的强化降解研究这个具体的应用实例展示了上述工作流程的使用以及其有效性。通过研究确定了该单抗在N-端发生了脱酰胺，并得到了修饰的定量分析结果。

实验部分

样品制备

向单抗存储液中加入RapiGest SF（最终浓度0.05%），样品加热至60℃并保持30分钟以使蛋白变性。随后在蛋白溶液中加入10 mM DTT，在60℃下还原30分钟，然后在避光条件下加入13 mM IAA烷基化进行碘乙酰胺化，反

应45分钟。加入胰蛋白酶进行水解，在37℃水解4个小时（胰蛋白酶/蛋白=1:50）。水解完成后加入1 M NH₄OH将pH调节到-9。最后将水解产物等分成5份，分别在60℃孵育0, 5, 10, 30与60分钟。每份使用95:5水/乙腈（含有0.1%甲酸）稀释至1.5 pmol/μL，进行LC/MS^E分析。

LC条件

LC系统：沃特世ACQUITY UPLC系统
 色谱柱：ACQUITY UPLC C₁₈ BEH300,
 1.7μm, 2.1 x 150 mm
 流动相A：0.1%甲酸（水）
 流动相B：0.1%甲酸（乙腈）
 流速：0.2 mL/min
 柱温：60℃
 梯度：90分钟内B液比例从1%升至40%

MS条件

MS系统：沃特世 Xevo QToF MS
 离子化模式：ESI +
 毛细管电压：3.0 kV
 锥孔电压：25 V
 脱溶剂气温度：350℃
 源温度：105℃
 脱溶剂气：800 L/小时
 数据采集范围：50-1990 (m/z)
 碰撞能量：低 4 V；高, 15-45 V

信息学/数据处理软件

基于MassLynx™ 软件平台的BiopharmaLynx 应用程序管理器，1.2版本

为了获得重复性好的肽图分析结果，在分析中对目标蛋白的酶水解过程必须高度一致并且重复性好，RapiGest SF是保证酶水解一致性的最佳选择。它是一种与质谱完全兼容的表面活性剂，可将蛋白质变性却不会对蛋白酶的活性产生影响。在酶水解过程中使用RapiGest后就不再需要使用任何其它的诸如尿素或盐酸胍等变性剂，尿素或盐酸胍可导致严重的多肽修饰，抑制胰蛋白酶的活性。RapiGest在肽图分析中的应用优势和相关资料请参考文献²。使用RapiGest后可在4小时内将蛋白质完全水解，这解决了使用传统酶水解方法时发生脱酰胺的问题³。

肽图分析的目的是将所有肽段都分离成单个的峰。由于蛋白质酶水解物非常复杂，肽图分析在色谱分离中是非常有挑战性的。通常进行肽图分析需要使用长时间

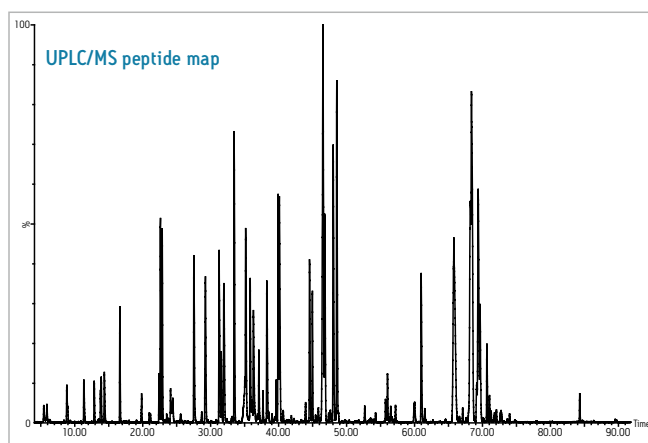


图5 单抗经胰蛋白酶水解后的肽图分析图谱（总离子流图），使用ACQUITY UPLC/Xevo QToF MS液-质联用系统，进样量为10 pmol单抗酶水解液

的缓梯度，大量的应用实例表明UPLC可在不同的应用领域同时提高分离度、分析速度与灵敏度，使用UPLC进行肽图分析可以获得比其它方法更高的分离度，同时灵敏度更高⁴。另外，UPLC用于糖肽分析可以获得非常好的峰形，且对于脱酰胺肽有很高的分离度⁵。

图5是UPLC用于单抗的肽图分析结果，可以得到很好的分离度，峰容量高，所得到的峰宽平均在9秒左右（半峰高处）。

在肽图分析中用质谱进行检测对于获得蛋白质药物全面详细的修饰信息非常重要，而且通过很简单的操作即可实现。LC/MS中的一级质谱数据尽管可以在一定程度上用于多肽鉴定，但只进行简单的分子量测定不能够区分分子量相同的肽段。还有，仅仅通过一级质谱数据来判断修饰位点是非常困难的，特别是当发生的修饰没有造成质量差别或者修饰后质量变化极小的情况时则根本不可能。

利用MS/MS技术产生的碎片离子质谱数据可以进行详细的序列分析以及确定修饰位点，只有采集到精确质量的质谱数据才可以确证蛋白质的结构信息，避免不清晰或错误的结果。因此，高分辨率、高质量精度的串联质谱系统对肽图分析有非常明显的优势。Xevo QToF MS是高灵敏度的串联四极杆飞行时间MS/MS系统，可提供高精度的MS或MS/MS信息，是肽图分析的理想工具。该系统秉承了沃特世“Engineered Simplicity™(工程精简)”的设计理念，容易使用，调谐、校正以及系统状态监测全部由软件自动完成，即使您不是质谱专家也依然可以得到可靠的分析结果。

传统获取MS/MS数据的方法是首先人工选择一些肽片段，然后通过Data-dependent Acquisition（又称DDA，基

于数据或以数据为导向)的采集方法获得。在DDA方法中,通常选择强度高的一级母离子肽段进行MS/MS获取碎片离子信息,这样就会丢掉低信号强度的肽段的MS/MS碎片离子信息。由于蛋白质药物通常会存在微小的变异或者修饰,丢失掉这些低丰度肽段的可能性很大。

沃特世MS^E技术可以解决上述DDA存在的问题,这有很重要的意义。MS^E技术使用高低碰撞能量快速切换的方法,一个色谱峰可同时得到一级母离子和该母离子的MS/MS碎片离子信息^{6,7}。在肽图分析中,UPLC分离出来的所有肽段的色谱峰都会进行MS/MS碎裂,不需要选择一级离子,因此,MS^E可在没有任何样品信息的情况下提供完整的MS一级离子和MS/MS碎片离子信息,对所有电荷状态的峰都如此⁸⁻¹¹。这意味着肽图分析过程是系统性的,没有任何偏差,且每次都能得到一致的结果。从另一个角度来讲,MS^E技术还意味着如果我们需要了解蛋白质药物更多的信息,我们只需要调出该样品的历史数据进行分析即可,完全不需要再重新准备样品,这可为实验室节约成本、时间与资金投入。

图6A是胰蛋白酶水解的肽段和经强化降解后的肽段经软件处理(去同位素、去电荷并居中)后的肽段(HT36, 1161.62 Da)以及该肽段经脱酰胺后的肽段(1162.61 Da)的MS图谱。上面的图谱是没有经过破坏的单抗样品图谱,下面的图谱为pH 9.0破坏60分钟(60°C)的单抗样品图谱,两种肽段的相对强度比值约为500。

BiopharmaLynx的图示界面包含三种信息:(1)肽段HT1 pt6和脱酰胺HT36肽段的质量归属,(2)每个酶水解单抗中的脱酰胺化的HT36肽段的相对量,(3)两个不同条件的酶水解单抗的N-端脱酰胺肽段的丰度差别。更为重要的是,HT36脱酰胺肽段以及其脱酰胺化通过MS^E获得的MS/MS碎片离子数据进行了进一步的确认。

由于在分析过程中和数据采集时不需要选择一级离子,HT36肽段及其脱酰胺化肽段的MS/MS数据可同时采集到,尽管两种离子的强度有很大不同。图6B显示了HT36肽段和一个脱酰胺化的异构体。MS^E图谱中的b系列离子的1道尔顿质量差别(经BiopharmaLynx处理)确认脱酰胺化发生在N-端天冬氨酸残基。

数据处理与注释常常是肽图分析工作流程的一个瓶颈,虽然质谱用于肽图分析的优势得到了认可,但质谱的离子化过程增加了数据解析和注释的难度。比如,肽段在离子化时往往带有多个电荷,不同的肽段在浓度相同的情况下质谱相应差异很大,而且肽段有可能发生源内碎裂。如果使用手工操作的方式对LC/MS中所有肽段的一级质谱数据和MS/MS数据进行解析和注释,将是一个非常耗时的工程,往往需要数月才能完成。

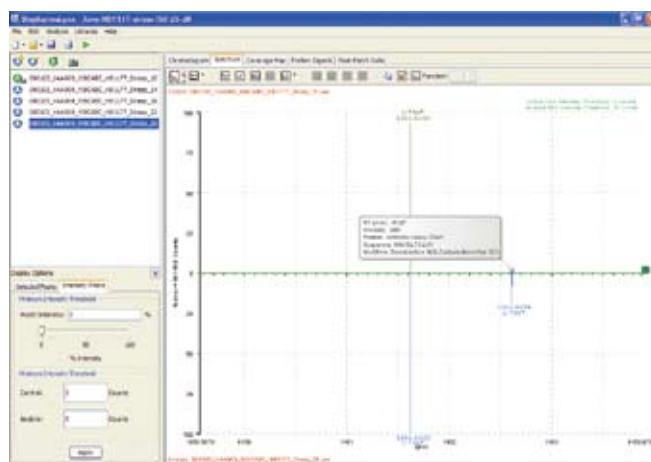


图6A 通过BiopharmaLynx 1.2计算的精确质量确认HT36肽段与N364-脱酰胺化HT36肽段。镜像图显示了样品不进行强化破坏以及破坏60分钟的对比结果

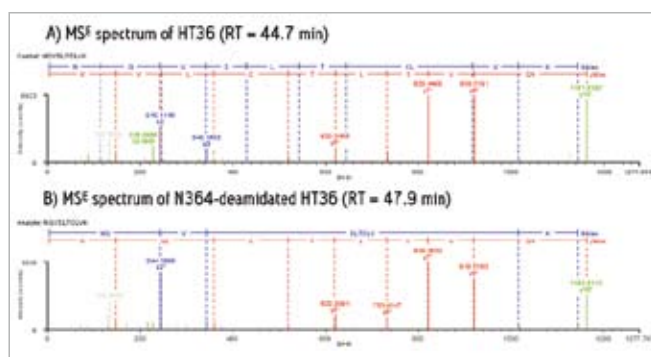


图6B 通过对比44.7分钟与47.9分钟的MS^E数据,确定HT36的N364-脱酰胺化,数据由BiopharmaLynx 1.2处理(请注意y10与b系列离子的不同)

BiopharmaLynx是基于MassLynx软件平台的专用数据处理工具,能够实现LC/MS肽图分析数据处理自动化。这极大地减轻了数据处理的重担,且能够更快地获得有用的信息,即使不是LC/MS分析专家也可以轻松获得所需的数据。不同进样采集到的多组数据可以使用一个处理方法进行处理,确认肽图谱中的所有离子,并提供样品内以及样品间的相对定量结果。根据LC/MS^E得到的精确质量数,BiopharmaLynx能够自动地将离子归属到预先输入的蛋白质序列中的理论肽段和修饰肽段,确定序列覆盖率,并通过MSE数据确定修饰肽段。

图7显示了HT36肽段以及其脱酰胺化的提取离子色谱图。未修饰的肽段在44.7分钟出峰,脱酰胺化的肽段分别在保留时间46.7和47.9分钟出峰,说明HT36片段的N-脱酰胺化有两种异构体分别是天冬氨酸和异天冬氨酸发生修饰。在保留时间47.0分钟处可以发现1道尔顿的质量差别,通过MSE数据确认为脱酰胺谷氨酰胺(Q)。

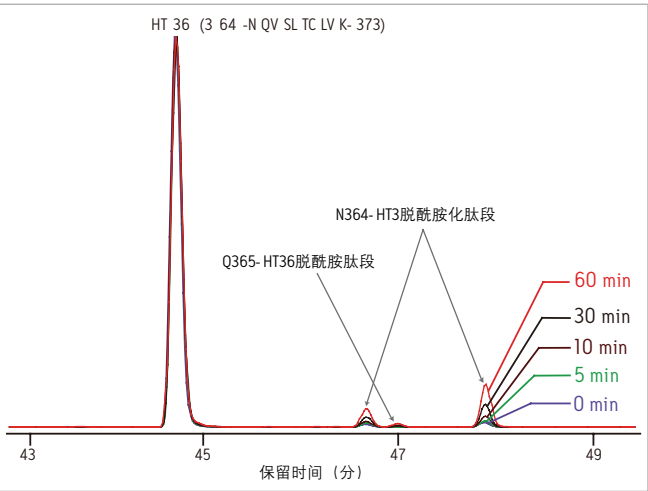


图7 样品抗体重链的T36与N364脱酰胺化的T36提取离子色谱图 (EIC) , 降解0-60分钟时间后的结果

HT36肽段的每个位点（包括未修饰的HT36）的修饰程度都可以通过BiopharmaLynx交互分析物对照表进行追踪，根据时间进行多个数据点的对照。举例来说，图8显示了N-脱酰胺化的HT36在保留时间约46.7分钟的数据表，该表提供了直接监测不同强化降解时间时酶水解液中N-脱酰胺化的进程。将BiopharmaLynx 自动处理0-60分钟破坏蛋白得到的HT36肽段和脱酰胺化的HT36得到的结果与传统的手工处理方法得到的结果进行对照，二者是完全一致的（图8）。与预计的一样，随着破坏时间的延长，N-脱酰胺化HT36的比例持续上升，未修饰的HT36下降。

强制降解研究的分析工作展示了一套完整的LC/MS肽图分析工作流程，可用于常规分析。如图8所示，使用此肽图分析流程可以非常方便地得到样品的全面信息。

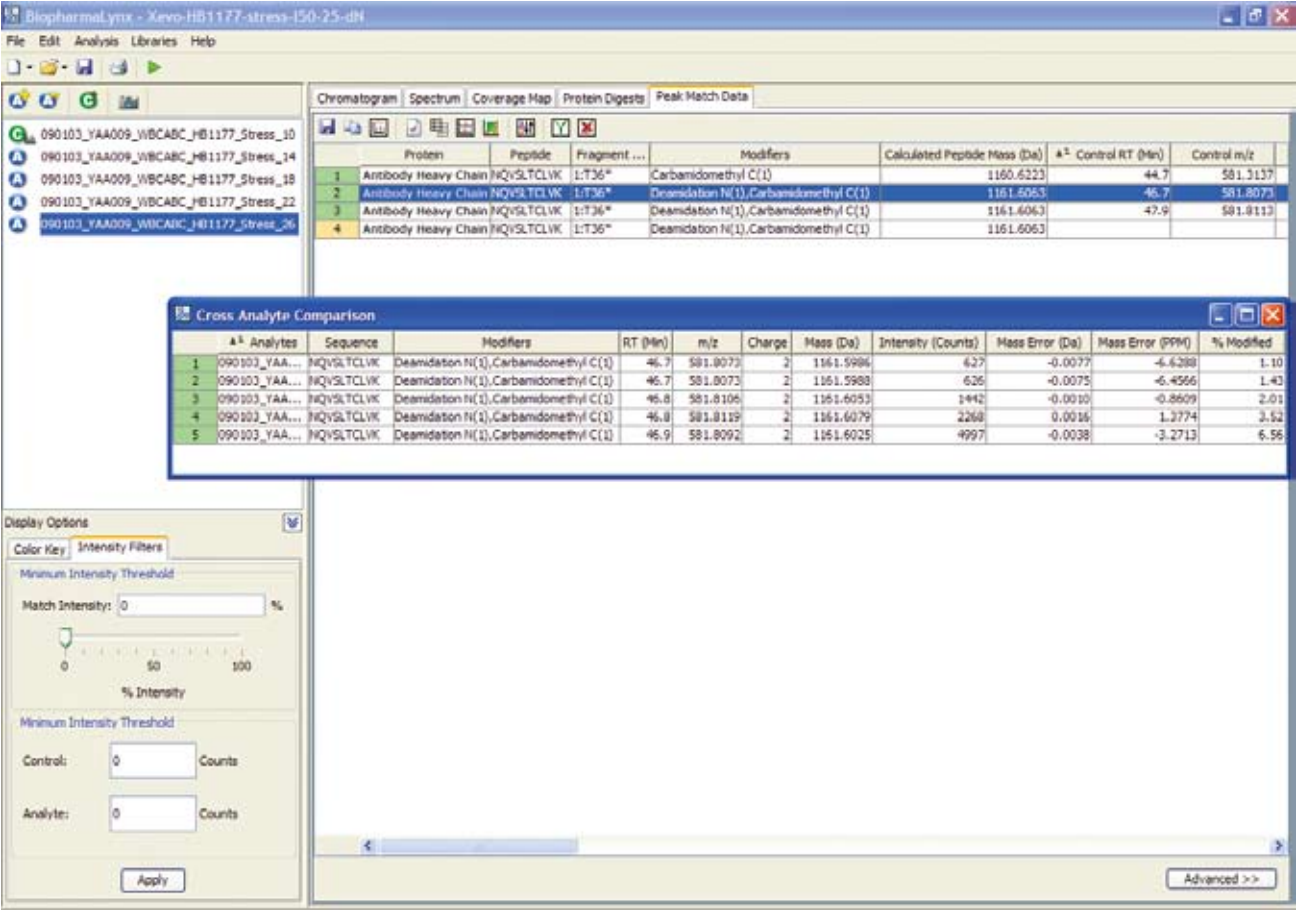


图8 多肽HT36样品脱酰胺过程，孵育时间0-60分钟，由BiopharmaLynx 进行监测

结论

一套真正好的仪器系统必须能够满足多种常规分析的要求。本文中我们通过具体的应用实例展示了饱含高性能仪器系统、色谱柱和生物信息学软件的整体系统解决方案，用于在常规分析中进行完整蛋白确证和肽图分析，不需要依赖任何专业研究者来操作质谱。整套系统融合了最理想的LC/MS工作流程，包括：

- ACQUITY UPLC提供最佳的分离度、灵敏度和分析速度
- 1.7 μm ACQUITY UPLC色谱柱经过生物分子肽与蛋白质进行质量控制，保证了结果的精确性和重现性
- Xevo QToF MS提供高灵敏度、精确质量的MS、MS^E与MS/MS检测
- BiopharmaLynx软件自动进行复杂数据的处理和分析

使用这套方案，用户可以得到更快地获得更加可靠的信息。此方案简单、直观且容易操作，为用户提供一致且全面的样品信息。因此，选择此方案能够剖析生物药物的工作变成常规分析，快速获得全面的样品信息，加快药物开发进程，保证生物药物的质量并保护知识产权。

参考文献

- [1] Rapid Profiling of Monoclonal Intact Antibodies by LC/ESI-TOF MS. Waters Corporation. 2007; 720002393en.
- [2] Yu YQ, Gilar M, Lee PJ, Bouvier ES, Gebler JC. Enzyme-friendly, mass spectrometry-compatible surfactant for in-solution enzymatic digestion of proteins. *Anal Chem.* 2003 Nov 1; 75(21): 6023-8.
- [3] Li X, Cournoyer JJ, Lin C, O' Connor PB. Use of 18O labels to monitor deamidation during protein and peptide sample processing. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2008 Jun; 19(6): 855-64. Epub 2008 Mar 5.
- [4] Mazzeo J, Wheat T, Gillece-Castro B, Lu Z. Next Generation Peptide Mapping with Ultra Performance Liquid Chromatography. BioPharm International, January 2006.
- [5] UPLC Technology for the Analysis of Antibody Glycopeptides. Waters Corporation. 2007; 720002382en.
- [6] Geromanos SJ, Vissers JP, Silva JC, Dorschel CA, Li GZ, Gorenstein MV, Bateman RH, Langridge JL. The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics.* 2009 Mar; 9(6): 1683-95.
- [7] Chakraborty AB, Berger SJ, Gebler JC. Use of an integrated MS—MS/MS data acquisition strategy for high-coverage peptide mapping studies. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007; 21(5): 730-44.
- [8] Bateman RH, Carruthers R, Hoyes JB, Jones C, Langridge JL, Millar A, Vissers JP. A novel precursor ion discovery method on a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer for studying protein phosphorylation. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2002 Jul; 13(7): 792-803.
- [9] Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, McKenna T, Nold MJ, Richardson K, Young P, Geromanos S. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal. Chem.* 2005; 77(7): 2187-200
- [10] Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ. Simultaneous qualitative and quantitative analysis of the *Escherichia coli* proteome: a sweet tale. *Mol. Cell. Proteomics* 2006 Apr; 5(4): 589-607.
- [11] Srebalus Barnes CA, Lim A. Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrom. Reviews.* 2007; 26(3): 370-88.

已发表的科学论文：“Rapid comparison of a candidate biosimilar to an innovator monoclonal antibody with advanced LC/MS technology” from mAbs 2:4, 1-16, July/August 2010; ©2010 Landes Bioscience

通过先进的LC/MS对仿制单抗药物和专利药物进行快速对比研究

Key words: biosimilar mAb, innovator mAb, molecular similarity, sequence variants, posttranslational modifications, N-linked glycosylation, chemical degradations, micro-heterogeneities, characterization, intact protein mass measurement, peptide mapping, glycan profiling, LC-MS, LC-fluorescence, MALDI MS

摘要：本研究展示了先进的液相色谱（LC）与质谱（MS）联用技术可用于快速确证抗体的氨基酸序列变化以及翻译后修饰（PTMs）的情况。本研究全面比较了一个IgG1单抗（mAb）生物“仿制药”和市场上可购得的专利药物的细微差别，我们从完整蛋白质量、蛋白质一级结构的氨基酸序列、翻译后修饰（PTMs），以及两种单抗的细微差异进行了细致的比较，并同时进行了定量分析。尽管两个抗体分子的氨基酸序列与修饰很相似，但通过完整蛋白质量检测的LC-MS结果发现两者存在质量差异，说明两者并不完全相同。进一步的肽图分析，通过独立数据采集的LC-MSE技术（即交替在低和高碰撞能量模式分别采集肽片段的母离子信息和碎片离子信息）采集到的LC-MS数据，确定了“仿制药”和专利药物的差异在于重链序列上的两个氨基酸；肽图分析还可用于对“仿制药”和专利药物的PTM差异进行全面地归类 and 对比。全面的多聚糖（Glycan）分析确认了两者间的糖基的比例不同，尽管其数量与种类相同。上述结果表明：精确的完整蛋白分析、多聚糖分析和LC-MSE肽图分析是全面对比“生物仿制药”和专利药物的有效工具。