

抗 CD33 单克隆抗体肽图分析方法的建立与验证

白露, 叶日平, 刘蒙蒙, 李雪琪, 张秀真, 赵永新(杭州多禧生物科技有限公司, 杭州 310018)

摘要:目的 建立抗 CD33 单克隆抗体肽图分析方法并对方法进行验证。方法 分别使用不同类型设备和不同流动相体系进行抗 CD33 抗体肽图检测。通过合成抗体 CDR 区域肽段进行特征肽段定位,并用质谱法对定位结果进行确认。以相对保留时间作为判断依据,根据《中国药典》2020 年版完成方法验证。结果 超高效液相色谱法(ultraperformance liquid chromatograph, UPLC)进行肽图检测比高效液相色谱法(high performance liquid chromatograph, HPLC)时间更短,三氟乙酸流动相体系相比甲酸流动相体系分离度更高。使用合成肽段的定位结果与质谱鉴定结果一致。方法专属性验证结果显示制剂空白、样品溶液空白对肽图特征峰检测无干扰,不同抗体肽图谱之间存在明显差异;重复性验证结果显示 6 份平行样品间特征肽段相对保留时间相对标准偏差(RSD)为 0.01% ~ 0.05%;中间精密性验证结果显示不同分析人员特征肽段相对保留时间 RSD 为 0.04% ~ 0.32%;耐用性验证结果显示不同酶处理条件[胰蛋白酶量为 $(1 \pm 0.2) \mu\text{g}$ 、酶解温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、酶解时间为 $(4 \pm 1)\text{h}$]特征肽段相对保留时间 RSD 为 0.02% ~ 0.09%,不同色谱条件[三氟乙酸占比 $(0.08 \pm 0.02)\%$ 、流速 $(0.3 \pm 0.05) \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、柱温 $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$]、不同批次色谱柱特征肽段相对保留时间 RSD 为 0.36% ~ 1.43%。样品溶液在 25 h 内检测,特征肽段相对保留时间 RSD 为 0.01% ~ 0.04%。结论 本研究采用合成肽段对液相肽图检测中的肽段进行定位,同时采用相对保留时间进行检测结果的判定,为生物药肽图检测提供了新的思路。

关键词:肽图分析;超高效液相色谱法;三氟乙酸;质谱

doi:10.11669/cpj.2024.16.007 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)16-1495-09

Development and Validation of A Method for Peptide Mapping of An Anti-CD33 Monoclonal Antibody

BAI Lu, YE Riping, LIU Mengmeng, LI Xueqi, ZHANG Xiuzhen, Zhao Yongxin(*Hangzhou DAC Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310018, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop and validate a peptide mapping method of an anti-CD33 monoclonal antibody. **METHODS** Different types of chromatographs (HPLC, UPLC) and different mobile phase systems (formic acid, trifluoroacetic acid) were used for peptide map detection of anti-CD33 antibody. The signature peptide segments were localized using synthetic CDR peptide of the antibody and the localization results were confirmed by mass spectrometry. Based on the relative retention time (RRT), the specificity, precision, and robustness of the method were validated according to the Pharmacopoeia of the People's Republic of China (ChP, 2020). **RESULTS** The separation time of the peptides by UPLC was shorter than that by HPLC, and the degrees of separation with trifluoroacetic acid in the mobile phase were higher than that with formic acid. The identification results of the signature peptide segment using the maps of synthetic peptide segments were consistent with the results of mass spectrometry. The specificity validation demonstrated that the formulation blank and sample solution blank did not interfere with the detection of signature peptide segments, and there were significant differences between peptide mapping results of different antibodies. The repeatability validation showed that the RSDs (RRT) of signature peptide segments between six parallel samples were 0.01% - 0.05%; the intermediate precision validation proved that the RSDs (RRT) of signature peptide segments for different analysts were 0.04% - 0.32%; the robustness validation exhibited that the RSDs (RRT) of signature peptide segments were 0.02% - 0.09% under different enzyme treatment conditions and 0.36% - 1.43% under different chromatographic conditions. Within 25 h in detection, the RSDs (RRT) of the signature peptide segments were 0.01% - 0.04%. **CONCLUSION** This study uses synthetic peptide segments for peptide localization in peptide mapping detection and uses relative retention time to determine the results, which provide a new approach for biopharmaceutical peptide mapping detection.

KEY WORDS: peptide mapping; UPLC; trifluoroacetic acid; MS

1975 年, Milstein 和 Kohler 创立了单克隆抗体的杂交瘤技术,并于 1984 年获得了诺贝尔生理学奖。1986 年,基于该技术的首款单抗药物 OKT3

(ortholone) 获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准。20 世纪 80 年代有 16 个抗体药物进入临床测试,而 2016 年以来

作者简介:白露,女,硕士,助理研究员 研究方向:抗体类药物的质量研究 Tel:(0571)56050590

每年至少 112 种抗体药物进入临床测试^[1]。2015 年 FDA 批准了第 50 款抗体药物,距首款抗体药物获批历时 29 年。2021 年 FDA 批准了第 100 款抗体药物,从第 50 款抗体药物到第 100 款抗体药物的获批,历时仅 6 年时间^[2]。随着生命科学领域前沿科学和生物工程技术的发展,单抗药物从药物发现、临床研究、商业化生产到获批上市的各个方面将在未来获得更快更高速的发展。

单克隆抗体是由 2 条完全相同的重链和 2 条完全相同的轻链构成的四聚体结构。在每条重、轻链中各有 3 个不连续的高变区负责与抗原互补结合,即互补决定区(complementarity determination region, CDR),分别被称为 CDR1、CDR2、CDR3。各 CDR 主要位于抗体的 Fab 区域,共同形成一个抗原结合位点。因此抗体间,尤其是基因工程抗体间的差异,主要体现在 CDR 区域的不同。不同于化学小分子药物,单抗药物的生产过程依赖生产细胞对目的基因的转率和翻译,如果该过程发生改变,可能使目的基因发生碱基置换、移码、缺失、插入等,导致抗体氨基酸序列发生改变,进而影响抗体质量。因此需要采用合适方法对抗体一级结构,尤其是 CDR 区域进行分析检测。在《中国药典》2020 年版的“人用重组 DNA 蛋白制品总论”和“人用重组单克隆抗体产品总论”^[3],人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH)的 Q6B^[4]以及美国 FDA^[5]均要求对抗体药物的一级结构进行质量控制。

目前肽图检测已广泛用于生物大分子药物的一级结构检测^[6],尤其是生物药的鉴别检测和降解监测,如氧化或脱酰胺的程度。与完整蛋白质分析不同,肽图检测能够提供生物分子翻译后修饰信息,尤其是在生产、加工和储存过程中可能发生的翻译和修饰,由于这些修饰可能会影响生物药的疗效,因此必须对其进行表征和控制。单克隆抗体经化学试剂或酶处理后,裂解为大小不一的肽段,经分离后获得肽段图谱。将获得的图谱与同步处理的参比品图谱比较,可用于抗体药物的放行鉴别。同时也可用于评价宿主细胞的遗传稳定性及抗体生产的批间一致性。但该方法无法获得肽段洗脱峰中各洗脱峰所代表的具体氨基酸序列。以往对重组人白细胞介素-11 的肽图研究中,可以通过收集肽段洗脱峰再用氨基酸测序仪进行序列分析,但该方法的工作量较大^[7]。抗体类药物由于氨基酸个数多,肽段复杂,通常使用质谱法进行肽段鉴定^[8-10]。此外,仅通过观察峰型判断肽图检测的结果是否“与对照图谱一

致”存在一定的主观性。有学者选择响应值较强的峰作为特征峰,将特征峰的保留时间作为判定标准。该方法虽然可以降低结果判定的主观性,但是当设备型号变更、方法转移或流动相比例、流速变动时,特征峰的保留时间会发生偏差,同时依据信号强度选择的特征峰也缺少代表性。

本研究以抗 CD33 单抗为例,首先比较了高效液相色谱法(high performance liquid chromatograph, HPLC)和超高效液相色谱法(ultra performance liquid chromatograph, UPLC),以及三氟乙酸和甲酸体系在肽图检测中的差异。根据抗体的氨基酸序列,合成了酶切处理后含有 CDR 序列的肽段,并以这些肽段作为标准品,定位液相肽图谱中各特征肽段位置,然后通过质谱的方法确认定位结果。最后以特征肽段的相对保留时间作为肽图检测结果的判断依据,建立了 UPLC 的肽图检测方法,并依据《中国药典》2020 年版 9101 分析方法验证指导原则,对方法的专属性、精密度和耐用性进行验证。

1 材料与方法

1.1 材料

人源化抗 CD33 单抗、单抗 B、单抗 C 由本实验室保存;肽段由金斯瑞生物科技股份有限公司合成;乙腈、三氟乙酸、甲酸为色谱级;尿素(99%);胰蛋白酶(测序级)[普洛麦格(北京)生物技术有限公司];二硫苏糖醇(DTT,99%)、碘乙酰胺(99%)、碳酸氢铵(分析纯);超高效液相色谱仪(型号:1290)、高效液相色谱仪(型号:1260)、色谱柱(型号:Advance-Bio Peptide,2.1 mm × 150 mm,2.7 μm)(美国安捷伦科技有限公司);Waters Acquity UPLC 质谱仪(型号:Xevo G2-XS QTOF,美国沃特世公司)。

1.2 方法

取 0.5 mg 单抗至 6 mol · L⁻¹ 尿素中,加入 0.5 mol · L⁻¹ DTT,56 °C 水浴 40 min 后加入适量碘乙酰胺,室温、避光反应后,加入适量碳酸氢铵混匀。加入胰蛋白酶溶液,37 °C 水浴 4 h,加入适量甲酸终止反应。采用液相分离系统 1260 或 1290,Advance-Bio Peptide(2.1 mm × 150 mm,2.7 μm)色谱柱。流动相 A、B 液分别为体积分数 0.1% 三氟乙酸或甲酸水溶液和体积分数 0.08% 三氟乙酸或甲酸乙腈溶液。调整 A、B 相比例对酶解后样品进行分离。检测器波长为 214 nm,柱温 40 °C,进样器 10 °C^[11]。

将酶解后的样品脱盐及分离后进行质谱分析。分析方法:毛细管电压 3.00 kV,样品锥孔电压

40 V,离子源补偿电压 60 V,离子源温度 120 °C,脱溶剂气温度 450 °C,锥孔气流量 50 L·h⁻¹,脱溶剂气流量 600 L·h⁻¹。将原始数据通过 UNIFI 软件进行分析,选择抗体氨基酸序列作为数据库,进行数据库检索。

1.3 方法学验证

1.3.1 专属性 以制剂空白、样品溶液空白、不同种类单抗(抗体 B、抗体 C)为样品进行检测。考察制剂空白、样品溶液空白是否影响特征肽段定位及该方法是否能鉴别不同种类单抗。

1.3.2 精密度 6 份平行样品检测结果中特征肽段保留时间(retention time, t_R)和相对保留时间(relative retention time, RRT)相对标准偏差(RSD)作为重复性验证指标。不同分析人员在不同时间检测同一样品的特征肽段保留时间和相对保留时间 RSD 作为中间精密度指标。

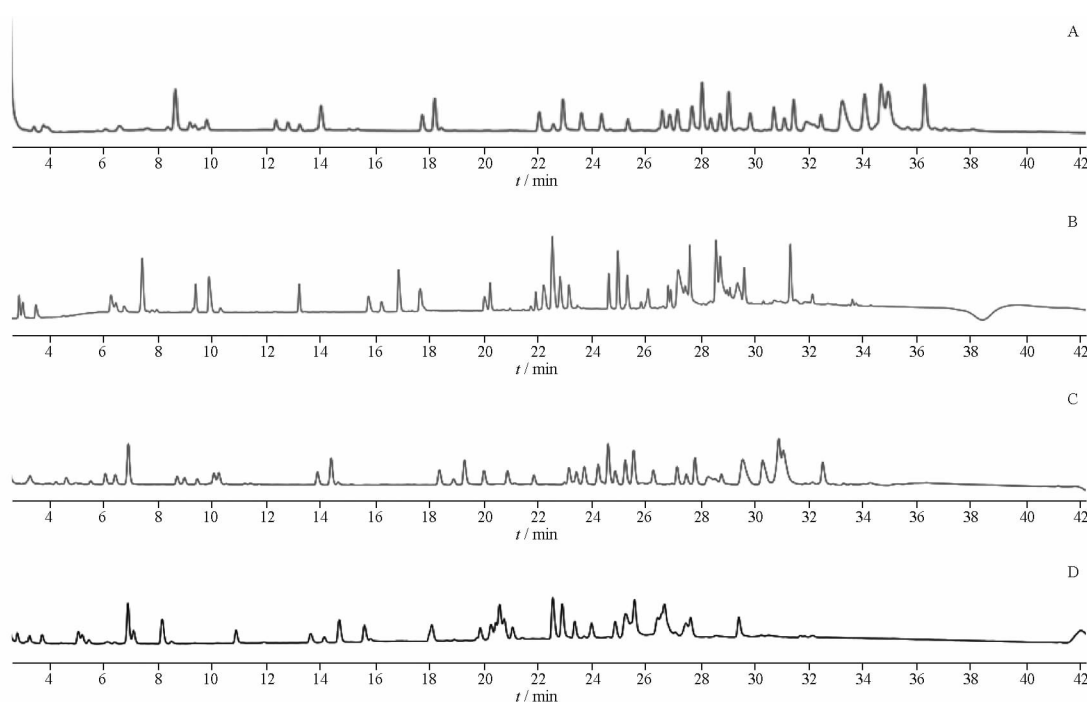
1.3.3 耐用性 考察不同胰蛋白酶量(0.8、1、1.2 μg胰蛋白酶)、不同酶解温度(36、37、38 °C)、不

同酶解时间(3、4、5 h)、不同三氟乙酸比例(0.06%、0.08%、0.1%)、不同流速(0.25、0.3、0.35 mL·min⁻¹)、不同柱温(38、40、42 °C)、不同批次色谱柱(批次 1、批次 2)、样品检测溶液放置(0~25 h)时长对各特征肽段相对保留时间的影响。

2 结果

2.1 不同型号设备和不同流动相体系分离结果

分别使用不同型号设备(HPLC 色谱仪 1260、UPLC 色谱仪 1290)在不同体系(三氟乙酸、甲酸)进行肽图检测。结果显示不同分离体系下,出峰个数、各峰的出现时间、分离度和峰宽均有差异(图 1)。在相同的体系下,UPLC 比 HPLC 分离时间更短。使用相同的分离设备,相比甲酸体系,三氟乙酸体系出峰个数更多,峰宽更窄,峰间分离度也较高。故选择三氟乙酸体系和 UPLC 设备进行后续的分



A - 高效液相色谱法,三氟乙酸体系;B - 高效液相色谱法,甲酸体系;C - 超高效液相色谱法,三氟乙酸体系;D - 超高效液相色谱法,甲酸体系。

A - HPLC, TFA; B - HPLC, FA; C - UPLC, TFA; D - UPLC, FA.

图 1 抗 CD33 单抗肽图液相分离结果

Fig. 1 Peptide mapping of anti-CD33 monoclonal antibody

2.2 CDR 特征肽段鉴定与序列确认

胰蛋白酶为肽链内切酶,可切断肽链中赖氨酸(K)和精氨酸(R)残基中的羧基,形成羧端为赖氨酸或精氨酸的肽段。根据抗 CD33 单抗氨基酸序列,抗

体经胰蛋白酶解后,重链形成 44 条肽段(H1~H44),其中 6 条肽段涉及 CDR 区;轻链形成 20 条肽段(L1~L20),其中 7 条肽段涉及 CDR 区。在涉及 CDR 区域的肽段中选择总长小于 30 个氨基酸且

CDR 区氨基酸个数大于 3 的肽段作为特征肽段 (表 1)。将特征肽段合成后作为特征肽段标准品。

分别将各特征肽段、抗 CD33 单抗、抗 CD33 单抗和特征肽段混合物作为样品进行肽图检测, 见图 2。通过比对, 可以定位各特征肽段在抗 CD33 单抗肽图检测色谱图中的位置。以出峰时间约为 32.46 min 的色谱峰为参比峰 (reference peak, RP), 则根据各特征肽段的保留时间可计算获得各特征肽段峰相对保留时间 (公式 1), 见表 2。

特征肽段峰相对保留时间 = 特征肽段保留时间 / 参比峰保留时间 公式(1)

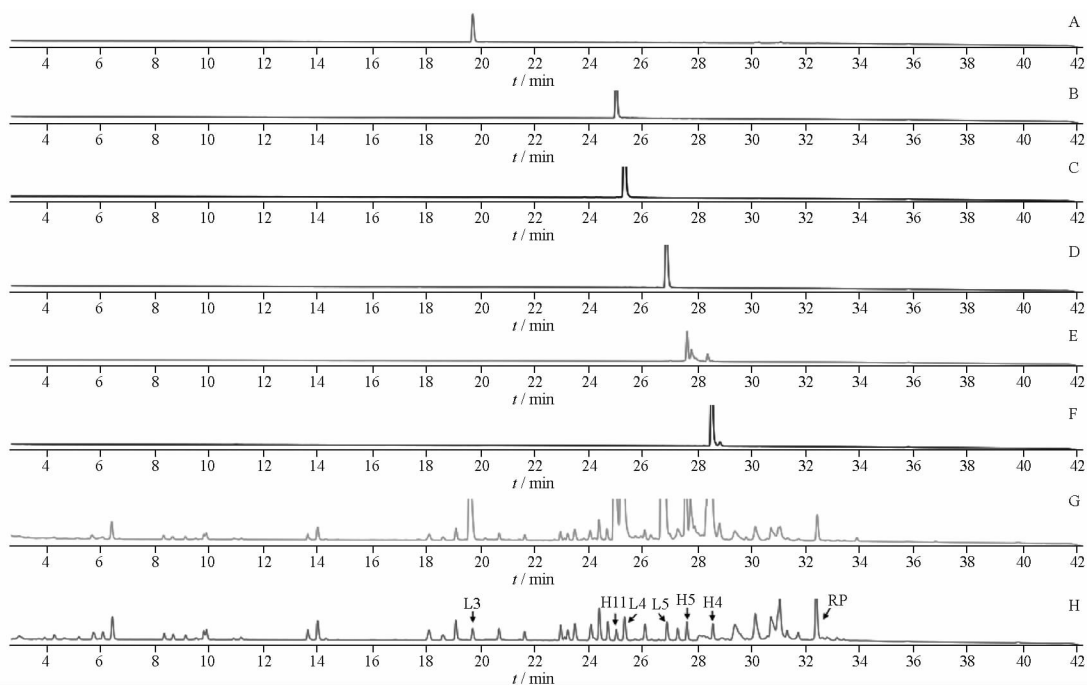
表 1 抗 CD33 单抗各合成特征肽段氨基酸序列和互补决定区 (CDR) 信息

Tab. 1 Amino acid sequence and CDR information of synthetic signature peptide segments of anti-CD33 monoclonal antibody

Name	Sequence	CDR	Number of amino acids
H4	ASGYT <u>F</u> SYIHWIK	CDR1	15
H5	QTPGQGLEWVGVYIPGND <u>DISY</u> NQK	CDR2	25
H11	YFDVWGQGTITVTVSSASTK	CDR3	19
L3	SSQSVF <u>FSS</u> SQK	CDR1	12
L4	NYLAWYQQIPGQSPR	CDR1	15
L5	LLIYWASTR	CDR2	9

注: 划线部分为互补决定区 (CDR) 区域。

Note: The underlined is the CDR area.



A ~ F - L3, H11, L4, L5, H5, H4 合成肽段; G - 抗 CD33 单抗与合成肽段混标; H - 抗 CD33 单抗。

A ~ F - L3, H11, L4, L5, H5, H4 synthetic peptide segments; G - mixture of anti CD33 mAb and synthetic peptide segments; H - anti-CD33 mAb.

图 2 抗 CD33 单抗各合成特征肽段和混标定位结果

Fig. 2 Localization of each synthetic signature peptide segments and mix peptide segments of anti-CD33 monoclonal antibody

表 2 抗 CD33 单抗各合成特征肽段保留时间和相对保留时间

Tab. 2 Retention time (t_R) and relative retention time (RRT) of each synthetic signature peptide segments of anti-CD33 monoclonal antibody

Parameter	RP	L3	H11	L4	L5	H5	H4
t_R /min	32.41	19.70	25.00	25.30	26.87	27.59	28.55
RRT	NA	0.61	0.77	0.78	0.83	0.85	0.88

由酶解后抗 CD33 单抗经三氟乙酸体系分离后的质谱肽图数据 (图 3), 结合抗体氨基酸序列, 经数据分析后, 可定位 CDR 区域肽段位置, 各特征肽段质谱定位结果与肽段标准品定位结果一致 (表 3)。此外, 质谱分析显示参比峰肽段为 H14。

2.3 验证结果

2.3.1 专属性验证结果 制剂空白和样品溶液空白 (图 4A, B) 在特征肽段出峰位置无干扰, 不同种类的单抗 (单抗 B、单抗 C) 检测图谱 (图 4C, D) 与抗 CD33 单抗检测图谱 (图 4E) 有明显差异, 尤其特征肽段位置。

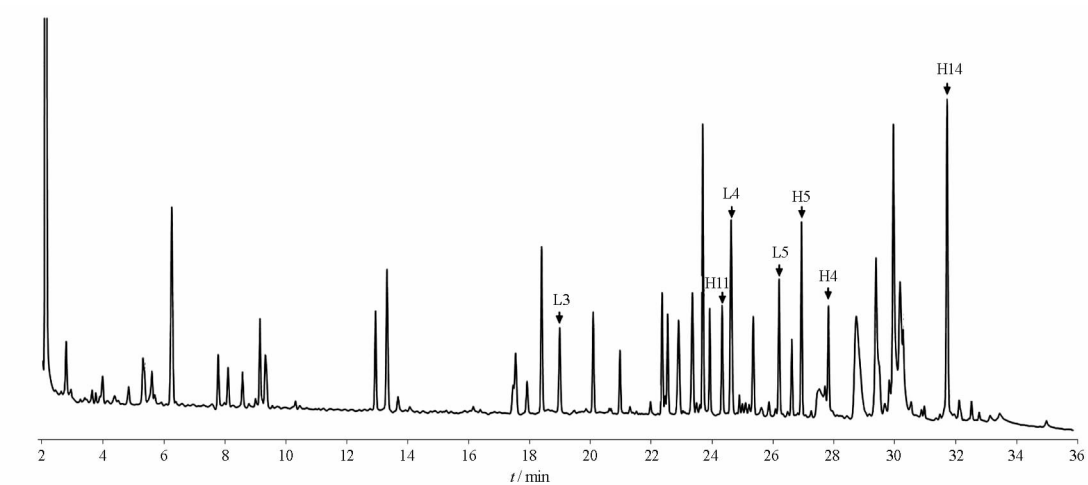


图3 三氟乙酸体系下抗 CD33 单抗液质肽图

Fig. 3 Peptide mass mapping of anti-CD33 antibody in TFA system

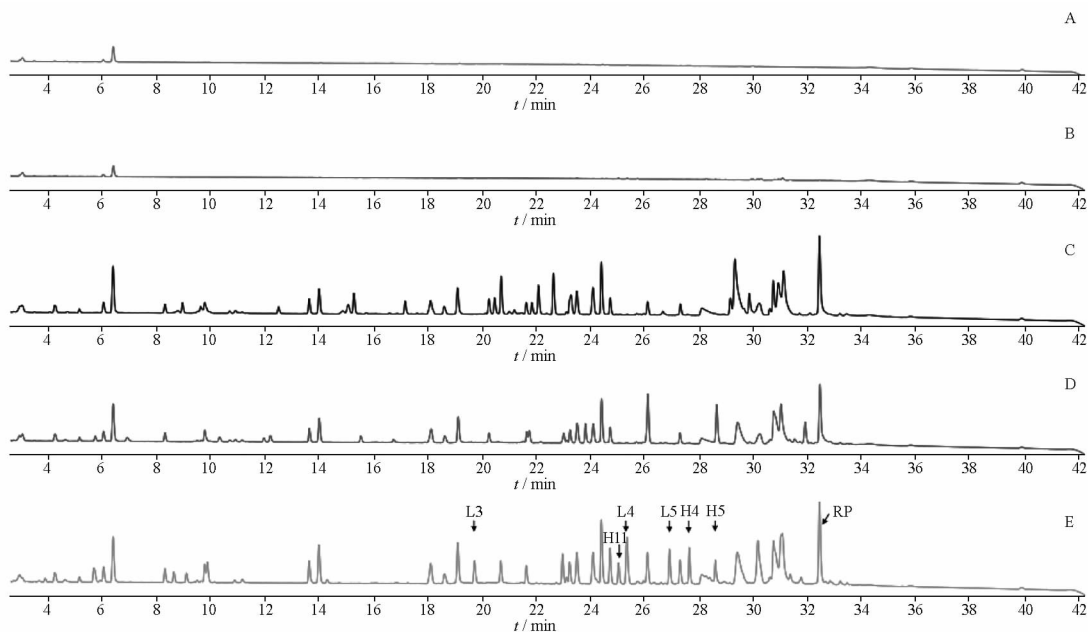
表3 抗 CD33 单抗各合成特征肽段质谱鉴定结果

Tab. 3 Identification results of each synthetic signature peptide segments of anti-CD33 monoclonal antibody by mass spectrometry

Name	Sequence	t_R /min	RRT	MW (Theoretical)	MW (Observed)	CDR
L3	<u>SSQSVFFSSQK</u>	19.08	0.60	1 318.63	1 318.63	CDR1
H11	<u>YFDVWGQCTTVTVSSASTK</u>	24.45	0.77	2 033.98	2 033.99	CDR3
L4	<u>NYLAWYQQIPGQSPR</u>	24.74	0.78	1 820.91	1 820.91	CDR1
L5	<u>LLIYWASTR</u>	26.31	0.83	1 122.63	1 122.63	CDR2
H5	<u>QTPGQGLEWVGVYIPGNDDISYNQK</u>	27.07	0.85	2 778.34	2 778.35	CDR2
H4	<u>ASGYTFTSYIHWIK</u>	27.94	0.88	1 836.90	1 836.90	CDR1
H14	-	31.87	-	6 713.31	6 713.34	RP

注:划線部分为 CDR 区域。

Note: The underlined is the CDR area.



A - 制剂空白; B - 样品溶液空白; C - 单抗 B; D - 单抗 C; E - 抗 CD33 单抗。

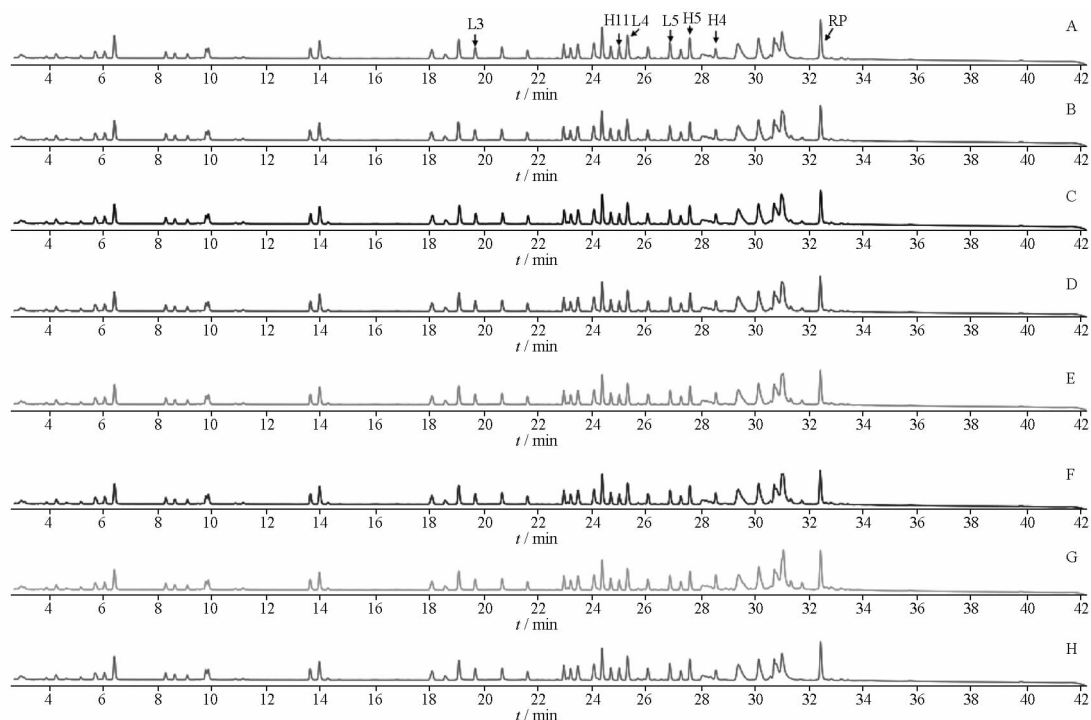
A - formulation blank; B - sample solution blank; C - mAb B; D - mAb C; E - anti-CD33 mAb.

图4 抗 CD33 单抗肽图检测的专属性验证结果

Fig. 4 The specificity validation results of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

2.3.2 精密度验证结果 重复性验证结果:肽图检测结果(图5)显示6份平行样品图谱一致。特征肽段保留时间RSD为0.01%~0.05%,相对保留时间RSD为0.02%~0.05%(表4)。中间精密

度验证结果:2位不同分析人员(A、B)肽图检测图谱一致。特征肽段保留时间RSD为0.05%~0.32%,相对保留时间RSD为0.04%~0.32%(表5)。



A, H - 参比品; B - G - 平行样品。

A, H - reference; B - G - parallel samples.

图5 抗CD33单抗肽图检测的重复性验证结果

Fig. 5 The repeatability validation results of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

表4 抗CD33单抗肽图检测的重复性验证结果

Tab. 4 The repeatability validation results of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

No.	RP			L3			H11		L4		L5		H5		H4	
	t_R /min	t_R /min	RRT	t_R /min	RRT	t_R /min	RRT	t_R /min	RRT	t_R /min	RRT	t_R /min	RRT	t_R /min	RRT	
1	32.39	19.65	0.61	24.96	0.77	25.26	0.78	26.84	0.83	27.58	0.85	28.53	0.88			
2	32.40	19.68	0.61	24.97	0.77	25.28	0.78	26.84	0.83	27.57	0.85	28.53	0.88			
3	32.39	19.66	0.61	24.97	0.77	25.28	0.78	26.85	0.83	27.59	0.85	28.53	0.88			
4	32.39	19.66	0.61	24.97	0.77	25.28	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.54	0.88			
5	32.38	19.66	0.61	24.97	0.77	25.28	0.78	26.84	0.83	27.57	0.85	28.53	0.88			
6	32.40	19.66	0.61	24.97	0.77	25.27	0.78	26.84	0.83	27.58	0.85	28.53	0.88			
Average	32.39	19.66	0.61	24.97	0.77	25.28	0.78	26.84	0.83	27.58	0.85	28.53	0.88			
RSD/%	0.02	0.05	0.05	0.02	0.03	0.02	0.04	0.02	0.04	0.02	0.03	0.01	0.02			

2.3.3 耐用性验证结果 样品分别在不同胰蛋白酶量(1、0.8、1.2 μg 胰蛋白酶)、不同酶解温度(36、37、38 $^{\circ}\text{C}$)、不同酶解时间(3、4、5 h)的前处理条件下,肽图检测图谱一致。特征肽段保留时间RSD为0.02%~0.09%,相对保留时间RSD为0.02%~0.09%(表6)。样品在不同色谱条件下,肽

图检测图谱一致(图6),特征肽段保留时间RSD为1.06%~2.11%,相对保留时间RSD为0.43%~1.43%(表7)。检测期间,样品盘温度为10 $^{\circ}\text{C}$ 时,25 h内各肽图检测图谱一致,特征肽段保留时间RSD为0.01%~0.04%,相对保留时间RSD为0.01%~0.04%(表8)。

表5 抗CD33单抗肽图检测的中间精密度验证结果

Tab. 5 The intermediate precision validation results of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

Analyst	RP			L3		H11		L4		L5		H5		H4	
	t_R/min	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT
A	32.34	19.71	0.61	24.99	0.77	25.30	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.54	0.88		
	32.39	19.70	0.61	24.99	0.77	25.30	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
B	32.38	19.82	0.61	25.04	0.77	25.35	0.78	26.98	0.83	27.60	0.85	28.61	0.88		
	32.39	19.81	0.61	25.04	0.77	25.34	0.78	26.98	0.83	27.60	0.85	28.62	0.88		
Average	32.38	19.76	0.61	25.01	0.77	25.32	0.78	26.92	0.83	27.60	0.85	28.58	0.88		
RSD/%	0.02	0.32	0.32	0.12	0.12	0.11	0.11	0.26	0.25	0.05	0.04	0.14	0.14		

表6 抗CD33单抗肽图检测不同酶解条件的耐用性验证结果

Tab. 6 The robustness validation results of different digest conditions of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

Condition	RP			L3		H11		L4		L5		H5		H4	
	t_R/min	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT
Target condition	32.37	19.71	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.54	0.88		
Trypsin 0.8 μg	32.39	19.70	0.61	24.99	0.77	25.30	0.78	26.86	0.83	27.58	0.85	28.54	0.88		
Trypsin 1.2 μg	32.38	19.70	0.61	24.99	0.77	25.31	0.78	26.86	0.83	27.58	0.85	28.53	0.88		
Digested at 36 $^{\circ}\text{C}$	32.38	19.69	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
Digested at 38 $^{\circ}\text{C}$	32.38	19.66	0.61	24.98	0.77	25.28	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.53	0.88		
Digested for 3 h	32.39	19.70	0.61	24.98	0.77	25.29	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.55	0.88		
Digested for 5 h	32.38	19.69	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
Average	32.38	19.69	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.54	0.88		
RSD/%	0.02	0.09	0.09	0.03	0.04	0.03	0.04	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.03		

3 讨论

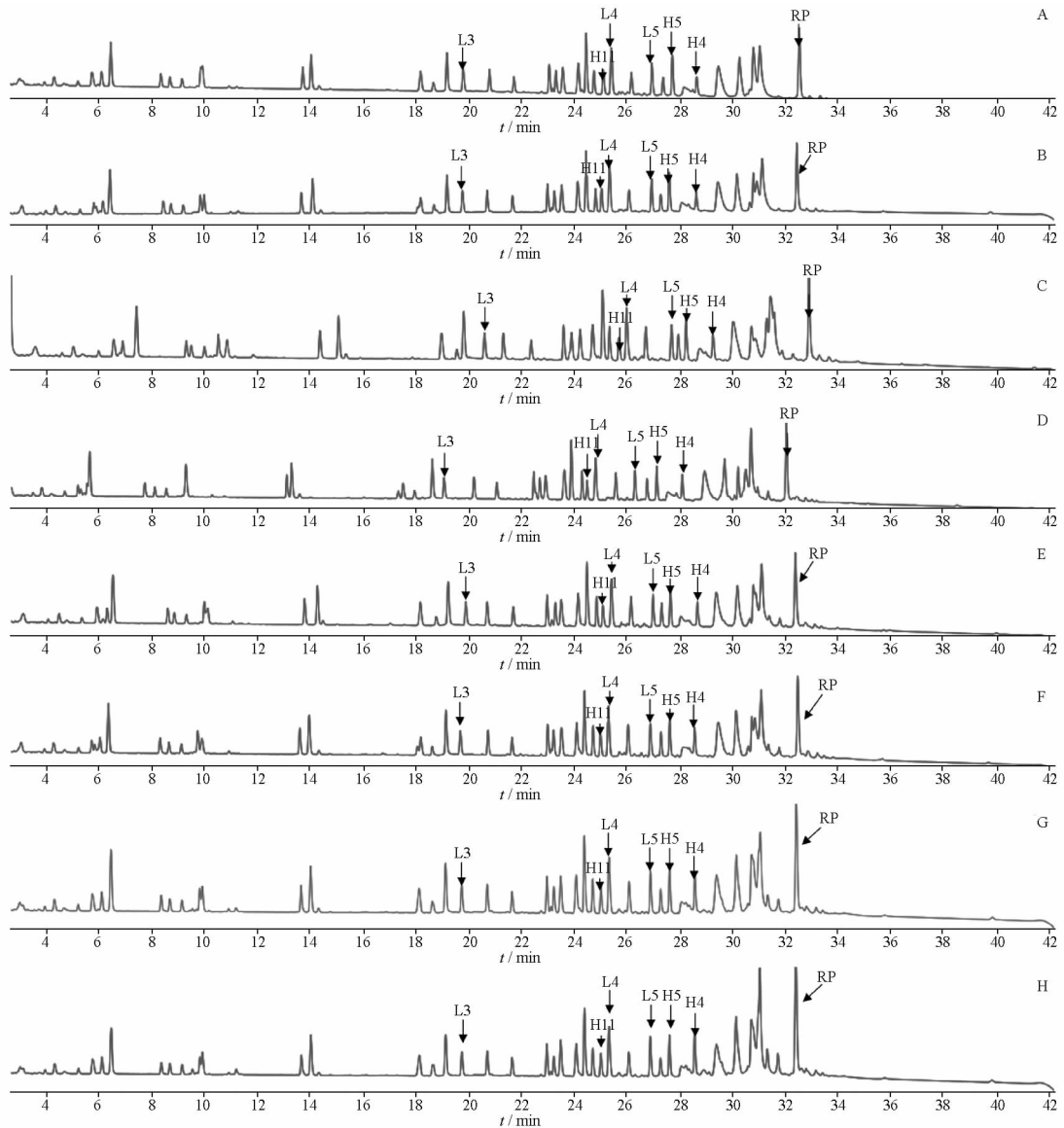
HPLC 和 UPLC 都是肽图分析中常见的分离设备。通常 UPLC 分离时间比 HPLC 分离时间更短。有研究显示使用 HPLC 进行重组人促红细胞生成素肽图分离需要 145 min, 而 UPLC 分离时间只需要 35 min^[12]。本研究中, 在相同流动相体系下, UPLC 的分离时间也短于 HPLC 的分离时间。分离时间的缩短不仅可以提高检测效率, 同时也减少流动相的使用, 降低设备损耗, 节约检测成本。

三氟乙酸可以改善分离峰的峰型, 但与质谱兼容性差, 会抑制电离作用, 降低质谱检测的灵敏度^[13]。甲酸虽然可以提高质谱的离子化效率, 其液相分离效果不如三氟乙酸。因此液相肽图检测时通常使用三氟乙酸进行肽段分离。有研究证实分别采用三氟乙酸和甲酸进行重组人促红素肽图检测, 各肽段的保留时间存在 0.1 ~ 2.8 min 的差异, 2 种分离体系下的肽图存在明显不同^[14]。使用质谱法进行肽段鉴定虽然可以获得更丰富详细的信息, 但该方法对设备、人员专业知识要求较高, 检测周期长, 费用也较高。因此该方法多用于研发阶段质量研究, 较少作为放行的质控检测方法。

在本研究中, 通过合成肽段定位的结果与三氟乙酸体系下的液质肽图定位结果一致。这为以后进

行三氟乙酸体系下的肽段鉴定提供了新的思路。这种定位方法不仅适用于抗体的肽图检测, 也可以推广至其他生物产品的肽图检测, 如融合蛋白、双特异性抗体药物、抗体偶联药物等。在选择、合成特征肽段时需注意: ①肽段应具有专一性, 如 CDR 区域序列; ②肽段总长宜为 5 ~ 30 个氨基酸。肽段太短检测时容易受到干扰, 肽段太长合成难度大; ③避免选择含有易被修饰氨基酸的肽段。如甲硫氨酸、天冬氨酸、色氨酸和谷氨酸; ④肽段中避免会导致酶切不完全的氨基酸序列。如连续或交替出现的精氨酸和赖氨酸、脯氨酸-精氨酸、脯氨酸-赖氨酸; ⑤选择合适的肽段内切酶。除胰蛋白酶外, 还可根据需要进行其他裂解试剂, 如糜蛋白酶、谷酰胺内肽酶等^[15]。使用液相方法结合合成的肽段标准品可以快速定位特征肽段位置, 加快质控方法建立。同时, 特征肽段标准品也有助于日常质量控制检测中偏差和异常的原因调查。

当分离色谱条件发生微小变动时, 肽图检测分离峰保留时间易发生变动。在本研究中, 当流速发生微小变化时 (从 0.25 变化到 0.35 mL · min⁻¹), 各特征肽段保留时间变动明显, 尤其是 L3 特征肽段保留时间的差值为 1.53 min。而如果采用相对保留时间, 流速导致的偏差仅为 0.03。相比主观地



A, B - 三氟乙酸分别为 0.06%、0.1% ; C, D - 流速分别为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; E, F - 柱温分别为 $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$; G, H - 不同批次色谱柱。

A, B - TFA is 0.06% and 0.1% ; C, D - velocity of flow is $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; E, F - column temperature is $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$; G, H - two different column batches.

图 6 抗 CD33 单抗肽图检测不同色谱条件的耐用性验证结果

Fig. 6 The robustness validation results of different chromatographic conditions of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

表 7 抗 CD33 单抗肽图检测不同色谱条件的耐用性验证结果

Tab. 7 The robustness validation results of different chromatographic conditions of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping

Chromatographic conditions	RP			L3			H11		L4		L5		H5		H4	
	t_R/min	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	t_R/min	RRT	
0.06% TFA	32.51	19.76	0.61	25.07	0.77	25.37	0.78	26.92	0.83	26.92	0.85	28.62	0.88			
0.10% TFA	32.42	19.71	0.61	25.00	0.77	25.31	0.78	26.92	0.83	26.92	0.85	28.61	0.88			
$0.35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	32.08	19.08	0.60	24.51	0.76	24.83	0.77	26.32	0.82	26.32	0.85	28.12	0.88			
$0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$	32.91	20.60	0.63	25.70	0.78	25.99	0.79	27.67	0.84	27.67	0.86	29.23	0.89			
Column $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$	32.45	19.62	0.61	24.95	0.77	25.25	0.78	26.85	0.83	26.85	0.85	28.53	0.88			
Column $38 \text{ }^{\circ}\text{C}$	32.40	19.86	0.61	25.08	0.77	25.40	0.78	26.98	0.83	26.98	0.85	28.67	0.88			
Column batch 1	32.38	19.70	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.85	0.83	26.85	0.85	28.54	0.88			
Column batch 2	32.38	19.82	0.61	25.04	0.77	25.35	0.78	26.98	0.83	26.98	0.85	28.61	0.88			
Average	32.44	19.77	0.61	25.04	0.77	25.35	0.78	26.94	0.83	26.94	0.85	28.62	0.88			
RSD/%	0.70	2.11	1.43	1.29	0.62	1.24	0.60	1.36	0.72	1.36	0.36	1.06	0.43			

表 8 抗 CD33 单抗肽图检测样品溶液 10 °C 的稳定性结果

Tab. 8 The stability results of anti-CD33 monoclonal antibody peptide mapping sample solution at 10 °C

t /h	RP		L3			H11		L4		L5		H5		H4	
	t _R /min	t _R /min	RRT	t _R /min	RRT	t _R /min	RRT	t _R /min	RRT	t _R /min	RRT	t _R /min	RRT	t _R /min	RRT
0	32.38	19.70	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.85	0.83	27.59	0.85	28.54	0.88		
5	32.38	19.70	0.61	24.98	0.77	25.29	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
15	32.38	19.69	0.61	24.99	0.77	25.30	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
20	32.40	19.68	0.61	24.99	0.77	25.29	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
25	32.39	19.70	0.61	24.98	0.77	25.29	0.78	26.85	0.83	27.58	0.85	28.54	0.88		
Average	32.39	19.69	0.61	24.98	0.77	25.29	0.78	26.86	0.83	27.59	0.85	28.55	0.88		
RSD/%	0.03	0.04	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01		

判断肽图谱是否一致,采用多个具有代表性特征肽段的相对保留时间作为判断依据更客观,也便于检测人员面对异常情况结果进行判断。

综上所述,本研究通过合成肽段进行液相肽图检测中的肽段定位,与质谱肽段定位法相比,不仅结果准确,而且更便捷、经济,可以用于液相肽图检测方法的开发。此外,采用相对保留时间进行检测结果的判定适用性更广,更客观。

REFERENCES

- [1] KINCH M S, KRAFT Z, SCHWARTZ T. Monoclonal antibodies; trends in therapeutic success and commercial focus [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28 (1): 103415. DOI: 10.1016/j.drudis.2022.103415.
- [2] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(7): 491-495.
- [3] *Ch. P (2020) Vol III (中国药典 2020 年版·三部)* [S]. 2020: 42-48.
- [4] International Conference Harmonization (ICH) Guides ICH Q6B, Specifications; Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products [EB/OL]. ICH; Geneva, Switzerland, 1999. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- [5] Food and Drug Administration. Guidance for Industry for the submission of chemistry, manufacturing, and controls information for a therapeutic recombinant DNA-derived product or a monoclonal antibody product for *in vivo* use [EB/OL]. 1996. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-submission-chemistry-manufacturing-and-controls-information-therapeutic>.
- [6] MOUCHAHOIR T, SCHIEL J E. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NISTmAb [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(8): 2111-2126.
- [7] YANG Y, RAO C M, WANG W, *et al.* Peptide mapping analysis of recombinant human interleukin-11 with HPLC-ESI-Q-TOF/MS spectrometry [J], *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41(8): 756-760.
- [8] QIAO Y L, HUANG Z, QIN H Y, *et al.* Establishment of HPLC-peptide mapping method for the characterization of anti-CD52 monoclonal antibody [J], *Biotechnol Bull (生物技术通报)*, 2018, 34(11): 216-222.
- [9] XIA Y, GUO H L, HU Y H, *et al.* Therapeutic drug monitoring for monoclonal antibody; progress in the application of LC-MS/MS technique [J], *J China Pharm Univ (中国药科大学学报)*, 2021, 52(1): 122-128.
- [10] DAI Y, PENG H W, GOU F C, *et al.* Comparison study on the critical quality attributes between similar biological medicine (YD057) and Dulaglutide [J], *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2018, 53 (4): 300-305.
- [11] ZHANG F, YU C F, WANG W B, *et al.* Development of methods for quality control of humanized monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor [J]. *Chin Pharm J (中国药学杂志)*, 2016, 51 (13): 1101-1106.
- [12] WANG M L, YANG P F, SHEN Q, *et al.* Peptide mapping of recombinant human erythropoietin by HPLC and UPLC [J]. *Chin Prev Med (中国预防医学杂志)*, 2008, 9(5): 360-365.
- [13] KHALIKOVA M A, SKARBALIUS L, NAPLEKOV D K, *et al.* Evaluation of strategies for overcoming trifluoroacetic acid ionization suppression resulted in single-column intact level, middle-up, and bottom-up reversed-phase LC-MS analyses of antibody biopharmaceuticals [J]. *Talanta*, 2021, 233: 122512. DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122512.
- [14] TAO L, HAN C M, LI X, *et al.* Comparison of peptide mass map of recombinant human erythropoietin in trifluoroacetic acid and formic acid systems [J], *Chin J Biol (中国生物制品学杂志)*, 2018, 31(1): 9-13.
- [15] *Ch. P (2020) Vol III (中国药典 2020 年版·三部)* [S]. 2020: 553-555.

(收稿日期:2023-04-26)