

SCX-MS直联用于九种单抗的电荷异构体分析

龙珍 张劭阳 祝翔

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词：单抗，SCX，电荷异构体，直联，脱酰胺，K丢失，超高分辨质谱

1. 引言

单克隆抗体（简称单抗）具有选择性好、靶向性强、临床效果好等特点。由于单抗具有的这些小分子药物难以匹敌的优势，单抗受到研发者和医药市场的青睐。截止2022年7月，在中国批准上市的国产单抗36个，进口单抗46个。国际上上市单抗超过110种，相比国际单抗种类，中国单抗市场还有较大增长空间。

在单抗的发酵、纯化和存储过程中，因为酶或者非酶的条件，导致单抗存在一系列翻译后修饰，例如糖基化、糖化、氧化、脱酰胺和K丢失等。大量文献研究表明，这些翻译后修饰的不同对单抗的安全性和有效性存在较大的影响。例如，随着糖化水平的增加[1-4]，容易导致抗体表面正电荷减少，从而导致抗体聚集体的增加。此外，糖化后的抗体也容易进一步反应，例如羧甲基化，导致抗体颜色的变化[5]。又如，轻链N30的脱酰胺造成赫赛汀轻微的效价丢失[6]，重链N55的脱酰胺造成该药物效价的显著降低[7]。虽然没有报道表明K Loss的比例与抗体的活性有直接关系，但K loss比例的不同会造成抗体药物批次一致性的差异。

在这些翻译后修饰中，很多会导致抗体电荷的变化，即形成电荷异构体。传统的电荷异构体分离方法包括离子交换和电泳法。两种方法分离机理不同，离子交换法根据抗体表面电荷的不同进行分离，而电泳法如iCIEF根据抗体净电荷的不同进行分离。定性酸碱组分，研究其来源有利于抗体工艺的优化。因此，随着抗体行业的不断优化，对酸碱变异体的定性分析需求日益增长。常规的离子交换法和iCIEF法都用UV作为检测器。但UV检测器仅依靠保留时间定性，无法对没有对照品的组分进行归属。由于常规离子交换法和iCIEF方法使用难挥发性的盐作为流动相或者添加剂，造成这两种方法难以与MS兼容。如离子交换法用氯化钠和磷酸盐作为流动相添加剂，iCIEF方法使用甲基纤维素和尿素作为添加剂。发展MS兼容的电荷异构体分离方法对抗体行业的生产技术优化和抗体质量研究有着重要的意义，

因此，近年来各研究结构和研究人员开始关注该领域。

2018年，ThermoFisher的研究人员Ken Cook等发表了一种以pH梯度为基础的SCX-MS方法，用于单抗的电荷异构体分析[8]。为了方便中国读者研究和使用该方法，本文将这个方法的一些细节进行分享，并将这个方法用于市场上销量最高的9种单抗的电荷异构体分析，为抗体企业用户提供参考。

2. 实验部分

2.1 样品及前处理

电荷异构体分析：10kDa超滤管脱盐后，纯水复溶，配制成以下浓度。

样品名称	英文名称	PI	浓度(mg/mL)
达雷妥尤单抗	Daratumumab	8.67	1
贝伐珠单抗	Bevacizumab	8.44	1
帕博丽珠单抗	Pembrolizumab	7.46	1
英夫利昔单抗	Infliximab	8.14	1
阿达木单抗	Adalimumab	8.86	1
利妥昔单抗	Rituximab	9.2	1
古塞奇尤单抗	Guselkumab	8.94	1
地舒单抗	Denosumab	8.90	1
阿替丽珠单抗	Atilizumab	9.24	1

肽谱分析：取一定体积，质量为100 μg样品于1.5 mL离心管中，用同等体积RapiGest™混匀后于60 °C变性15 min。在上述样品中加入二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)，终浓度为50 mM，于60 °C反应1 h，然后将样品冷却至室温。在上述样品中加入碘代乙酰胺(Iodoacetamide, IAM)，终浓度为100 mM，在室温、避光反应30 min。取出样品，转移到10 kDa超滤膜，21,000 g离心10 min。加入100 μL浓度为50 mM的碳酸氢铵溶液复溶后，加入4 μg胰蛋白酶(Trypsin)，于37 °C过夜反应。加入3 μL甲酸终止酶解，21,000 g，离心10 min，取上清液分析。

2.2 仪器

质谱仪器: Orbitrap Exploris 240 (赛默飞世尔科技, 美国);

色谱仪器: Vanquish Flex, 混合器体积为35 μ L;

2.3 仪器方法

1) 电荷异构体

色谱柱: MabPac SCX-10 RS (2.1 x 50 mm, 5 μ m); 流动相: A-25 mM碳酸氢铵 (1.975 g+1.8 mL乙酸), pH5.3; B- 10 mM氨水溶液 (1M氨水6 mL+600 mL水), pH 10.9;

梯度: 见表格;

流速: 0.3 mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

检测波长: 280 nm

进样: 20 μ g;

梯度:

样品	梯度
英夫利昔单抗	30-55%B, 0-10 min; 10-10.1, 55%-100%, 10.1-12 min, 100%B; 12-12.1 min, 100%-0%B, 12.1-14 min 0%B; 14-14.1 min 30% B, 14.1-22 min,30%B
帕博丽珠单抗	42-55%B, 0-10 min; 10-10.1, 55%-100%, 10.1-12 min, 100%B; 12-12.1 min, 100%-0%B, 12.1-14 min 0%B; 14-14.1 min 42% B, 14.1-22 min,42%B
阿达木单抗	40-100%B, 0-10 min; 10-12 min, 100%B; 12-12.1 min, 100%-0%B, 12.1-14 min 0%B; 14-14.1 min 40% B, 14.1-22 min, 40%B
贝伐株单抗	35-60%B, 0-10 min; 10-10.1,60%-100%, 10.1-12 min, 100%B; 12-12.1 min, 100%-0%B, 12.1-14 min 0%B; 14-14.1 min 35% B, 14.1-22 min, 35%B
达雷妥尤单抗	60-100%B, 0-10 min; 10-12 min, 100%B; 12-12.1 min, 100%-0%B, 12.1-14 min 0%B; 14-14.1 min 60% B, 14.1-22 min,60%B
阿替丽珠单抗	85-100%B, 0-10 min; 10-12 min, 100%B; 12-12.1 min, 100%-0%B, 12.1-14 min 0%B; 14-14.1 min 85% B, 14.1-22 min, 85%B
地舒单抗	
古塞奇尤单抗	
利妥昔单抗	

质谱条件:

检测模式	+
喷雾电压	3.6 kV
毛细管温度	275 $^{\circ}$ C
雾化温度	275 $^{\circ}$ C
鞘气	25
辅助气	5
S-lens RF	70
分辨率设置	15,000@m/z 200
母离子扫描范围	m/z 2000-8000
AGC target	300%
最大离子注入时间	200 ms;
microscan	10
SID	110 v

2) 肽谱及翻译后修饰;

色谱仪: Vanquish Flex; 分析柱: BEH C18 130 \AA 2.1 μ m x 150 mm, 1.7 μ m; 柱温: 60 $^{\circ}$ C

流动相: A: 0.1% FA-水; B: 0.1% FA-乙腈; 分析流速: 0.2 mL/min; 上样量: 10 μ L。

梯度:

时间 (min)	B/%
0	3
3	3
85	32
90	90
95	90
95.1	3
100	3

质谱条件:

检测模式	+
喷雾电压	3.8 kV
毛细管温度	320 °C
雾化温度	350 °C
分辨率设置	一级120,000@m/z 200; 二级15,000@m/z 200
母离子扫描范围	m/z 350-1800
AGC	一级300%; 二级100%
(n)CE	30%

注: 肽谱方法用于做翻译后修饰的验证, 正文未展示具体数据。

2.4 数据采集及分析

Thermo Xcalibur Qual Browser定性浏览器; BioPharma Finder 4.1处理数据

3. 结果与讨论

3.1 pH梯度分离原理及注意事项

pH梯度分离的原理是当流动相的pH值与蛋白的等电点 (pI) 相同时, 蛋白被洗脱下来。由离子强度相对较弱的挥发性缓冲溶液提供的pH梯度也会带来一个问题, 即色谱柱本身的缓冲效应会影响流动相的pH变化。在本方法中, 我们使用规格为2.1 x 50 mm的MabPac SCX-10 RS正是因为强阳离子交换相对弱阳离子、实心颗粒相对于其它固定相以及较短的柱长相对于较长的色谱柱长, 具有更小的缓冲容量, 从而减少色谱柱对流动相pH梯度变化的影响。即使对色谱柱进行了严格的选择, 色谱柱的缓冲容量对流动相pH的影响仍然可以被观察到。例如, 当用100%B做流动相 (流经色谱柱前的pH为10.9), 用pHi计测得的柱后pH为10.2, 即色谱柱的缓冲容量部分中和了流动相的pH变化。

色谱柱的平衡对方法的稳定性尤其重要。相对于反相色谱, 离子交换色谱的平衡会更为困难。本方法采用强-弱平衡的方法, 在分离完成后, 先用100%的A相冲洗色谱柱2分钟, 然后再用初始流动相比比例平衡8分钟。用该方法平衡色谱柱, 无论是保留时间稳定性还是pH计监测的pH变化数据, 都证明色谱柱得到了很好的平衡。

在反相色谱中, 我们常常增加柱长, 从而提高柱效和改善分离度。但pH梯度的离子交换色谱与反相色谱不同, 它的分离度并不依赖于色谱柱的柱长。pH梯度分离的离子交换是一种等电点聚焦技术, 在该技术中当色谱柱中的pH值达到蛋白的pI (native pI) 时, 蛋白将处于中性状态从而解除与固定相的结合, 以尖锐而狭窄的色谱峰被洗脱。综合以上因素, 我们选择50 mm长度的SCX色谱柱。

使用挥发性缓冲溶液做流动相存在的一个潜在的问题: 现有的缓冲溶液缺乏pH 7-8区间的缓冲能力, 如图1所示。这个缓冲的空白区间导致该范围无法呈现线性梯度, 从而导致该范围内的蛋白共洗脱而缺少分离度。为了解决这个问题, 在这些pH值上可以采用弯曲的梯度曲线, 以产生近乎线性的柱上pH梯度。在Ken Cook发展的方法中, 以西妥昔为例讲解了弯曲梯度曲线对分离度的帮助[8]

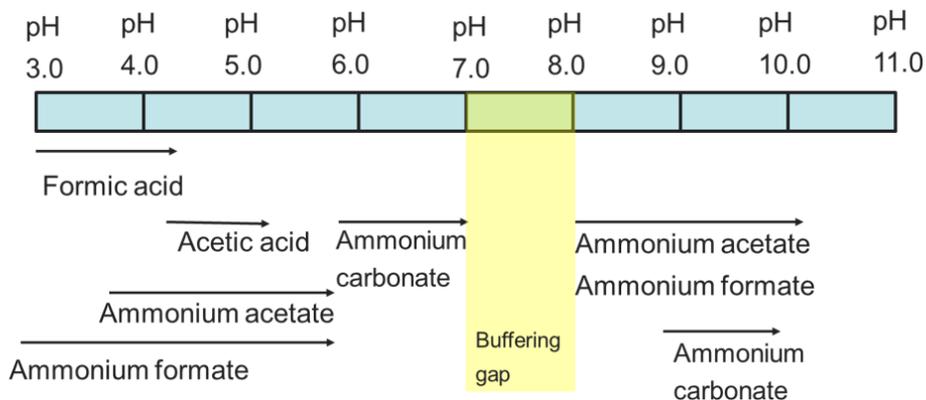
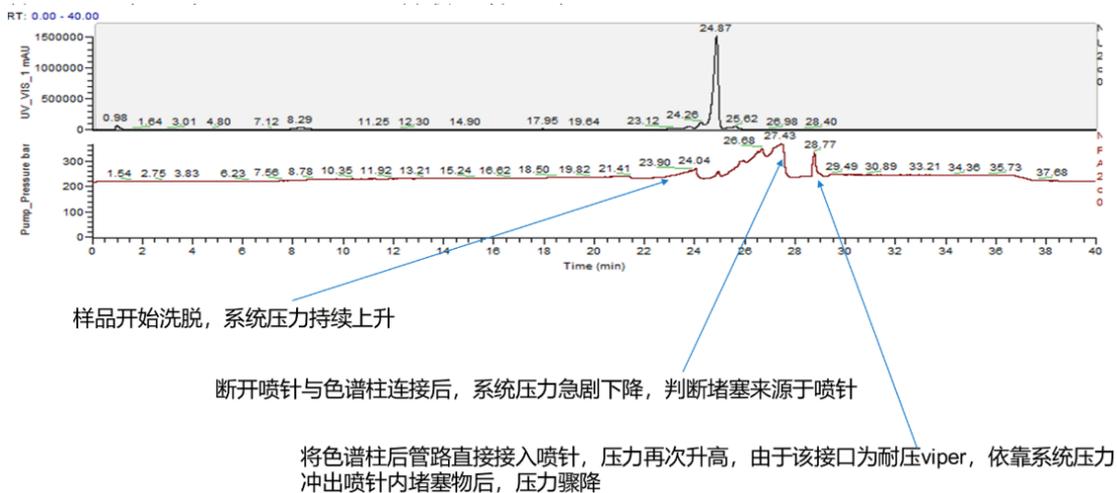


图1 挥发性缓冲溶液的pH范围

pH梯度使用的液相条件为native条件，该条件下样品和系统中的难挥发性小分子容易加合到蛋白表面，造成质谱峰展宽，从而导致质量偏差增大[9]。本文使用了110 eV的源内电压（SID），用于破坏小分子与蛋白之间的非共价作用，从而提高质量准确度。

如果样品中存在大量的难挥发性盐，务必脱盐后再用于SCX分析。原因是：1）难挥发性的盐，尤其是阳离子会与蛋白在相近的时间洗脱，大量难挥发性盐洗脱进入喷针并迅速干燥，容易造成喷针堵塞，系统压力升高，甚至损坏与MS串联的紫外检测器。2）难挥发性的盐与单抗同时洗脱，容易加合到蛋白上造成质量偏移[10]。如图2所示，某单抗中含有大量的盐，该样品用于SCX-MS分析前没有做脱盐处理。该样品在分离洗脱过程中，呈现明显的压力波动，尤其是使用低流速（小于等于0.2 mL/min）分析该样品时。



3.2 色谱条件

在3.1节，我们讲解了常见的缓冲溶液难以涵盖pH 7-8范围的问题，也提出使用弯曲梯度曲线可以部分解决该问题。在Ken的文献中，他用西妥昔单抗进行了演示。除了使用弯曲梯度曲线，缓慢的梯度变化也有利于电荷异构体的分离。本节我们用帕博丽珠单抗演示缓梯度和弯曲梯度曲线对分离度的影响。帕博丽珠单抗的理论pI为7-7.8。图3A-3C，采用相同的梯度变化曲线（curve都为5），不同的梯度曲线斜率（slope）。随着梯度斜率变小（即梯度变化更为缓慢），原本与主峰共洗脱的酸碱峰被分离出来。图3C和图3D采用相同的梯度程序，不同的梯度曲线（部分时间curve值变为7）。图3C的梯度变化更缓慢，洗脱时间更晚，分离度也更好。

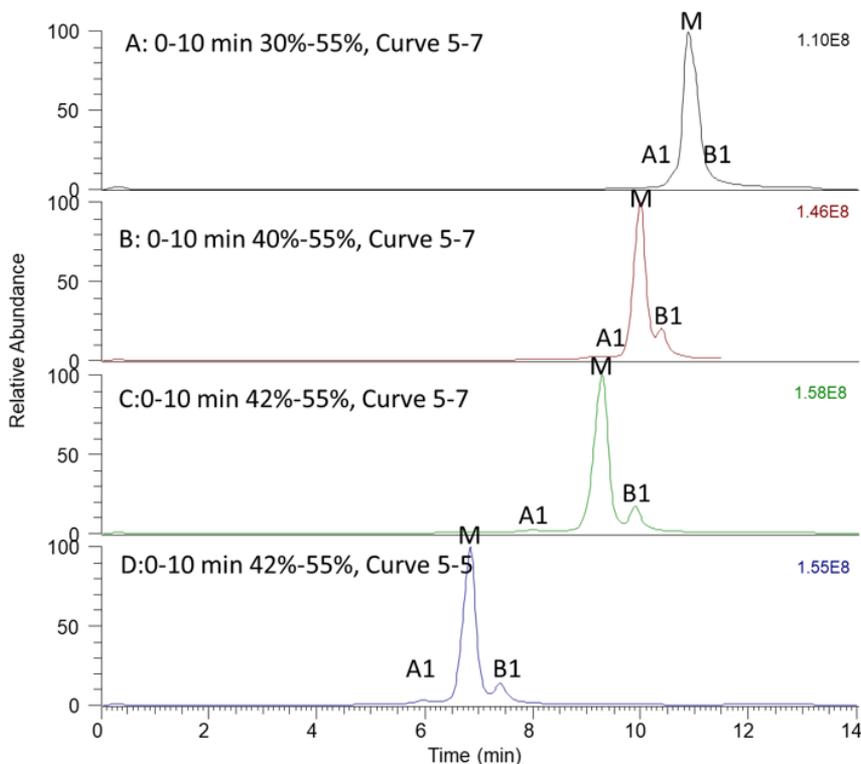


图3 不同梯度程序和梯度曲线所得帕博丽珠单抗TIC图

3.3 9种单抗的电荷异构体分离

3.3.1 阿达木及其电荷异构体解析

SCX不仅可以保留蛋白还可以保留其它可以电离的有紫外吸收的小分子物质，这些物质的m/z通常小于2000，不在本方法MS信号采集的范围内，因此造成UV谱图与TIC谱图差异。图4是阿达木电荷变异体的UV谱图和TIC谱图。两个主要的酸峰均以脱酰胺修饰为主。虽然无法从分子量上准确判断脱酰胺数目，但可以从保留位置上推测，A2的脱酰胺程度比A1更大（表1）。碱峰以重链C末端连接一个K为主。除了脱酰胺，在A2中还可以检测到一些抗体碎片，其中丰度最高的片段分子量为143689.09，与脱酰胺的主峰相差5517.36 Da，与2xA2G0F的组分相差5508.36 Da。该片段可能是阿达木轻链丢失1-50号氨基酸后的产物。

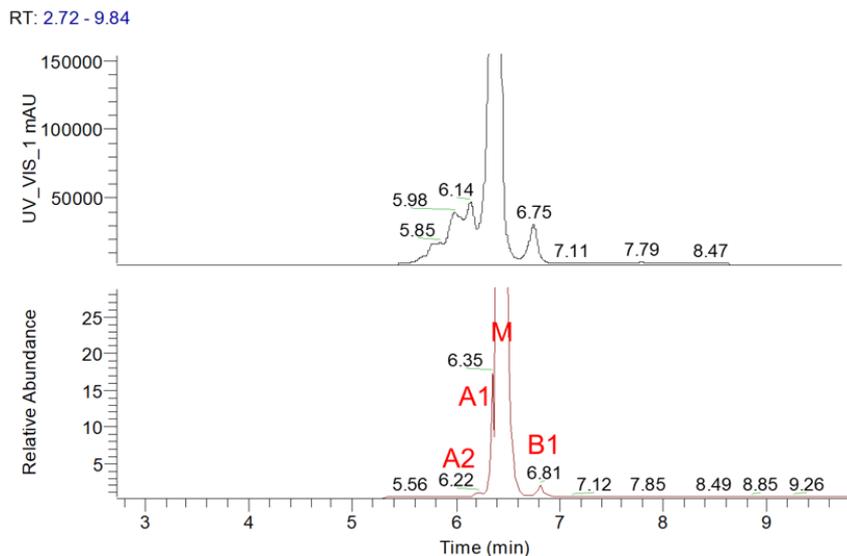


图4 阿达木电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）。

表1 阿达木酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A2	2xA2G0F, Deamidation	149206.45	-	
A1	2xA2G0F, Deamidation	149202.94	-	
M	2xA2G0F	149199.48	149197.57	12.9
B1	2xA2G0F, 1xLys	149329.58	149325.74	25.7

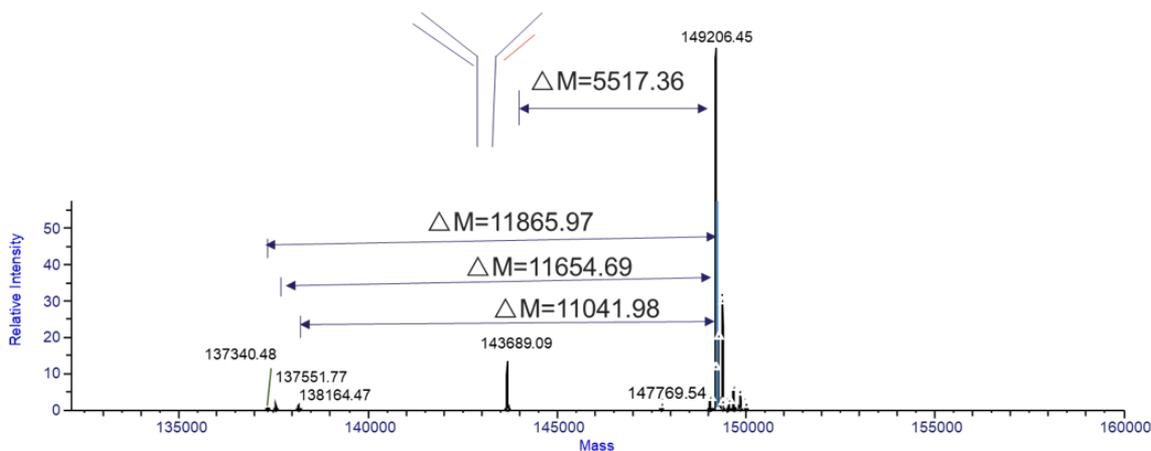


图5 阿达木抗体片段分析

3.3.2 英夫利昔单抗电荷变异体

图6是英夫利昔单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在英夫利昔单抗中检测到两个较为明显的碱峰（B1、B2和B3）和两个较小的酸峰（A1和A2）。其中B1和B3分别是主峰2x A2G0F加1个K和2个K。酸峰A1是主峰的1x Glycation形式，A2是主峰的脱酰胺形式。B2有可能是1x A2G1F, 1x A2G2F, 1x K loss形式，但与理论偏差较大（87 ppm），有待进一步研究。

与阿达木相似，在英夫利昔单抗中也可以看到含量较低的片段出现，尤其是酸峰区域（图7）。在主峰和碱峰区域也可以观察到抗体片段，但丰度较低（数据未展示）。

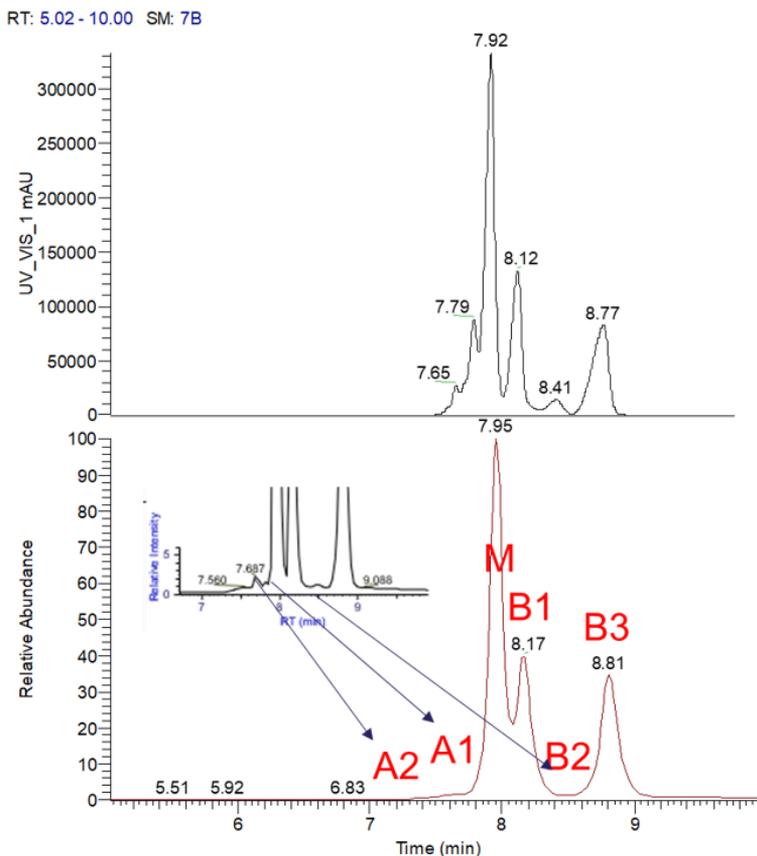


图6 英夫利昔单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）。

表2 英夫利昔单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A2	2x A2G0F, deamidation	148524.5	-	-
A1	2x A2G0F, 1x Glycation	148675.69	148674.54	7.7
M	2x A2G0F	148516.03	148512.52	23.6
B1	2x A2G0F, 1x Lys	148643.38	148640.69	18.1
B2	-	149039.67	-	-
B3	2x A2G0F, 2x Lys	148771.8	148768.86	19.8

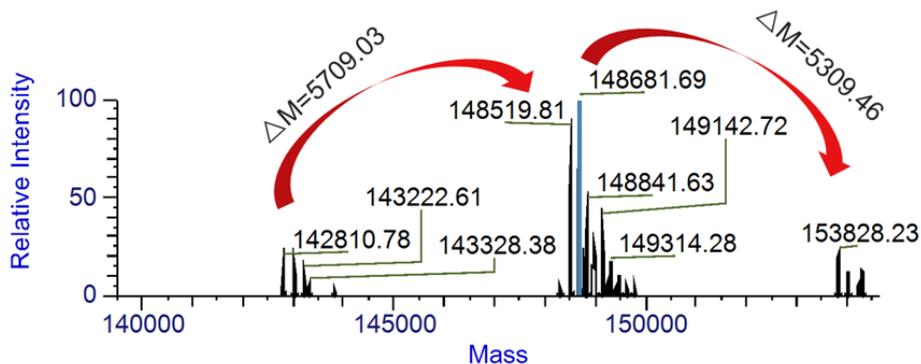


图7 英夫利昔单抗酸峰区域的片段

3.3.3 帕博丽珠单抗电荷变异体

图8是帕博丽珠单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。线性梯度无法为帕博丽珠单抗在7-8获得良好的线性梯度，因此分离能力有限。在UV图中可以看到酸峰和碱峰的检出，但在TIC图中受较强主峰信号的影响，无法看到有足够分离度的酸峰和碱峰。采用缓梯度和变化梯度曲线后，帕博丽珠单抗的酸碱峰可以与主峰进行良好的分离，如图3C。对图3C的对酸峰和碱峰所在区域去卷积，得到可能的酸碱峰如表3所示。在酸性区域除可以观察到可能的脱酰胺组分以外还可以看到抗体的片段，如图9所示。

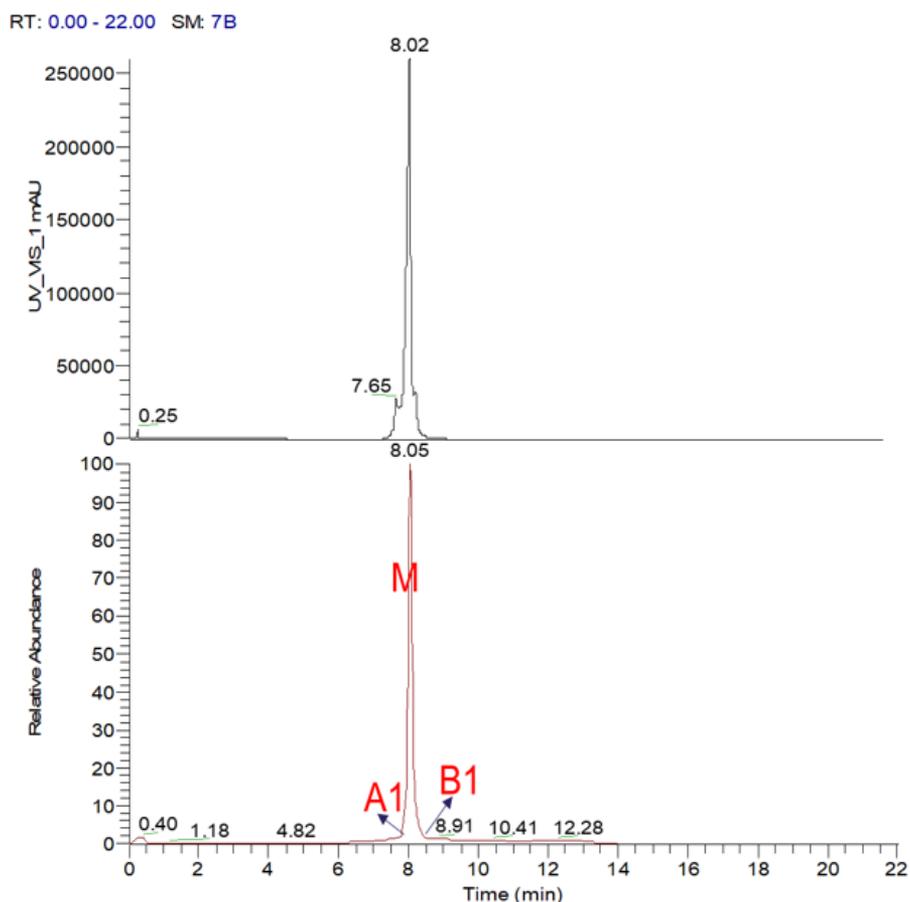


图8 帕博丽珠单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下，同图3A）

表3 帕博丽珠单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A1	2x A2G0F, Deamidation	148889.86	-	-
M	2x A2G0F	148887.58	148887.3	1.9
B1	2x A2G0F, 1x N末端环化	148907.92	148903.33	24.1

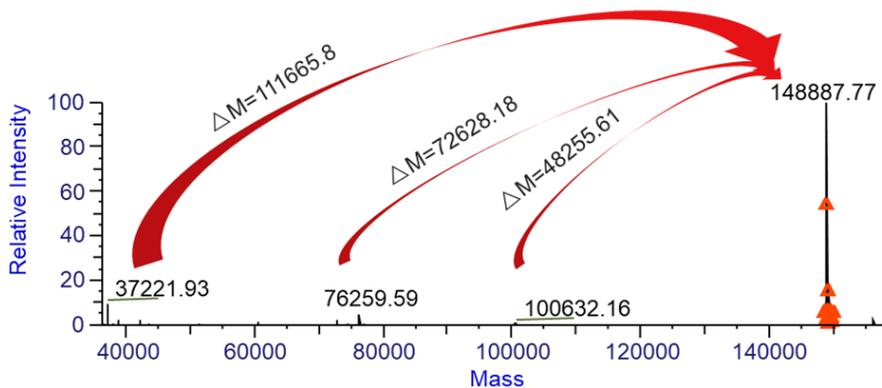


图9 帕博丽珠单抗酸峰区域的片段

3.3.4 贝伐株单抗电荷变异体

图10是贝伐株单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在贝伐株单抗中可以检测到两种酸性变异体（A1和A2）和一个碱性变异体（B1），这些组分的分子量和偏差见表4所示。虽然贝伐株单抗有重链丢失1-105号氨基酸的报道，但本样品中没有检测到明显的该断裂导致的片段[11]。

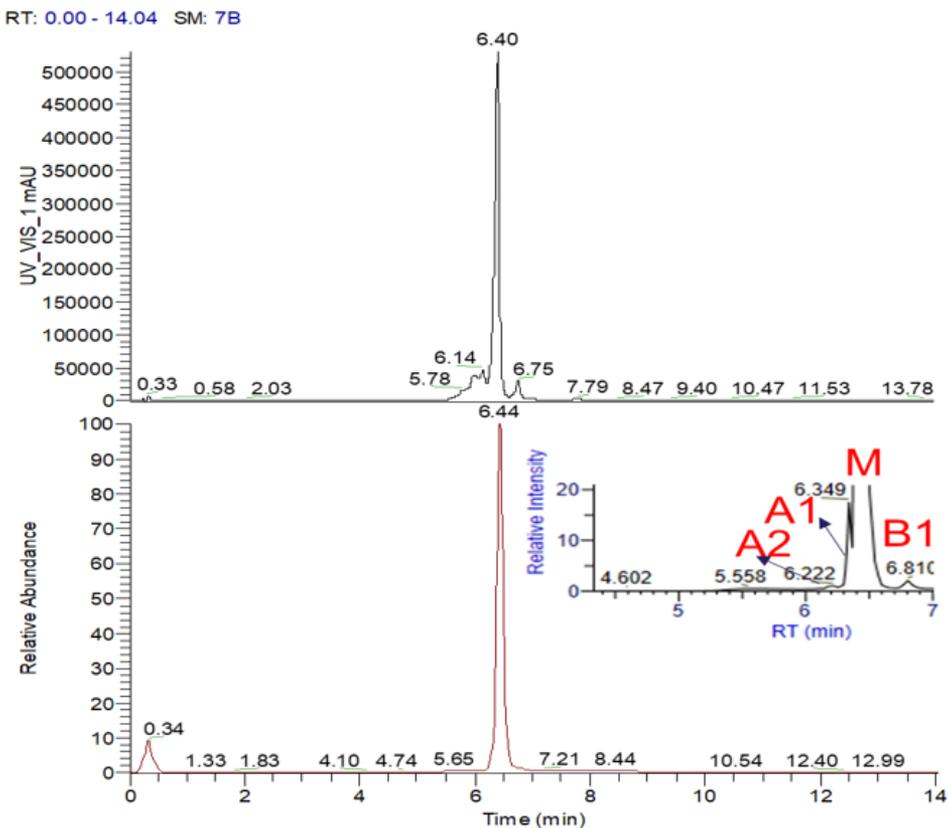


图10 贝伐株单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）

表4 贝伐株单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A2	2x A2G0F, Deamidation	149203.61	-	-
A1	2x A2G0F, Glycation	149363.36	149359.71	24.4
M	2x A2G0F	149200.77	149197.57	21.4
B1	2x A2G0F, 1x Lys	149329.81	149325.74	27.3

3.3.5 达雷妥尤单抗电荷变异体

图11是达雷妥尤单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在达雷妥尤中检测到两个较为明显的酸碱峰，分别是主峰的glycation修饰和重链末端一个K修饰的形式，表5。此外，在碱性峰区域还检测到抗体片段（图12），其分子量与一个轻链加一个重链的分子量类似。

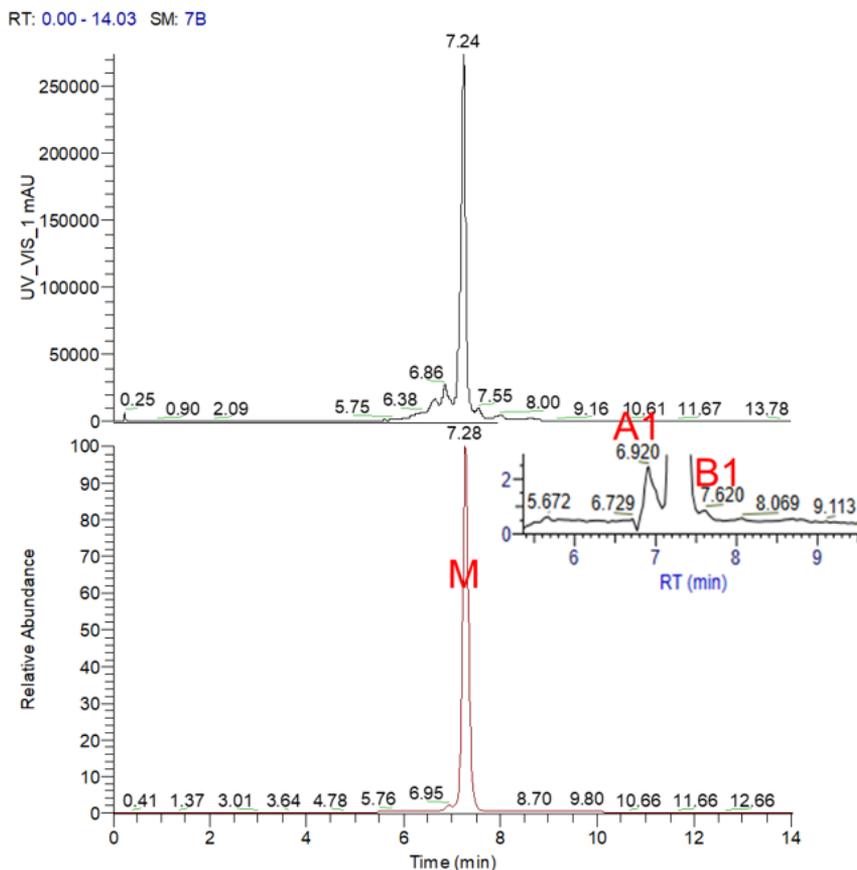


图11 达雷妥尤单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）

表5 达雷妥尤单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A1	2xA2G0F, 1x Glycation	149363.36	149359.71	24.4
M	2xA2G0F	148026.61	148024.70	12.9
B1	2xA2G0F, 1x Lys	148170.25	148168.87	9.3

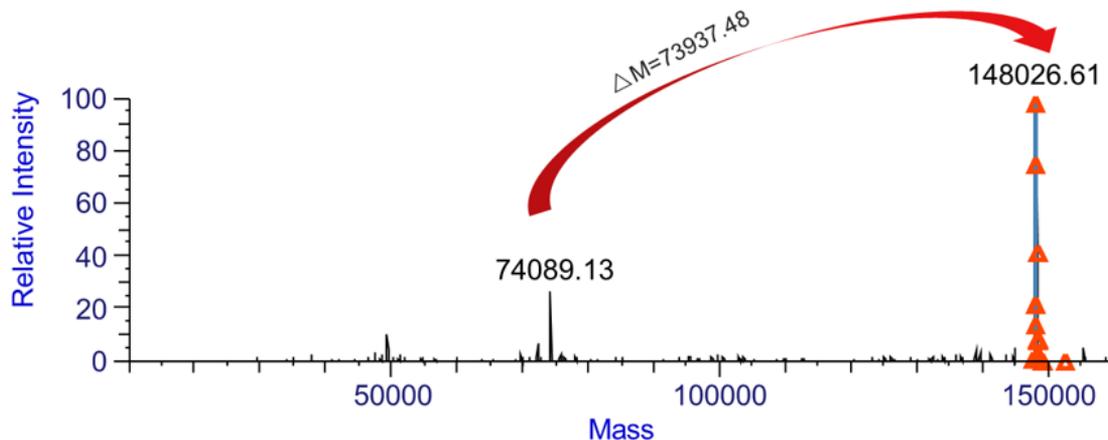


图12 帕博丽珠单抗碱峰区域的片段

3.3.6 阿替丽珠单抗电荷变异体

图13是阿替丽珠单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在阿替丽珠单抗中检测到两个较为明显的酸碱峰，分别是主峰的glycation修饰和重链末端一个K修饰的形式（表6）。

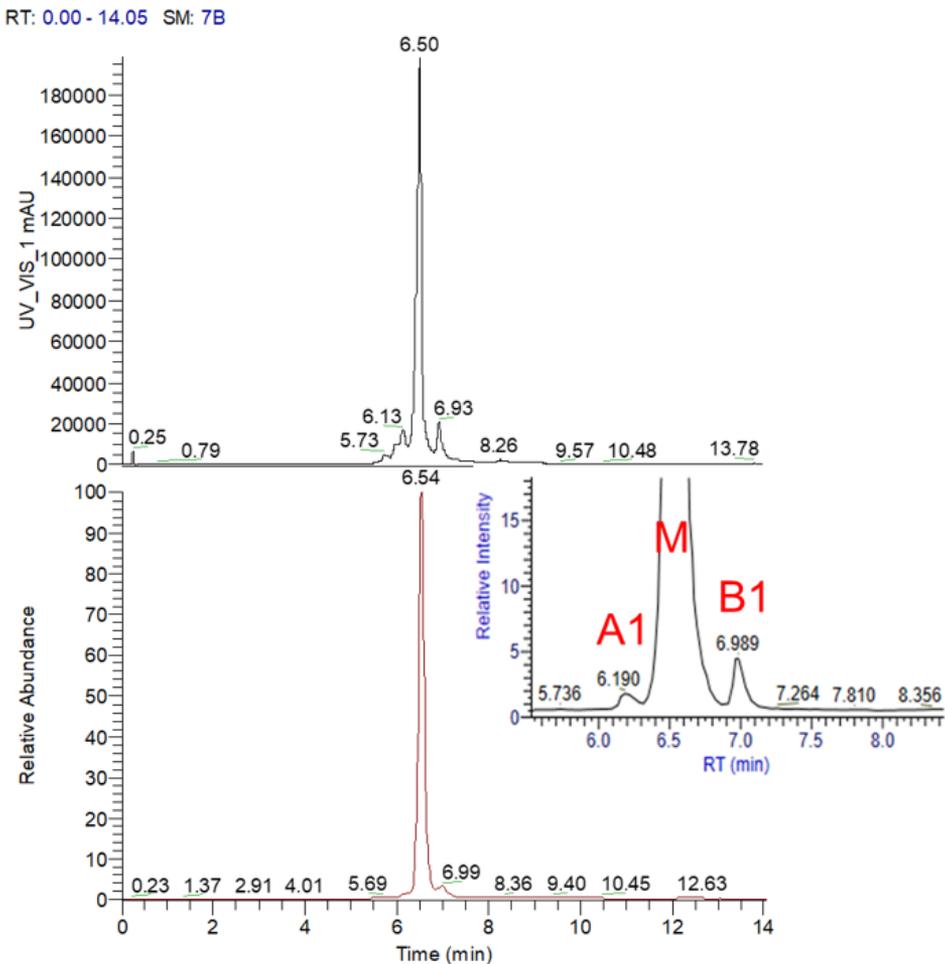


图13 阿替丽珠单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）

表6 阿替丽珠单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A1	Glycation	144518.1	144516.8	6.5
M	-	144355.9	144354.5	5.4
B1	1x Lys	144484.4	144482.6	8.6

--: 没有修饰

3.3.7 地舒单抗电荷变异体

图14是地舒单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在地舒单抗中检测到3个较为明显的酸碱峰，各酸碱峰的识别和质量偏差如表7所示。

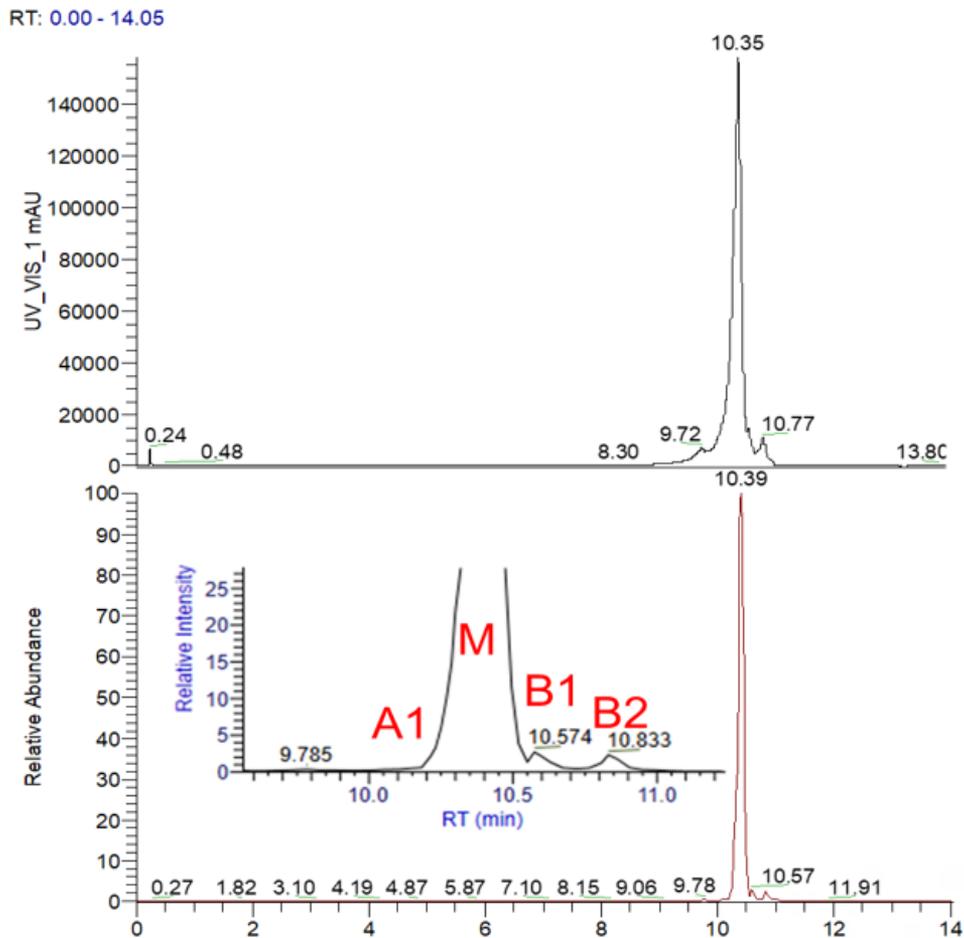


图14 地舒单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）

表7 地舒单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A1	1xA2G0F, 1x A2G1F, Deamidation	146622.08	-	-
M	1xA2G0F, 1x A2G1F	146615.20	146613.13	14.1
B1	2xM5, 1xOxidation	146910.94	146911.35	2.8
B2	1xA2G0F, 1x A2G1F, 1xLys	146744.1	146741.13	20.2

3.3.8 古塞奇尤单抗电荷变异体

图15是古塞奇尤单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在古塞奇尤单抗中检测到2个较为明显的酸碱峰，各酸碱峰的识别和质量偏差如表8所示。

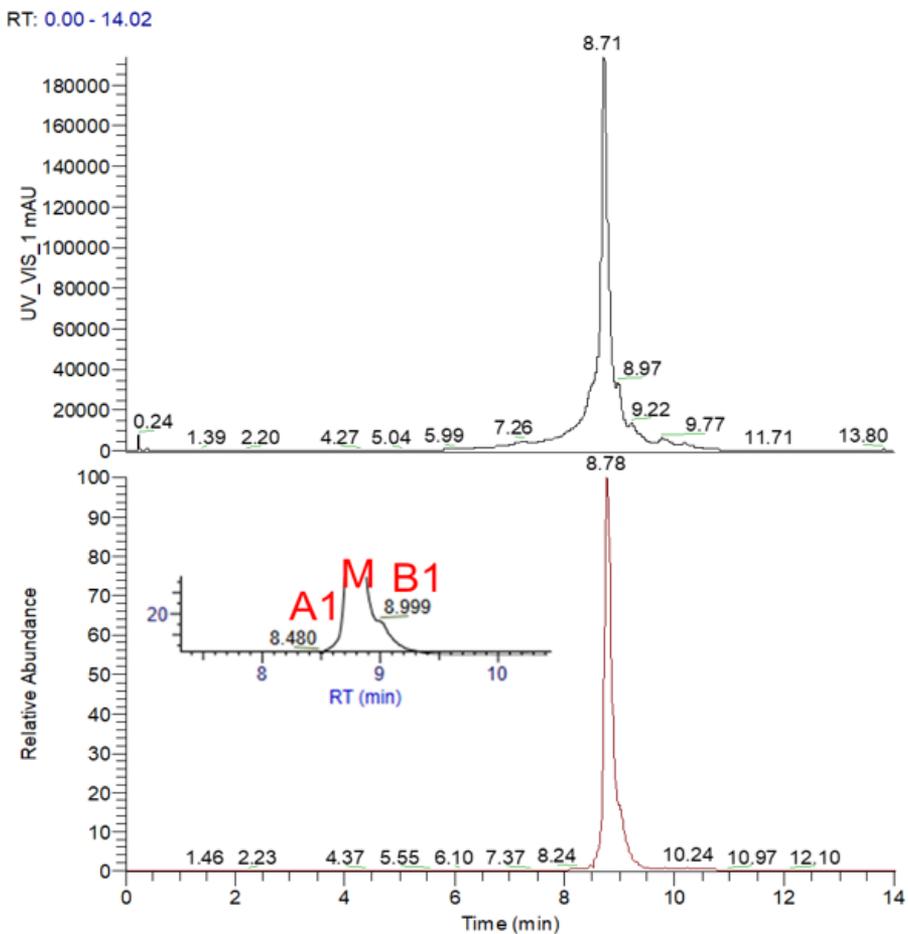


图15 古塞奇尤单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）

表8 古塞奇尤单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A1	1xA2G0F,1xA2G1F, deamidation	146620.16	-	-
M	1xA2G0F,1xA2G1F	146615.42	146613.13	15.6
B1	1xA2G1F ,1x A2G1F,1x Lys	146743.30	146741.30	13.6

3.3.9 利妥昔单抗电荷变异体

图16是利妥昔单抗电荷变异体分析的谱图，上图为UV检测结果，下图为相应的TIC图。在利妥昔单抗中检测到2个较为明显的酸碱峰，各酸碱峰的识别和质量偏差如表9所示。

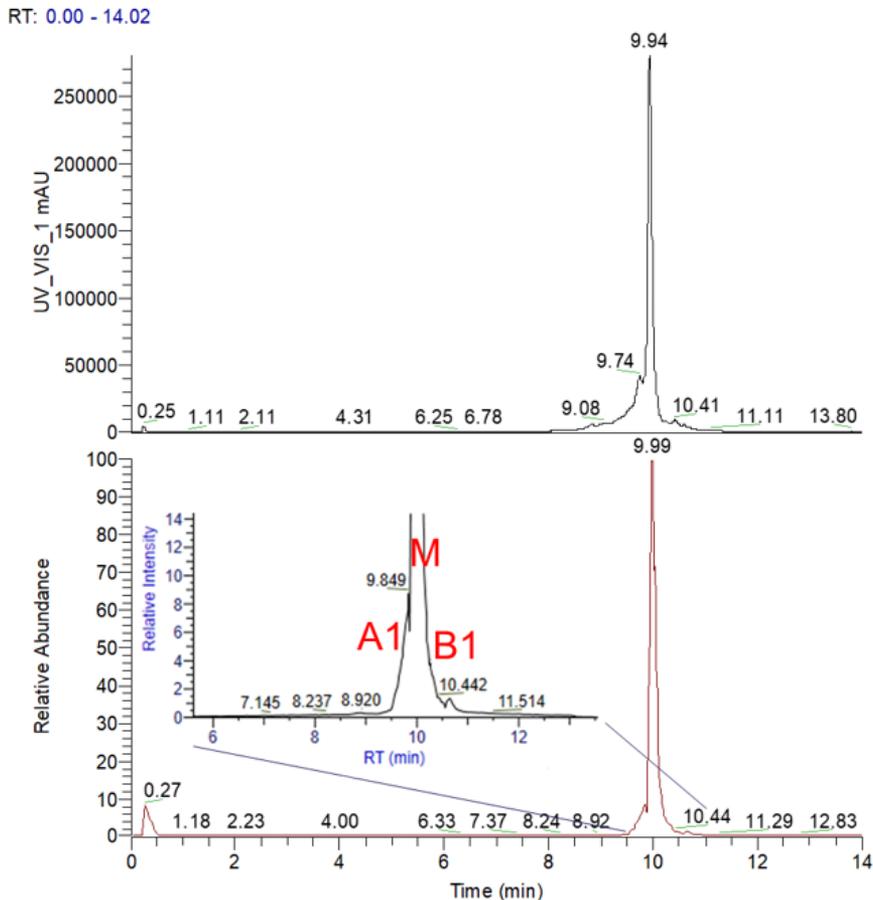


图16 利妥昔单抗电荷变异体分离图，UV检测（上）和TIC图（下）

表9 利妥昔单抗酸碱变异体解析

组分	修饰	实测分子量(Da)	理论分子量(Da)	偏差 (ppm)
A1	1xA2G0F,1xA2G1F, deamidation	147242.34	-	-
M	1xA2G0F,1xA2G1F	147239.66	147237.49	14.2
B1	1xA2G1F,1x A2G1F,2x Lys	146864.94	146869.48	30.9

4. 结论及展望

本文以pH梯度的SCX为分离方法，仅需要使用低浓度的挥发性缓冲溶液即可实现单抗及其电荷变异体的洗脱，实现了SCX分离与MS的联用。该方法成功用于9种销量较广的单抗药物的电荷异构体分析。与iCIEF-MS方法相比，该方法在单抗的常规液质表征基础上无需添加仪器设备，即可运行。此外SCX色谱柱分析100针以上仍然具有较好的重复性和分离度，是iCIEF耗材寿命无可匹敌的。与在线二维方法相比，该方法更简单，无需搭建复杂的硬件系统和方法设置即可实现电荷异构体的表征。但受缓冲空白的影响，部分抗体的分离度仍有提升空间，后期将进一步尝试变化梯度曲线获得更好的分离度。

参考文献

- [1] B. Demirdirek, W. Lan, D. Qiu, W. Ding, L.K. Iyer, M.S. Bolgar, J.J. Valente, Comparison of imaged capillary isoelectric focusing and cation exchange chromatography for monitoring dextrose-mediated glycation of monoclonal antibodies in infusion solutions, *Journal of Chromatography B*, 1105 (2019) 156-163.
- [2] S. Fischer, J. Hoernschemeyer, H.-C. Mahler, Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70 (2008) 42-50.
- [3] C. Gstöttner, D. Reusch, M. Haberberger, I. Dragan, P. Van Veelen, D.P. Kilgour, Y.O. Tsybin, Y.E. van der Burgt, M. Wuhrer, S. Nicolardi, Monitoring glycation levels of a bispecific monoclonal antibody at subunit level by ultrahigh-resolution MALDI FT-ICR mass spectrometry, *MAbs*, Taylor & Francis, 2020, pp. 1682403.
- [4] A.W. Jacobitz, A.B. Dykstra, C. Spahr, N.J. Agrawal, Effects of buffer composition on site-specific glycation of lysine residues in monoclonal antibodies, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109 (2020) 293-300.
- [5] M. Butko, H. Pallat, A. Cordoba, X.C. Yu, Recombinant Antibody Color Resulting from Advanced Glycation End Product Modifications, *Analytical Chemistry*, 86 (2014) 9816-9823.
- [6] K. Diepold, K. Bomans, M. Wiedmann, B. Zimmermann, A. Petzold, T. Schlothauer, R. Mueller, B. Moritz, J.O. Stracke, M. Mølhøj, Simultaneous Assessment of Asp Isomerization and Asn Deamidation in Recombinant Antibodies by LC-MS following Incubation at Elevated Temperatures, *PLoS ONE*, 7 (2012) e30295-.
- [7] Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98 (2010) 3509-3521.
- [8] F. Füssl, K. Cook, K. Scheffler, A. Farrell, S. Mittermayr, J. Bones, Charge variant analysis of monoclonal antibodies using direct coupled pH gradient cation exchange chromatography to high-resolution native mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 90 (2018) 4669-4676.
- [9] M. Tassi, J. De Vos, S. Chatterjee, F. Sobott, J. Bones, S. Eeltink, Advances in native high-performance liquid chromatography and intact mass spectrometry for the characterization of biopharmaceutical products, 41 (2018) 125-144.
- [10] K. Lorenzen, E.v. Duijn, Native Mass Spectrometry as a Tool in Structural Biology, *Current Protocols in Protein Science*, 62 (2010) 17.12.11-17.12.17.
- [11] W. Li, B. Yang, D. Zhou, J. Xu, W. Li, W.-C. Suen, Identification and characterization of monoclonal antibody fragments cleaved at the complementarity determining region using orthogonal analytical methods, *Journal of Chromatography B*, 1048 (2017) 121-129.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

thermo scientific