

单克隆抗体药物质量分析质谱技术研究进展

朱文文[#], 李梦林[#], 张金兰^{*}

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 单克隆抗体 (简称单抗) 药物的研究和开发是一个快速发展的领域, 从第一代鼠源到第四代全人源单抗, 单抗药物在多种疾病治疗中的疗效和安全性不断提高, 目前我国也进入单抗药物研发的快车道。为规范单抗药物研发与评价, 欧美各国药品监管机构和药典现已开始发布单抗及其生物类似药质量评价试验要求与接受标准。在评价单抗相关产品质量特性或制定质量评价标准时, 质谱技术因具有高灵敏度、分辨率、选择性和特异性, 已经成为单抗质量分析的重要工具。基于质谱技术的单抗药物研究涉及结构表征、杂质分析、药代动力学/药效学研究等。本文综述了现行的单抗药物质量控制要求以及质谱技术在单抗药物质量分析中研究和应用, 为全面表征单抗质量属性的研究提供参考和借鉴。

关键词: 单克隆抗体; 质量评价标准; 质谱技术; 结构表征; 杂质分析; 药代动力学/药效学研究

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)12-2843-11

Development of mass spectrometry technique for quality assessment of monoclonal antibodies

ZHU Wen-wen[#], LI Meng-lin[#], ZHANG Jin-lan^{*}

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The research and development of monoclonal antibodies (mAbs) is a rapidly developing field. From the first generation of murine mAbs to the fourth generation of fully human mAbs, the efficacy and safety of mAbs in the treatment of various diseases have been continuously improved. In order to regulate the development and evaluation of mAbs, drug regulatory agencies and pharmacopeias of America and China have tried to issue feasible test procedures and acceptance criteria for quality evaluation of mAbs and biosimilars. Mass spectrometry (MS) technique with high sensitivity, resolution, selectivity, and specificity has become an important tool to evaluate the quality characteristics of monoclonal antibody-related products or specify mAb quality. The research of MS-based monoclonal antibody study involves structure characterization, impurity analysis, pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD), etc. This review focuses on the current quality control requirements of mAb related products and the development of MS technique for mAb quality characterization and specification. It is expected to provide information and references for evaluating the quality of monoclonal antibodies under research and development.

Key words: therapeutic monoclonal antibody; quality standard; mass spectrometry; structure characterization; impurity analysis; pharmacokinetics/pharmacodynamics

收稿日期: 2020-06-02; 修回日期: 2020-08-07.

基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (药物药效和安全性相关的关键分析新技术研究, 2016-I2M-3-010); 国家重点研发计划 (高灵敏度糖蛋白鉴定方法研发及其在药物杂质分析中的应用, 2018YFF0212504).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 Tel: 86-10-83154880, E-mail: zhjl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0889

抗体是一种由B细胞识别抗原后活化、增殖分化为浆细胞,并由浆细胞合成与分泌的、具有特殊氨基酸序列的,能够与相应的抗原发生特异性结合的免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)分子。免疫球蛋白分为IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 五类^[1]。治疗性单克隆抗体药物(monoclonal antibodies, mAbs)则是一类以IgG为结构基础的大分子糖蛋白类药物,具有复杂的质量属性。自1986年,第一个CD3特异性单抗Muromonab商业化以来,这种快速发展的治疗性生物制剂在心血管疾病、癌症等多种疾病的治疗中发挥了重要作用^[2,3]。随着畅销单抗药物(例如阿达木单抗和曲妥珠单抗)专利相继到期,许多制药公司进入了单抗生物类似药(指在质量、安全性和有效性方面与已获准注册的原研药具有相似性的治疗用生物制品)市场^[4]。迄今为止,已有91种单抗药物通过欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)批准^[5],105种与单抗相关的药物(包括78种单抗药物、25种生物类似药和2种抗体药物偶联物)被美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准^[6]上市。

单抗药物固有的异质性(如电荷异质性和大小异质性),多种翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs),以及在生产工艺、纯化和存储过程中可能发生的质量变化(如杂质或其他污染物增加)都可能对产品安全性和有效性产生显著影响。然而,在单抗药物的整个生命周期中,这些变化通常是不可避免的。

因此,人用药品注册技术要求国际协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)、EMA、FDA、国家食品药品监督管理局(China Food and Drug Administration, CFDA)等机构积极发布技术要求和指南,美国药典(U.S. Pharmacopeia, USP),中国药典(Chinese Pharmacopoeia, ChP)等国家药典制定质量评价标准,明确要求在整个开发和生产过程中评价与控制单抗药物及其生物类似药的质量(表1)。在过去的十年中,随着电离方法、新型仪器和离子激活技术的发展与进步,使得质谱(mass spectrometry, MS)技术的质量准确性和分辨率有了显著的提高,MS技术已经在单抗等生物大分子的质量分析与评价中不可或缺^[7]。本文重点综述近年来单抗药物的结构、影响药物安全性和有效性的质量特性研究进展,欧美和中国监管机构、药典对单抗及其生物类似药的质量控制要求与评价标准,MS技术在单抗药物质量分析中如结构表征、杂质分析等的研究和应用。

1 单抗药物的质量属性

1.1 单抗药物结构与发展变化

单抗药物分子是由两条轻链(light chain, LC)和两条重链(heavy chain, HC)通过非共价键和二硫键链接而成的分子质量约150 kDa的复杂蛋白质(结构如图1^[8]所示)。重链包含一个可变区 V_H 、一个铰链区和

Table 1 Guidelines or guidance for monoclonal antibodies (mAbs) and biosimilars. WHO: World Health Organization; ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; EMA: European Medicines Agency; FDA: Food and Drug Administration; CFDA: China Food and Drug Administration; USP: U.S. Pharmacopeia; ChP: Chinese Pharmacopoeia

Guideline/Guidance	Source	Content
Q6B. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products	ICH	Test procedures and acceptance criteria for biotechnological products such as mAbs
Guideline on Development, Production, Characterisation and Specification for Monoclonal Antibodies and Related Products	EMA	Development, production, characterization and specification for mAbs and related products
Guidance for industry: immunogenicity assessment for therapeutic protein products	FDA	Immunogenicity assessment for therapeutic protein such as mAbs
General Chapter <129> Analytical Procedures of Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies	USP	Purity evaluation for mAbs
General introduction of recombinant monoclonal antibody products for human use	ChP	Production and quality control of mAbs
Q5E: comparability of biotechnological / biological products subject to changes in their manufacturing process	ICH	Comparability of mAbs and other biotechnological products before and after process change
Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs)	WHO	Evaluation of biosimilars
Guideline on Similar Biological Medicinal Products	EMA	Research and development and evaluation of biosimilars
Guidance for industry: scientific considerations in demonstrating biosimilarity to a reference product	FDA	Evaluation of biosimilarity between developed products and reference products
Technical guidelines for research and development and evaluation of biosimilars (Trial)	CFDA	Research and development and evaluation of biosimilars

三个恒定区 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。轻链包含一个可变区 (V_L) 和一个恒定 (C_L) 区。单抗的特异性由其可变区介导, 在可变区里存在高度可变区, 即抗原-抗体结合位点, 称为互补决定区 (complementarity determining region, CDR)。在单抗的铰链区存在两个木瓜蛋白酶切割位点, 用木瓜蛋白酶处理后, 铰链断裂, 释放出的片段由于容易结晶而称为可结晶片段 (fragment crystallizable, Fc), 另一个片段由于存在抗原结合位点而称为抗原结合片段 (fragment of antigen-binding, Fab)^[1]。作为复杂的大分子糖蛋白药物, 单抗药物两条重链的 Fc 片段天冬酰胺 297 位各具有一个高度保守的 N-糖基化修饰位点。

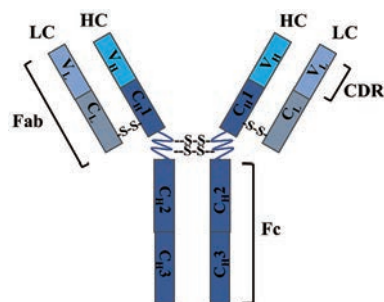


Figure 1 Schematic structural diagram of monoclonal antibodies (mAbs)^[8]. LC: Light chain; HC: Heavy chain; CDR: Complementarity determining region; Fc: Fragment crystallizable; Fab: Fragment of antigen-binding

迄今为止, 单抗药物已经发展到了第四代: 第一代为人鼠嵌合型单抗 (-ximab), 第二代为人鼠嵌合型单抗 (-ximab), 第三代为人源化单抗 (-zumab), 第四代为人源化单抗 (-zumab), 第四代为人源化单抗 (-zumab), 第四代为人源化单抗 (-zumab)。

人源化单抗 (-mumab)^[9]。第一代鼠源单抗由 Köhler 和 Milstein^[10]于 1975 年开发出的杂交瘤技术产生: 在细胞融合技术的基础上, 将能够分泌特异性抗体的小鼠致敏 B 细胞和具有无限繁殖能力的小鼠骨髓瘤细胞融合为 B 细胞杂交瘤, 制备得到的针对一种抗原表位的特异性抗体。由于人体免疫系统能够识别鼠源单抗, 引起人抗鼠抗体 (human anti-mouse antibody, HAMA) 反应, 这不仅让治疗性单抗药物半衰期变短, 疗效减弱, 有时还会引起严重的不良反应, 因此第一代单抗的临床应用受到了很大限制^[11]。随着基因工程技术、转基因技术和噬菌体展示技术的发展, 嵌合单抗^[12]、人源化单抗^[13]、全人源单抗相继出现, 极大地克服了鼠源单抗的各种缺点, 四代单抗药物的结构及特点如图 2^[14]所示。人鼠嵌合单抗是指鼠源单抗的恒定区被人单抗的恒定区所取代, 保留鼠源单抗的可变区序列, 未经改造的可变区的鼠源序列依然可以诱导人体产生 HAMA 反应。人源化单抗是在人鼠嵌合抗体的基础上对鼠源单抗可变区进一步进行人源化改造, 而全人源单抗的可变区和恒定区都是人源的, 可在人源化单抗的基础上进一步去除免疫原性和不良反应。人源化单抗药物和全人源化单抗药物具有显著降低的免疫原性^[15], 全人源化单抗是用于临床治疗的理想抗体药物, 已经成为了治疗性单抗药物发展的必然趋势^[16]。

1.2 影响单抗药物安全性和有效性的质量属性

单抗药物是一类具有高分子量的糖蛋白, 具有复杂的质量属性。而质量属性的微小变化会对产品安全性和有效性产生显著影响, 常见的影响因素有产品有

MAb Type	Murine	Chimeric	Humanized	Human
Suffix	-omab	-ximab	-zumab	-umab
Technology	Hybridoma	Recombinant DNA	Replaced hypervariable regions of human antibodies with their murine counterparts	Transgenic and phage display
First approved mAb	Muromomab	Abciximab	Daclizumab	Adalimumab
Year of FDA Approval	1986	1994	1997	2002
Human component (%)	0	75	95	100
Characteristics	High immunogenic; Induced HAMA; Rapid clearance	Longer clearance times and lower immunogenic	Produce human anti-humanized antibodies; Decreased immunogenicity	Well tolerated, and low risk-to-benefit ratios

Figure 2 Structure and characteristics of four generations mAbs^[14]. HAMA: Human anti-mouse antibody

关杂质和生产工艺有关杂质。产品有关杂质包括糖基化、脱酰胺、异构化、二硫键错配、氧化等变异体,聚集体以及截短形式的分子变异体。而生产工艺有关杂质包括来源于细胞基质的杂质(如宿主细胞蛋白、DNA等)、来源于细胞培养的杂质(如诱导剂、抗生素及其他培养基成分)和来源于下游工艺的杂质(如酶、生化处理试剂和其他析出物)。

糖基化变异体是单抗药物最常见的产品有关杂质之一。单抗药物的糖基化受到由细胞系和生产过程,特别是细胞培养条件的影响。例如NS0细胞会产生 α -1,3半乳糖表位和N-羟乙酰神经氨酸,与仅在人免疫球蛋白中发现的N-乙酰基神经氨酸不同,从而增加了免疫原性^[17]。此外,单抗药物的糖基化修饰类型及水平对其稳定性、清除率、抗体依赖细胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)及补体依赖细胞毒性(complement-dependent cytotoxicity, CDC)等都有一定的影响,例如高水平的唾液酸化可以降低IgG对Fc γ RIIIa的亲合力,从而降低ADCC活性^[18,19];再如缺少核心岩藻糖的糖型能够增强对Fc γ RIIIa受体的亲合力,导致ADCC活性增强^[20,21]。

宿主细胞蛋白(host cell protein, HCP)是单抗药物最常见的生产工艺有关杂质之一。因为大多数治疗性蛋白质在非人哺乳动物细胞系如中国仓鼠卵巢细胞、NS0或SP2/0细胞中表达,这些细胞的内源性蛋白质可能会被人免疫系统识别为外源性的蛋白。HCP杂质属于外源蛋白,即使在很低浓度水平引入人体,也有可能诱发人体免疫排斥反应。因此在单抗药物生产过程中,具有蛋白水解活性的HCP杂质如果不能被充分去除或灭活,则会大大降低产品的回收率、稳定性和功效。并且HCP杂质的聚集所形成的可溶性或不溶性聚集体,也可能引起不良反应或加剧人体对单抗药物的不良反应^[22]。

2 单抗药物及其生物类似药的质量评价与控制要求

单抗药物的质量对其用药安全性和有效性至关重要,质量分析方法和质量控制标准研究和提高贯穿于

抗体药物研发与生产整个过程中。为推动单抗药物及其生物类似药市场的发展,目前,ICH、WHO、EMA、FDA等机构已经发布了一系列技术要求与指南,一些国家的药典(USP和ChP等)也已制定质量评价的标准(表1),明确要求在整个开发和制造过程中严格控制单抗药物及其生物类似药的质量(图3)。

2.1 单抗药物的监管要求

2.1.1 结构鉴定 ICH Q6B指出,单抗药物结构确证一般包括组分测定、物理性质、一级结构与高级结构的测定。一级结构测定是指对单抗氨基酸序列的确定,尽可能地确定自由巯基的数量和位置,测定糖含量(中性糖、氨基糖、唾液酸),并尽可能分析多肽链的糖链结构、寡糖图谱(触角形状)和糖基化位点。EMA发布单抗及相关产品的开发、生产、表征和质量评价标准指导原则,建议进行类别、亚类、轻链组成分析,确定二硫键的完整性,碳水化合物的含量、结构,Fc区糖基化位点的存在与否。如存在则需进行聚糖结构表征,包括甘露糖化、半乳糖化、岩藻糖基化和唾液酸化水平及主要聚糖结构的分布。在2015版《中国药典》人用重组单克隆抗体制品总论^[23]中,规定采用高度特异的、基于分子结构或其他专属性的分析方法,对供试品进行鉴定。关键质量属性中包含糖基化修饰的单抗制品,应在成品检定中采用适宜的方法(如肽图分析)对供试品的糖基化进行检测和控制,测定结果应在规定的范围内。

2.1.2 免疫学特性 单抗药物的抗原结合片段对其免疫学性质至关重要。ICH Q6B建议在可行的情况下,应进行抗体与纯化抗原以及抗原特定区域的结合试验以确定亲合力、亲和性和免疫反应性(包括交叉反应性)。EMA发布的单抗及相关产品的开发、生产、表征和质量评价标准指导原则,建议除结合测定外,应记录不同于预期目标的人体组织的无意反应性/细胞毒性。互补决定区的识别是必不可少的,或者需要证明其合理性。应评价补体结合和激活的能力,和/或其他效应功能。在2015版《中国药典》^[23]中规定,应依据单抗预

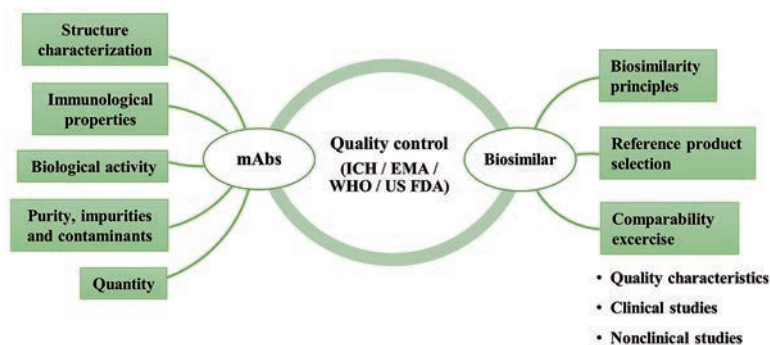


Figure 3 Quality control requirements framework for mAbs and biosimilars

期的作用靶点和作用机制,采用相应的结合活性测定方法和数据分析模式,并将供试品与参比品进行比较,供试品测定结果应在规定的范围内。

2.1.3 生物活性 根据 ICH Q6B, 单抗药物生物学活性评价是与结构确证同等重要的步骤,生物学活性用以描述产品具有可达到预期生物效应的特定能力或效力,它是产品的一种重要特性,应通过体外或体内试验进行评价。用于生物活性测定的方法包括基于动物、细胞培养、生化方法的生物学活性检测方法等。EMA 发布的单抗及相关产品的开发、生产、表征和质量评价标准指导原则指出,若单抗的效应功能对产品安全性和功效有影响,则应酌情提供单抗 ADCC、细胞毒性(如凋亡)、补体结合和激活能力以及其他效应功能的详细信息。《中国药典》^[23]规定依据单抗预期、潜在的作用机制和工作模式,采用相应的生物学测定方法和数据分析模式,并将供试品与参比品进行比较,供试品测定结果应在规定的范围内。

2.1.4 纯度、杂质和污染物 根据 ICH Q6B, 单抗药物的纯度是指预期产品的纯净程度,反映了药物质量的优劣。杂质是指存在于单抗药物中的非预期产品、非产品相关物质或非辅料(包括缓冲液成分)的任何组分。而产品污染物是指引入的非单抗药物生产工艺预期部分的外源性物质(如化学、生化物质或微生物)。为了确定单抗药物的纯度或杂质分布,以及污染物的情况,EMA 在单抗及相关产品的开发、生产、表征和质量评价标准指导原则中指出,应识别潜在的工艺相关杂质并根据需要进行定性定量评价,严格避免或适当控制污染物。USP 通用章节<129>则介绍了通过体积排阻色谱(size exclusion chromatography, SEC)、毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)和寡糖分析等纯度评价方法,并提供每种方法的验证程序。《中国药典》^[23]规定采用适宜的方法对供试品产品相关杂质进行定量分析、对供试品工艺相关杂质进行检测,其中重点关注单抗分子大小变异体与电荷变异体,要求采用适宜的方法(如 SEC-MS)对单体、聚集体或片段进行定量分析,对不同电荷变异体组分进行鉴别。供试品测定结果应在规定的范围内。

2.1.5 含量 根据 ICH Q6B, 含量一般指蛋白质含量测定,它对生物技术产品及生物制品至关重要。应选择合适的理化或免疫化学方法测定。有时还要证明所得到的定量结果直接与生物学方法的检测结果的相关性,若相关,则在生产过程(如灌装工艺)中可采用含量测定代替生物活性的测定。《中国药典》^[23]规定应根据制品质量属性建立品种特异的含量测定方法,例如确定供试品在 280 nm 波长下的特异消光系数,采用分

光光度法进行总蛋白质含量测定,并建议采用第二种含量测定的绝对溯源方法进行验证,供试品测定结果应在规定的范围内。

2.2 单抗生物类似药的监管要求

开发临床上等效的单抗药物,以证明其与参比产品的可比性,在参比产品的选择、质量特性、临床安全性和疗效等方面面临多重挑战。目前,WHO、EMA 和 FDA 等多个机构已经发布了单抗生物类似药开发相关参考指南(表 1),内容主要涉及生物相似性原则、参比产品选择与可比性研究(图 3)。

2.2.1 生物相似性原则 生物相似性原则包括术语、开发方法、生物相似性基础、用所选参比产品证明生物相似性、简化方法以及监管机构的监管框架。EMA 人类药用产品委员会将生物类似药定义为在欧洲经济区内已获授权的生物医药产品(参比产品)的活性物质。FDA、WHO 和 EMA 相关的基本原则非常相似,即生物类似药是生物制品,需要在全面可比性研究的基础上,在质量特性、生物活性、安全性和功效方面与参比产品建立相似性。在我国,国家食品药品监督管理局药品审评中心于 2015 年发布《生物类似药研发与评价技术指导原则(试行)》,确定了生物类似药的研发与评价框架,旨在规范生物类似药的研发与评价,推动中国生物类似药市场的发展。

2.2.2 参比产品选择 为可比性研究选择的参比产品必须获得许可,提供包括质量、安全性和功效在内的完整支撑数据。对于大多数机构来说,它必须来源于要求生物相似性授权同一地区。当使用其他地区参比产品时,通常需要进行数据桥接,从而在授权参比产品、非授权参比产品和拟开发的生物类似药之间进行质量、非临床或临床并行比较。

2.2.3 可比性研究 根据 ICH Q5E, 可比性研究是证明拟开发的生物类似产品相似性的关键要素,涉及从活性物质到最终产品的表征,先后与参比产品进行逐项头对头比较,然后进行非临床和临床研究。可比性研究的第一步是参比产品的质量特性分析(如 2.1 项所述),包括结构鉴定、生物学活性、含量测定等,以建立拟开发的生物类似药目标产品的质量框架(quality target product profile, QTPP)。而非临床和临床研究的目的是为了解释质量特性研究中观察到的差异,根据不同情况,涉及的非临床和临床研究可能包含:药代动力学(pharmacokinetics, PK)研究、药效学(pharmacodynamics, PD)研究、PK/PD 研究、临床有效性研究、特异的安全性研究、免疫原性研究和药物安全警戒研究^[24]。

3 基于质谱技术的单抗药物质量分析研究

根据监管机构和各国药典的相关规定,在评价单

抗相关产品的质量特性或制定质量评价标准时, MS 技术因具有高灵敏度、选择性、特异性和分辨率的特点, 已经成为单抗药物质量分析的重要支撑技术。目前, 质谱主要用于单抗药物分析的五个方面: ① 利用 MS 技术表征单抗药物的结构和相关杂质等, 分析单抗药物质量属性, 了解单抗药物的理化性质; ② 基于 MS 技术能够分析活性药物成分, 越来越多的 PK/PD 研究将 MS 技术用作配体结合方法的补充^[7]; ③ 基于 MS 技术开展可比性研究, 以证明工艺变更不会导致质量、安全性、有效性方面的变化; ④ 利用 MS 技术进行掺假分析可用于监控疑似假药或质量下降的药品批次, 以确保产品安全; ⑤ 可以通过在单抗药物早期开发中使用 MS 技术来完成工艺改进, 以确保实现产品关键质量属性 (critical quality attribute, CQA) 的一致性^[25,26]; 本文重点介绍质谱技术在单抗药物结构表征、杂质分析和 PK/PD 研究中的作用 (图 4)。

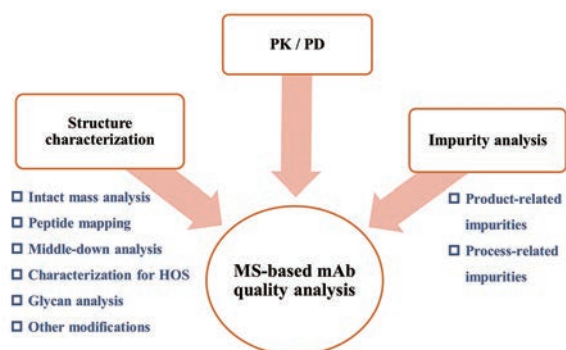


Figure 4 Mass spectrometry (MS)-based mAb quality analysis. PK/PD: Pharmacokinetics/Pharmacodynamics; HOS: High-order structure

3.1 结构表征

3.1.1 完整质量分析 完整质量分析的蛋白质类样品制备以破坏最小、保证完整结构为原则, 使得翻译后修饰得以保留。通过基质辅助激光解吸电离和电喷雾电离 (electrospray ionization, ESI) 后, 对完整蛋白质离子进行质量测量, 可以根据预期和测量的完整质量确定分子的组成^[27]。随着电离方法和仪器 (如 nESI) 的改进, 完整的蛋白质聚糖分析可鉴定聚糖变体, 实现单抗药物最丰富糖型的半定量测定^[28]。自上而下 (top-down) 是在完整质量分析后直接碎裂单抗药物, 可提供有关单抗药物氨基酸序列, PTMs 和特定蛋白亚型的信息^[29]。但自上而下分析需要具有高分辨率和质量准确性的高性能质谱仪进行可靠的单抗药物结构表征。另外蛋白混合物的大规模分离对在线 LC-MS/MS 分析仍是一个挑战, 因此大多数自上而下分析侧重于用亲和纯化收集的小规模、高度纯化的样品^[30]。

3.1.2 肽图分析 基于 MS 技术的抗体药物的肽图分析是除完整质量分析外使用最广泛的技术。肽图分析是一种自下而上 (bottom-up) 的方法, 用于确定单抗的一级结构。该方法包括酶解、还原和烷基化, 基于 LC 或 CE^[31] 进行肽分离, 联用 MS 和/或 MS/MS 进行多肽的鉴定和定量分析。胰蛋白酶是最常用的消化酶, 其他提供有限蛋白水解作用的酶 (例如 LysC、GluC 和 Asp-N) 可用于增强序列覆盖率^[32]。通常使用反相液相色谱结合 ESI-MS 分离分析单抗酶切产物, 将分析物与参比标准品肽图谱 (峰位移和其他差异) 进行比较, 可以鉴定 PTMs, 并确定二硫键模式。这种技术是高度特异性的, 因此可用于各种 PTMs 的分析^[33]。通过 LC-MS 进行的肽图分析可用于变异体分析^[34], 能够在单抗药物的开发和表征中控制和监测序列变异体。在单抗中经常观察到末端变异 (例如 C 末端赖氨酸剪切和 N 末端焦谷氨酸盐形成), 通过与未修饰的末端肽进行比较, 可以很容易地通过肽图分析进行监测。

3.1.3 自中而下的结构表征 自中而下 (middle-down) 分析是一种新兴的方法, 可以作为单抗完整质量分析和肽图分析的补充^[8]。这种方法利用具有最少切割位点的消化酶, 如木瓜蛋白酶和 IdeS, 在 MS/MS 测序之前将单抗切割成更易于分析的亚基 (分子量约 25~50 kDa)。与自上而下分析相比, 自中而下分析时酶切产生的单抗亚基较小, 可实现更好的色谱分离和电离效率。因此, 这种方法克服了质谱仪可测定质量范围的限制, 能够有效获得单抗亚基的质量信息。与自下而上分析相比, 自中而下分析样品制备相对操作步骤少, 可限制人为因素的引入, 并保留单个 PTM 和组合 PTMs。自中而下分析由于其高的肽序列覆盖率 (取决于碎裂方法, 可高达 100%), 且能在整个分析过程中保留 PTM, 因此非常适合鉴定单抗修饰 (如糖基化、氧化和磷酸化等)^[35]。之前的一项研究^[36]还评价了自中而下 LC-MS 在确定单抗药物片段序列同源性的能力。将阿达木单抗、贝伐单抗和曲妥珠单抗的等摩尔混合物使用 IdeS 酶切, 酶切产物在 orbitrap 质谱仪上进行 LC-MS 分析, 证实具有高序列同源性的片段 (3 种单抗药物的 Fc/2 片段, 序列同源性高于 90%) 共洗脱, 而其他片段均被分离。

3.1.4 高级结构的表征 目前, 基于 MS 的蛋白质高级结构 (high-order structure, HOS) 分析方法包括: 非变性电喷雾 (native-ESI), 离子淌度 (ion mobility, IM) MS、氘交换 (hydrogen deuterium exchange, HDX) MS 和化学交联的方法。

Native-ESI 法是在能够使蛋白保持非变性状态的溶液 (水溶液; 在生理 pH 值) 条件下, 使用软电离方法 (ESI) 将蛋白质引入质谱, 可使蛋白质飞入气相而不会

干扰它们的非共价相互作用^[37]。离子淌度分离可以与MS偶联,根据离子的大小与电荷之比来分离离子,以增加 m/z 之外的另一个分离维度。这种技术可以分辨具有相似或相同分子量的不同构象的离子。已有研究^[38]报道了IM-MS技术具有在碰撞诱导解折叠后基于抗体二硫键和糖基化模式区分抗体亚型的能力,糖基化的抗体亚型表现出更长的IM漂移时间,并需要更高的碰撞电压才能展开。

HDX-MS原理是蛋白质中不稳定的氢原子可与重水溶液中的氘原子发生交换,利用氢氘交换变化曲线的差异,可得出蛋白质空间结构(氢键)或者结构动态变化信息。蛋白质表面的主链酰胺氢键结合较弱且交换速度很快,而内核中的氢则受到保护且交换速度较慢。对酰胺氢交换速率的测量可以揭示有关蛋白质溶液构象和动力学、蛋白质-配体结合、蛋白质-蛋白质相互作用的信息,还可以进行表位作图。HDX-MS通常采用自下而上分析的方法,可以揭示有关整体和局部构象状态的详细信息,包括聚糖的结构效应和产品稳定性^[39]。自上而下HDX-MS法可用于分析蛋白质的单体和寡聚体,并评价PTM对HOS的影响,但该方法尚未像自下而上HDX-MS法进行深入研究。单抗CDRs中色氨酸和甲硫氨酸的氧化^[40]可导致治疗性单抗药物的HOS、热稳定性和受体结合亲和力发生变化。Yan等^[41]进行的HDX-MS研究证实了mAb1模型的CDR中的Asp异构化和Met氧化引起局部和整体构象的变化。

用于高级结构表征的另一种MS方法是化学交联质谱(cross-linking mass spectrometry, XL-MS)分析,可以使用双功能交联剂(已知长度)在蛋白质水平或装配水平进行交联,该双功能交联剂共价连接物理邻近的氨基酸残基。对交联部分进行酶解,随后进行LC-MS/MS分析,可以揭示交联位点的确切位置。XL-MS的应用包括蛋白质复合物的分子建模、相互作用位点和结构的鉴定以及功能研究^[42]。尽管XL-MS并未广泛用于治疗性单抗药物结构表征,但这项技术可能提供有价值的HOS信息,在蛋白结构生物学领域具有广阔的发展前景。

3.1.5 聚糖分析 糖基化是单抗主要的翻译后修饰之一,如前所述,糖基化对蛋白质的稳定性、构象、结合亲和力和活性有着重要影响,经常作为CQA的监测项目。MS通常通过以下三种主要方法对糖基化位点、组成和支链进行表征:附着的聚糖分析、游离的聚糖分析和单糖分析^[43]。附着的聚糖分析能够提供完整水平上存在的主要糖型信息,可以通过完整质量、肽图分析或自中而下法进行分析。尽管完整的质量分析可用于确定蛋白质的主要糖型,但难以确定多个糖基化位点和进行

位点特异性分析,此时则需要采用自下而上的方法^[44]。

游离的聚糖分析需要使用内切糖苷酶(如PNGase F)从完整单抗切割聚糖,然后通常用荧光团标记还原末端,常用的标记试剂有2-氨基苯甲酸(2-aminobenzoic acid, 2-AA)、2-氨基苯甲酰胺(2-aminobenzamide, 2-AB)等,并通过LC-FLD-MS进行分析^[45]。对聚糖支链的进一步分析需采用多级质谱(MS^n)技术,可以提供聚糖相对定量和连接信息^[46]。外切糖苷酶可用于从非还原末端顺序切割聚糖,以验证连接信息。相关的自动化LC-MS方法也已有报道^[47],即利用微流体单抗-糖芯片,在固定化PNGase F在线去糖基化之前将糖蛋白保留在捕集柱上,在多孔石墨碳柱上分离游离聚糖然后进行MS分析。单糖分析是通过水解寡糖,然后分离和定量组成聚糖的单糖。高效阴离子交换色谱结合脉冲安培检测法是分析游离单糖的经典方法(USP<1084>),可通过分离单糖来获得聚糖的组成信息而无需衍生化单糖,能够获得每种单糖的相对定量信息。鉴定和定量单糖的另一种方法是,通过易于检测的荧光团标记进行还原胺化来修饰单糖,从而实现高灵敏度检测并改善单糖分离。基于气相色谱-质谱联用、CE和结合紫外检测的高效液相色谱分离等技术进行单糖分析,从而测定聚糖的组成和链接方式^[48,49]。根据不同的研究对象和目的,可单独或组合使用上述三种聚糖分析方法,在单抗药物开发过程中监控糖基化的程度和一致性。

3.1.6 其他修饰分析 治疗性单抗药物中最常见的PTMs可分为三大类:裂解(如C-末端赖氨酸裂解和N-末端焦谷氨酸盐形成)、连接(如氧化、脱酰胺、异构化)和交联(如二硫键)^[50]。除上述糖基化修饰外,完整质量分析、肽图分析和自中而下法还可用于分析其他PTMs。肽图分析适用于鉴定由PTM引起的小分子量变化,如脱酰胺和甲硫氨酸氧化,也适用于鉴定核心蛋白上这些修饰的位点。天冬酰胺脱酰胺作用检测难度较大,因为它会导致天冬氨酸、异天冬氨酸和琥珀酰胺的修饰。已有研究使用基于电子转移解离/电子捕获解离技术的MS方法通过诊断碎片($c+58$)和($z-57$)区分了异天冬氨酸和天冬氨酸。完整质量分析也可用于鉴定PTM,但确定修饰位点仍然具有挑战性^[51]。

3.2 杂质分析

3.2.1 产品有关杂质分析 当抗体经受极端温度和pH值、光照、氧化剂和葡萄糖水平升高等条件时,可能产生聚集体、肽裂解、脱酰胺化、甲硫氨酸氧化和糖化等产品有关杂质,可以通过有意施加极端条件人为导致强制降解杂质产生^[52]。在开发过程中,MS分析通常与强制降解试验结合,以识别潜在的降解途径和潜

在的CQA, 从而提供对治疗剂长期稳定性、效价或免疫原性的详细信息。目前, 由于各种极端因素(如高温、光照)引起的单抗药物聚集已被广泛研究^[53,54]。SEC常用于根据单抗药物聚集体大小测量和分离聚集体^[55], 但还需要其他分析技术鉴定这些分离的聚集体。分子量测定是单抗药物寡聚体鉴定和表征的常规项, SDS-PAGE和在线多角度激光散射检测是测定聚集体分子量的常用技术, 但这两种方法的质量准确度都相对较低^[56]。利用MS技术可以克服这一缺陷, 精确地测定蛋白质及其聚集体的分子量, 例如, Native ESI-TOF MS能够保持四级蛋白质结构、维持非共价蛋白质相互作用, 并且理论上其质量范围不受限制, 因此特别适用于完整蛋白质聚集体的结构表征^[57]。

3.2.2 生产工艺有关杂质分析 HCP杂质是在用于生产单抗药物的细胞系统中发现的杂质, 是一种常见的生产工艺有关杂质。传统上, 酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是最广泛用于总HCP杂质定量的方法。ELISA比LC-MS具有更高的灵敏度、通量和简便性, 但不能识别单个蛋白质或区分蛋白质亚型。通过LC-MS鉴定HCP杂质时, 可以优化生产工艺并改进纯化方法, 以将单抗药物中的HCP杂质水平降至最低。质谱的数据依赖性采集技术, 数据非依赖性采集技术, 包括所有理论质谱图的连续窗口采集(SWATH)和MS^F(无预选的连续碎裂), 在HCP杂质分析中越来越常用^[58,59]。其中, 数据非依赖性采集技术可以帮助更好地识别和表征复杂的HCP杂质, 但通常需要花费大量时间才能建立可靠的HCP肽谱库, 除非使用可控的色谱条件生成HCP肽谱库, 否则这些方法将难以在不同实验室之间转移。另一种分析策略是通过在样品制备过程中消耗药物分子来富集HCP杂质以提高HCP杂质检测灵敏度。最近, 已有研究^[60]通过使用阴离子去污剂来分离HCP杂质与抗体之间的相互作用, 证明了一种截留分子量富集的方法可以提高低分子量HCP杂质的检测灵敏度。另一项研究^[61]基于亲水相互作用色谱进行HCP杂质富集, 然后在LC-MS分析之前进行原位浓缩和酶解, 这种方法能够检测NISTmAb(RM 8671)中的HCP杂质。

3.3 PK/PD研究

PK/PD研究是药物开发研究的重要内容^[62], 也是评价药物对靶标生物影响的指标。LC-MS因其高特异性和灵敏度而被广泛用于小分子药物的PK/PD研究中。但是, 由于缺乏同位素标记的标准品和酶水解的可变性, 这种技术在单抗等生物大分子PK/PD研究中的应用受到限制。传统上, 配体结合实验(ligand binding assays, LBAs)由于高度自动化且灵敏度较高,

已广泛用于单抗等生物治疗产品的PK/PD研究。但采用LBA(例如ELISA或HPLC-UV)法定量单抗药物缺乏特异性、容易发生交叉反应、并且易受来自内源蛋白, 抗药物抗体和可溶性靶标配体的干扰^[63]。随着MS仪器改进和样品制备自动化技术的发展, 基于LC-MS/MS技术进行治疗性单抗药物的PK/PD研究, 已成为LBA的重要补充。

基于LC-MS/MS定量单抗药物的自动化方法, 大多数都通过酶水解单抗药物, 选择一种或多种具有特征序列的代表性肽(特征肽)进行定量。多维色谱法或免疫富集可用于将目标单抗药物与内源基质的单抗药物分离, 增加分析的特异性和灵敏度。液相色谱与基于三重四极杆的多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)联用技术是定量分析的最常用技术。Zhang等^[64]通过在自动化样品制备平台对目标单抗药物进行免疫亲和纯化与酶解, 基于LC-MRM方法成功鉴定出特征肽以定量食蟹猴血清中的人IgG1单抗药物。LBA方法与LC-MS分析的组合能够兼顾结合选择性和仪器定量多种蛋白质的互补优势。Liu等^[65]最近证明了LBA-LC-MS/MS方法可以在体内准确定量抗体药物偶联物(具有不同药物-抗体比)中具有生物活性的细胞毒性负载分子。LBA-LC-MS/MS方法为复杂生物基质中单抗药物的分析, 尤其是高度异构的单抗药物, 提供了出色的选择性、良好的准确性和精密度以及宽的动态范围, 可以为PK/PD研究提供全面的信息。

4 展望

单抗药物是目前发展最为迅速的蛋白类药物之一, 随着全人源单抗的出现, 其在治疗各种心血管疾病、癌症、呼吸系统疾病、血液病、自身免疫性疾病和感染方面的疗效和安全性都得到了提高。但由于单抗药物具有复杂的质量属性, 药物质量属性的变化不仅会影响产品的生物活性, 甚至可能产生毒性或免疫原性。为保证产品质量和一致性, ICH、WHO、EMA、FDA等机构积极发布技术要求与指南, USP和ChP等制定质量评价标准, 明确要求在整个开发和制造过程中技术要求与指南严格控制单抗药物及其生物类似药的质量(包括理化结构特征、纯度和杂质的确证等)。尽管各国监管机构对于单抗药物及其生物类似药的技术要求与指南存在差距, 部分质量特性相关的质量评价标准仍不明确, 但这些机构正在努力与完善的机构保持监管规范的一致性, 力求制定科学合理的质量标准。在评价单抗药物相关产品的质量特性或制定质量标准时, MS技术因高灵敏度、选择性、特异性和分辨率的特性, 已经成为单抗质量分析的重要工具。MS技术在单抗药物的结构表征(完整质量分析、肽图分析、高级

结构表征、聚糖分析等)、杂质分析(聚集体、HCP等)和PK/PD研究中发挥了重要作用。本文综述的单抗药物结构与发展历程、影响单抗药物安全性和有效性的因素、单抗药物质量特性检测方法和可接受标准、质谱技术在单抗药物质量分析中的应用,有助于理解单抗药物的发展与监管现状,也为后续全面表征单抗药物质量属性的研究提供支持。

作者贡献: 共同第一作者对这项工作做出了同样的贡献。朱文文负责文献查阅、数据整理、文章作图与撰写;李梦林负责文献查阅和数据整理;张金兰负责综述撰写框架内容的确定和文章审核。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6: 343-357.
- [2] Singh S, Tank NK, Dwiwedi P, et al. Monoclonal antibodies: a review [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2018, 13: 85-99.
- [3] Zhao CX, Hu ZW, Bing C. Recent advances in monoclonal antibody-based therapeutics [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 837-847.
- [4] Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37: 9-16.
- [5] European Medicines Agency, European public assessment reports [R]. [https://www.ema.europa.eu/en/medicines/download-medicine-data#european-public-assessment-reports-\(epar\)-section](https://www.ema.europa.eu/en/medicines/download-medicine-data#european-public-assessment-reports-(epar)-section).
- [6] Food and Drug Administration. Purple Book: lists of licensed biological products with reference product exclusivity and biosimilarity or interchangeability evaluations [DB/OL]. Silver Spring, MD, 2016. <https://www.fda.gov/media/89426/download>.
- [7] Görög S. Identification in drug quality control and drug research [J]. *Trends Analyt Chem*, 2015, 69: 114-122.
- [8] Lermyte F, Tsybin YO, O'Connor PB, et al. Top or middle? up or down? toward a standard lexicon for protein top-down and allied mass spectrometry approaches [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2019, 30: 1149-1157.
- [9] Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2012, 12: 615-622.
- [10] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity [J]. *Nature*, 1975, 256: 495-497.
- [11] Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005, 54: 11-29.
- [12] Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ. Production of functional chimaeric mouse/human antibody [J]. *Nature*, 1984, 312: 643-646.
- [13] Jones PT, Dear PH, Foote J, et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse [J]. *Nature*, 1986, 321: 522-525.
- [14] Rodgers KR, Chou RC. Therapeutic monoclonal antibodies and derivatives: historical perspectives and future directions [J]. *Biotechnol Adv*, 2016, 34: 1149-1158.
- [15] Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006, 58: 640-656.
- [16] Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9: 767-774.
- [17] Ghaderi D, Taylor RE, Padler-Karavani V, et al. Implications of the presence of *N*-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins [J]. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 863.
- [18] Boyd P, Lines A, Patel A. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H [J]. *Mol Immunol*, 1995, 32: 1311-1318.
- [19] Scallon BJ, Tam SH, McCarthy SG, et al. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality [J]. *Mol Immunol*, 2007, 44: 1524-1534.
- [20] Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting *N*-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 3466-3473.
- [21] Ferrara C, Grau S, Jäger C, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγR III and antibodies lacking core fucose [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 12669-12674.
- [22] Fischer SK, Cheu M, Peng K, et al. Specific immune response to phospholipase B-like 2 protein, a host cell impurity in lebrizumab clinical material [J]. *AAPS J*, 2017, 19: 254-263.
- [23] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol 3. 2015 Ed. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 41-43.
- [24] Na NA. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997) [J]. *J Immunother*, 1997, 20: 214-215.
- [25] Hmiel LK, Brorson KA, Boyne MT. Post-translational structural modifications of immunoglobulin G and their effect on biological activity [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 79-94.
- [26] Yu CF, Cao XJ, Wang WB, et al. LC-MS analysis of sintilimab as an anti-PD-1 therapeutic mab for its improved hinge stability study [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 122-129.
- [27] Fornelli L, Damoc E, Thomas PM, et al. Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation orbitrap FTMS [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: 1758-1767.
- [28] Stoeckmann H, Adamczyk B, Hayes J, et al. Automated, High-throughput IgG-antibody glycoprofiling platform [J]. *Anal*

- Chem, 2013, 85: 8841-8849.
- [29] Zhang Z, Pan H, Chen X. Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies [J]. Mass Spectrom Rev, 2009, 28: 147-176.
- [30] Donnelly DP, Rawlins CM, DeHart CJ, et al. Best practices and benchmarks for intact protein analysis for top-down mass spectrometry [J]. Nat Methods, 2019, 16: 587-594.
- [31] Cheng J, Wang L, Rive CM, et al. Complementary methods for *de novo* monoclonal antibody sequencing to achieve complete sequence coverage [J]. J Proteome Res, 2020, 19: 2700-2707.
- [32] Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, et al. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin [J]. Nat Protoc, 2016, 11: 993.
- [33] Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products [J]. Anal Chem, 2013, 85: 715-736.
- [34] Regl C, Wohlschlager T, Esser-Skala W, et al. Dilute-and-shoot analysis of therapeutic monoclonal antibody variants in fermentation broth: a method capability study [J]. MAbs, 2019, 11: 569-582.
- [35] Belov AM, Zang L, Sebastiano R, et al. Complementary middle-down and intact monoclonal antibody proteoform characterization by capillary zone electrophoresis-mass spectrometry [J]. Electrophoresis, 2018, 39: 2069-2082.
- [36] Fornelli L, Ayoub D, Aizikov K, et al. Middle-down analysis of monoclonal antibodies with electron transfer dissociation orbitrap fourier transform mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2014, 86: 3005-3012.
- [37] Terral G, Beck A, Cianféroni S. Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization [J]. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci, 2016, 1032: 79-90.
- [38] Tian Y, Han L, Buckner AC, et al. Collision induced unfolding of intact antibodies: rapid characterization of disulfide bonding patterns, glycosylation, and structures [J]. Anal Chem, 2015, 87: 11509-11515.
- [39] Aoyama M, Hashii N, Tsukimura W, et al. Effects of terminal galactose residues in mannose α 1-6 arm of Fc-glycan on the effector functions of therapeutic monoclonal antibodies [J]. MAbs, 2019, 11: 826-836.
- [40] Dashivets T, Stracke J, Dengl S, et al. Oxidation in the complementarity-determining regions differentially influences the properties of therapeutic antibodies [J]. MAbs, 2016, 8: 1525-1535.
- [41] Yan Y, Wei H, Fu Y, et al. Isomerization and oxidation in the complementarity-determining regions of a monoclonal antibody: a study of the modification-structure-function correlations by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry [J]. Anal Chem, 2016, 88: 2041-2050.
- [42] Chavez JD, Bruce JE. Chemical cross-linking with mass spectrometry: a tool for systems structural biology [J]. Curr Opin Chem Biol, 2019, 48: 8-18.
- [43] Xiao K, Han Y, Yang H, et al. Mass spectrometry-based qualitative and quantitative N-glycomics: an update of 2017-2018 [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1091: 1-22.
- [44] Hart-Smith G, Raftery MJ. Detection and characterization of low abundance glycopeptides *via* higher-energy C-trap dissociation and orbitrap mass analysis [J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2011, 23: 124-140.
- [45] Shang TQ, Saati A, Toler KN, et al. Development and application of a robust N-glycan profiling method for heightened characterization of monoclonal antibodies and related glycoproteins [J]. J Pharm Sci, 2014, 103: 1967-1978.
- [46] Hanneman AJS, Strand J, Huang CT. Profiling and characterization of sialylated N-glycans by 2D-HPLC (HIAX/PGC) with online orbitrap MS/MS and offline MSⁿ [J]. J Pharm Sci, 2014, 103: 400-408.
- [47] Schiel JE, Rogstad SM, Boyne MT. Comparison of traditional 2-AB fluorescence LC-MS/MS and automated LC-MS for the comparative glycan analysis of monoclonal antibodies [J]. J Pharm Sci, 2015, 104: 2464-2472.
- [48] Galermo AG, Nandita E, Barboza M, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry approach for determining glycosidic linkages [J]. Anal Chem, 2018, 90: 13073-13080.
- [49] Varki A, Cummings RD, Esko JD. Essentials of Glycobiology [M/OL]// Mulloy B, Dell A, Stanley P. Structural Analysis of Glycans. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453059/>.
- [50] Silva AMN, Vitorino R, Domingues MRM, et al. Post-translational modifications and mass spectrometry detection [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65: 925-941.
- [51] Hurtado PP, O'Connor PB. Differentiation of isomeric amino acid residues in proteins and peptides using mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Rev, 2012, 31: 609-625.
- [52] Halley J, Chou YR, Cicchino C, et al. An industry perspective on forced degradation studies of biopharmaceuticals: survey outcome and recommendations [J]. J Pharm Sci, 2020, 109: 6-21.
- [53] Mahler HC, Müller R, Friess W, et al. Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 59: 407-417.
- [54] Remmele RL, Callahan WJ, Krishnan S, et al. Active dimer of epratuzumab provides insight into the complex nature of an antibody aggregate [J]. J Pharm Sci, 2006, 95: 126-145.
- [55] Arakawa T, Ejima D, Li T, et al. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals [J]. J Pharm Sci, 2010, 99: 1674-1692.
- [56] Mahler HC, Friess W, Grauschopf U, et al. Protein aggregation: pathways, induction factors and analysis [J]. J Pharm Sci, 2009, 98: 2909-2934.
- [57] Kükreer B, Filipe V, van Duijn E, et al. Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates

- fractionated by size-exclusion chromatography [J]. *Pharm Res*, 2010, 27: 2197-2204.
- [58] Schenauer MR, Flynn GC, Goetze AM. Identification and quantification of host cell protein impurities in biotherapeutics using mass spectrometry [J]. *Anal Biochem*, 2012, 428: 150-157.
- [59] Gillet LC, Navarro P, Tate S, et al. Targeted data extraction of the MS/MS spectra generated by data-independent acquisition: a new concept for consistent and accurate proteome analysis [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2012, 11: O111.016717. DOI: 10.1074/mcp.O111.016717.
- [60] Chen IH, Xiao H, Daly T, et al. Improved host cell protein analysis in monoclonal antibody products through molecular weight cutoff enrichment [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 3751-3757.
- [61] Wang Q, Slaney TR, Wu W, et al. Enhancing host-cell protein detection in protein therapeutics using HILIC enrichment and proteomic analysis [J]. *Anal Chem*, 2020. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c00360.
- [62] Leipold D, Prabhu S. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the design of therapeutic antibodies [J]. *Clin Transl Sci*, 2019, 12: 130-139.
- [63] Dostalek M, Gardner I, Gurbaxani BM, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and physiologically-based pharmacokinetic modelling of monoclonal antibodies [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52: 83-124.
- [64] Zhang Q, Spellman DS, Song Y, et al. Generic automated method for liquid chromatography-multiple reaction monitoring mass spectrometry based monoclonal antibody quantitation for pre-clinical pharmacokinetic studies [J]. *Anal Chem*, 2014, 86: 8776-8784.
- [65] Liu A, Kozhich A, Passmore D, et al. Quantitative bioanalysis of antibody-conjugated payload in monkey plasma using a hybrid immuno-capture LC-MS/MS approach: assay development, validation, and a case study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 1002: 54-62.