综述

质谱法快速表征抗体药物结构的研究进展

李佳婧[1,2]，刘　巧[1]，温学美[1]，魏京京[3*]，潘红娟[1*]

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 萍乡市食品药品检验所，江西萍乡 337000；3. 中国食品药品检定研究院，北京 102629）

摘要：抗体药物因特异性强、不良反应小等优点，在肿瘤、自身免疫病等疾病的临床治疗中发挥了巨大作用。随着抗体药物研发和生产的迅猛发展，加速抗体药物结构表征以缩短研发周期和生产时间，确保用药安全性和有效性的需求变得越来越迫切。目前，高通量和自动化已成为快速结构表征的发展趋势。质谱技术在生物大分子药物复杂的质量属性监测中表现出明显的优势，特别是高分辨质谱在大分子药物结构表征中发挥着越来越重要的作用。该文综述了质谱联用技术分析抗体药物结构的新策略，以期减少样品前处理过程、加快抗体表征效率、加速上游药物的研发，为抗体药物快速、全面的质量监测提供一些有益参考。

关键词：抗体药物；结构；表征；快速；质谱；研究进展

中图分类号：R917；O657.63；TQ464.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)03-0315-13

引用：李佳婧，刘　巧，温学美，等．质谱法快速表征抗体药物结构的研究进展［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(3): 0315-0327．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.03.005

Research Progress of Rapid Characterization of Antibody Drug Structures by Mass Spectrometry

LI Jiajing[1,2], LIU Qiao[1], WEN Xuemei[1], WEI Jingjing[3*], PAN Hongjuan[1*]

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Pingxiang Institute for Food and Drug Control, Pingxiang 337000; 3. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629*)

ABSTRACT: Antibody drugs have played a significant role in the clinical treatment of diseases such as tumors and autoimmune diseases, owing to their strong specificity and minimal adverse reactions. With the rapid development of antibody drug research and production, the need to accelerate structural characterization to shorten the research and production cycle, and to ensure the safety and efficacy of drugs, is becoming increasingly significant. High throughput and automation are currently the development trends for rapid structural characterization. Mass spectrometry technology has shown significant advantages in monitoring the complex mass properties of biopharmaceuticals, especially high-resolution mass spectrometry playing an increasingly important role in the structural characterization of macromolecular drugs. This study summarizes multiple new strategies for analyzing the structure of antibody drugs using mass spectrometry, aiming to reduce sample pretreatment processes, accelerate antibody characterization efficiency, and expedite upstream drug development, offering valuable references for rapid and comprehensive quality monitoring of antibody drugs.

Key Words: antibody drug; structure; characterization; rapid; mass spectrometry; research progress

抗体药物具有靶向性高、特异性强以及治疗效果好等优势，已被广泛用作恶性肿瘤、血液病、皮肤病和风湿病等疾病的有效治疗手段[1—2]。随着分子生物学的发展，越来越多的疾病靶标被发现，抗体药物的治疗领域不断扩大，研发与上市数量显著增加（图1），2023年FDA批准上市的53款新药中，生物药占据了40%，其中抗体药物12款（表1），抗体药物已成为全球医药产业中发展速度快、市场前景巨大的领域之一[3]。然而，无论是生产工艺、贮存方式还是流通环节，抗体药物都与小分子化学药物有较大差异。另外，抗体药物剂型多为注射剂或冻干粉针剂，稳定性较差：分子结构具有易水解、氧化、异构化等特征，还存在复杂多样的翻译后修饰（post-translational modifications，PTMs）变异体[4]。ICH、WHO、EMA、FDA等多个监管机构相继提出了抗体药物的质量控制要求，主要包括结构表征、杂质和特定检查；其中，结构表征作为抗体药物质量控制的关键内容，是研究的首要方向。抗体药物的结构表征一般包括组分、物理性质、一级结构和高级结构的测定。常用的表征方法为Edman测序[5—6]、氨基酸序列分析[7]和肽图[8—10]等，存在分析对象范围有限、前处理烦琐（包括脱盐、还原、烷基化及酶解等步骤）和数据处理耗时等问题，降低了分析速度和通量，难以适应抗体药物的快速研发和质控需求。目前，高通量和自动化已成为快速结构表征的发展趋势。

基于质谱（mass spectrometry，MS）的结构表征技术已成为加速药物质量分析的先进策略[11]。随着各种离子化方式的不断发展和成熟，再加上轨道阱（orbitrap）等质量分析器和生物信息数据库的强大支持，高分辨质谱（high resolution mass spectrum，HRMS）技术在生物大分子药物复杂质量属性的检测中表现出明显的优势，成为抗体药物结构特异性表征的有利工具。

本文从MS分析的角度综述抗体药物结构快速表征的新方法，重点关注一级结构的表征，旨在提高产品质量属性或关键质量属性（critical quality attributes，CQAs）的表征效率，降低传统试验方法中人为操作带来的不确定性因素，促进抗体药物的快速开发。

1　抗体药物质量研究技术指南及其研究内容

1.1　相关指导原则与技术要求

ICH、WHO、EMA、FDA、原国家食品药品监督管理总局等机构针对抗体药物质量控制先后发布了系列相关指南原则[12—17]（如表2所示）。FDA于1997年发布的《人用单克隆抗体制品生产及检定考虑要点》（Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use）[12]重点关注对单克隆抗体（monoclonal antibody，mAb）进行结构完整性鉴别，通过结合SDS-PAGE、等电点聚焦（isoelectric focusing，IEF）、HPLC以及MS等合适的理化方法来鉴别片段、聚合物和其他修饰产物。1999年，ICH Q6B《生物技术产品和生物制品的检验方法和可接受标准》（Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products）[13]详述了生物制品的质量控制项目，并明确结构表征内容及分析方法，包括氨基酸序列、氨基酸组成、末端氨基酸序列析、肽图、糖型结构、巯基和二硫键分析。WHO《重组DNA来源的治疗性生物制品质量、安全性和有效性评价指南》（Guidelines on the Quality, Safety, and Efficacy of Biological Medicinal Products Prepared by Recombinant DNA Technology）[14]中明确，mAb的理化鉴定项下主要包括完整相对分子质量、一级结构、高级结构等，建议采用肽图、MS、核磁等方法进行结构表征。2015年发布的《生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）》[15]则更强调对翻译后修饰的定性、定量研究。此外，各国药典也相继出台相关标准来规范生物制药产品的生产

收稿日期：2024-02-27

作者简介：李佳婧（1997—），女，硕士研究生，专业方向：药品质量控制。

通信作者：潘红娟（1976—），女，研究员，硕士生导师，从事药品质量控制研究及新技术和新方法的研究与开发。

E-mail：phj98@126.com

魏京京（1975—），男，副研究员，从事药品质量控制方法研究及评价。

E-mail：weijingjing@nifdc.org.cn

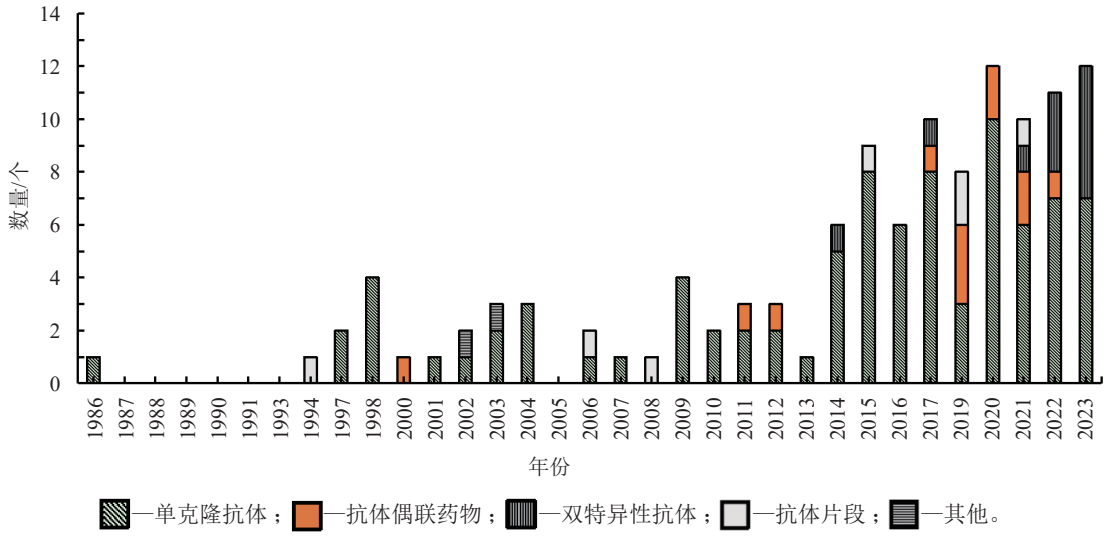


图 1 FDA 历年批准的抗体药物的类型和数量（截至 2023 年 12 月）

Fig.1 Types and Quantities of the Antibody Drugs Approved by FDA over the Years (as of December 2023)

表 1 2023 年 FDA 批准的抗体药物

Tab.1 FDA-approved Antibody Drugs in 2023

批准日期	通用名（商品名）	所属公司	适应证	属性
2023-01-06	lecanemab (Leqembi)	Eisai/Genmab	阿尔茨海默病	Aβ
2023-03-22	retifanlimab (Zynyz)	Incyte	细胞癌	PD1
2023-05-19	Epcoritamab (Epkinly)	Genmab/AbbVie	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	CD20/CD3
2023-06-15	glofitamab (Columvi)	Roche	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	CD20/CD3
2023-06-26	rozanolixizumab (Rystiggo)	UCB	重症肌无力	FcRn
2023-07-17	nirsevimab (Beyfortus)	AstraZeneca/ Sanofi	预防婴幼儿呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV) 感染	RSV
2023-08-09	talquetamab (Talvey)	Genmab/Johnson	多发性骨髓瘤	CD3/GPRC5D
2023-08-14	elranatamab (Elrexfio)	Pfizer	多发性骨髓瘤	BCMA/CD3
2023-08-18	pozelimab (Veopoz)	Regeneron	CD55 缺陷性蛋白丢失性肠病	C5
2023-10-17	bimekizumab (Bimzelx)	UCB	斑块状银屑病	IL-17F/IL-17A
2023-10-26	mirikizumab (Omvoh)	Lilly	溃疡性结肠炎	IL-23p19
2023-10-27	Toripalimab (Loqtorzi)	上海君实生物医药科技股份有限公司 /Coherus	鼻咽癌	PD1

质量。USP 43 通则 <129> 重点关注与 mAb 纯度、免疫学性质和生物活性密切相关的质量属性，如单体、高 / 低分子物质、寡糖相关的分析。ChP 2015 年版新增了“人用单克隆抗体总论”，并在 2020 年版中继续保留，为 mAb 的一般鉴别和糖基化修饰方法提供了指导和要求。

由于抗体药物的质量属性复杂，一级结构存在多种 PTMs，高级结构存在螺旋、折叠以及各种相互作用力，国内外关于抗体药物及类似物的质量控制指导原则均强调采用现有的先进分析手段，从物理化学、免疫学、生物学等多角度表征抗体，以反映目标产品的全面质量属性。建立多属性分析方法 (multi-attribute method，MAM)[18—20] 或建立一套通用分析平台表征抗体药物的 CQAs 也是发展目标之一。

1.2 抗体药物一级结构表征的研究内容

抗体药物的一级结构决定了高级结构并影响其所发挥的生物学功能，是抗体生产和贮存过程质量控制的 CQAs 之一。一级结构表征通常采用 Edman 测序、氨基酸序列分析、肽图法等方法，表征内容

表 2　mAb 及类似物相关的指导原则

Tab.2　Guidelines Related to mAb and Biosimilars

名称	机构	时间	适用范围
Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use[12]	FDA	1997 年	治疗性或诊断性 mAb 及衍生物
Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products[13]	ICH Q6B	1999 年	蛋白质、多肽，包括衍生物和含有这类成分的产品
WHO Guidelines on the Quality, Safety, and Efficacy of Biological Medicinal Products Prepared by Recombinant DNA Technology[14]	WHO	2013 年	利用重组 DNA 技术制备的生物活性蛋白产物
生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）[15]	原国家食品药品监督管理总局	2015 年	治疗用重组蛋白质制品
人用单克隆抗体质量控制技术指导原则 [16]	药品审评中心	2003 年	利用杂交瘤技术制备的 mAb 和利用 DNA 技术制备的基因工程抗体
Guideline on Development, Production, Characterisation and Specification for Monoclonal Antibodies and Related Products[17]	EMA	2016 年	人用 mAb
人用重组单克隆抗体制品总论	ChP 2020 年半三部	2020 年	人用重组 mAb 制品
Analytical Procedures of Recombinant Therapeutic Monoclonal Antibodies	USP 43 通则 <129>	2015 年	用于治疗、预防及诊断的 mAb
Monoclonal Antibodies for Human Use	EP 10.0 通则 <2031>	2017 年	人用 mAb

包括轻链相对分子质量、氨基酸组成及序列测定、N/C- 末端序列、肽图、碳水化合物结构以及多种 PTMs 等。

PTMs 往往导致抗体的各种异质性，但因结构变化微小，分析难度大，故 PTMs 的鉴别在抗体药物质量控制中尤为重要 [21]。抗体药物的 PTMs 主要包括脱酰胺化、氧化、糖基化、末端环化 / 剪切等修饰，其中糖基化修饰是较为常见却复杂的 PTMs 之一。各种糖基化产物的性质差异大，相关表征方法研究报道也较多 [22—25]。mAb 是高度二硫键结合的治疗药物，游离半胱氨酸的存在易诱导蛋白质聚集或非天然的二硫键配对，导致生物治疗药物的潜在效力或免疫原性损失，因此二硫键连接和半胱氨酸相关变异体也是监控的重点之一。表 3 列出了一级结构主要的表征内容、表征方法及特点，目前与质谱联用的技术［如 LC-MS/MS、毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）-MS 等］是主流的分析方法。

2　抗体药物的结构表征策略

在抗体药物的表征分析技术中，基于 MS 的分析技术可提供抗体的主要序列信息（包括 PTMs），也可进行高阶结构及构象的表征。因此，MS 技术贯穿于抗体药物整个生产过程的表征分析中。在蛋

表 3　一级结构的表征内容、常用表征方法与特点

Tab.3　Characterization Contents, Common Characterization Methods and Characteristics of Primary Structure

表征内容	表征方法	特点
相对分子质量	SDS-PAGE，LC-MS，CE-MS	包括完整、还原、切糖、切糖还原相对分子质量。通过与理论值的比较，初步判定抗体序列的正确性
氨基酸组成	RP-HPLC	提供了肽和小分子蛋白质的结构信息，但对于大分子蛋白质，结果准确性不高。常规检测器无法对氨基酸进行检测，需柱前或柱后衍生化后再进行 LC 分析
氨基酸序列测定	Edman 测序，酶切后 LC-MS 肽图分析	Edman 测序不借助任何数据库，但检测的肽链长度有限；LC-MS 方法通用性好
氨基酸含量分析	RP-HPLC	可作为一级序列确证的佐证，并不能表明其氨基酸序列的正确性
N/C- 末端序列	Edman 测序，SDS-PAGE，LC-MS	若采用 Edman 测序，N- 末端是焦谷氨酸残基时，需先用焦谷氨酰胺酶去除
肽图	LC，LC-MS	是鉴定目标产物的常用方法
碳水化合物结构与含量	LC-MS，GC-MS	包括中性糖、氨基糖、唾液酸的结构和含量
多种 PTMs/ 二硫键	LC-MS/MS	获得多级碎片的质量肽图，有助于进一步分析氨基酸的修饰类型、位点及其比例

白质组学研究中，蛋白质一级结构表征的主要分析策略有自上而下（top-down）、自中而下（middle-down）、自下而上（bottom-up）的方法[26]。Top-down是直接对完整的蛋白质或多肽分子进行上机检测，能最大限度保留蛋白质或多肽的原有结构、相关修饰和不稳定结构等，分析时间短，可以捕获更准确、更丰富和更完整的蛋白质或多肽的分子生物学信息，但也存在全扫描光谱复杂、完整大分子在电喷雾 -MS 分析中很难获得足够高的灵敏度等缺点。Middle-down 通常采用还原或限制性蛋白酶水解产生亚基片段，再进行气相裂解分析；优点是既能提供关键的完整层面信息，又能表征更细微的变异体差异，但往往较难获得全部的序列信息和 PTMs 信息。Bottom-up 是先将完整的蛋白质或多肽酶解消化成小分子肽段，再进行 MS 检测；作为传统的 MS 技术，具有多肽碎片多、灵敏度高、能够提供充足信息的特点。采用后两类表征分析方法时，完整的蛋白分子必须先经酶解消化成肽或多肽片段，而酶解通常需要 30 min 以上甚至过夜的消化过程。此外，酶解前通常还需要进行蛋白质变性、还原和烷基化等前处理来展开蛋白结构，加速消解过程。这一系列前处理步骤会大大延长分析时间，降低分析速度及通量。抗体药物及其类似物的大量研发对抗体的快速表征产生了巨大需求，提高抗体表征的分析速度及通量是十分必要且非常有价值的。基于 MS 技术的分析策略能够缩短检测时间，提供更多维度、更精确的结构信息；并且，借助 MS 的自动化前处理模式和持续改进的数据处理软件，分析样品的适用范围有望进一步扩大，同时前处理流程得以简化，数据处理速度得到加快，从而提高表征方法的重复性与灵敏度。

3 基于 MS 技术的抗体药物结构表征

HRMS 具有灵敏度高、所需样品量少等优势。随着 MS 联用技术的发展和数据分析软件的完善，在线样品前处理、分离、自动化数据处理等技术的持续优化，抗体药物结构的快速表征研究得到了进一步推动。目前，基于 MS 技术快速表征抗体药物的报道众多，主要方法包括液相－串联质谱联用（LC-MS^n）、多维液相色谱－质谱联用（*n*D-LC-MS）、CE-MS、离子淌度（ion mobility，IM）-MS 等。

3.1 LC-MS^n

色谱与多级质谱联用能在实现分离的同时提供大量的 MS 碎片信息，提高分析的灵敏度，成为结构表征的有力工具；与新型裂解方式结合还可提高表征效率。

在抗体药物的肽图表征分析中，裂解方式的选择是直接影响表征结果的关键因素。一般应根据肽链中的氨基酸特异性选择不同的裂解位点，确定最适合的裂解试剂，以进行精准的定性和定量分析。蛋白酶解是最常用的方式，但其裂解时间、温度、pH 值以及用量等条件都较为苛刻，且酶解反应多需要过夜或反应 16 h 以上。MAO 等[27]开发了一种与轨道阱结合的 TriVersa NanoMate 多通道纳喷源新型裂解技术用于 mAb 的快速测序，可在 1 h 内进行变性、还原、酶解和测序。该快速蛋白测序方法自动化效率高、测序覆盖率高，将喷雾发射器上的实时酶解与 MS 数据采集并行处理，能实时监测蛋白质的酶解过程。由于酶解发生在喷雾发射器上，未观察到还原后大量的二硫键重整，因此无需进行烷基化保护。与常规方法相比，LC-MS/MS 结合新型裂解方式可以实现直接还原与裂解，简化了前处理步骤，大大提高分析效率，减少不可控因素。

样品中若有多个二硫键以复杂模式存在，则距离很近或相邻的半胱氨酸残基会形成嵌套式二硫键，使 2 个半胱氨酸之间没有酶裂解位点，导致此类型二硫键难以分析。CRAMER 等[28]利用 LC-MS/MS 建立了在线二硫键定位平台，采用源内还原裂解（in-source reduction cleavage，ISR）的方式可产生未还原、完全还原和部分还原的片段，与高灵敏度数据依赖型高能碰撞裂解方法组合，可在所有 ISR 产生的片段上都获得高质量的 MS/MS 谱图，用于分析多条肽链的链间二硫键、链内二硫键、链内与链间二硫键共存等模型。该方法前处理操作简单且重复性高，无需对二硫键进行还原、烷基化，可快速进行二硫键的定位和分析；难点在于 MS 谱图的解析与归属，需要找

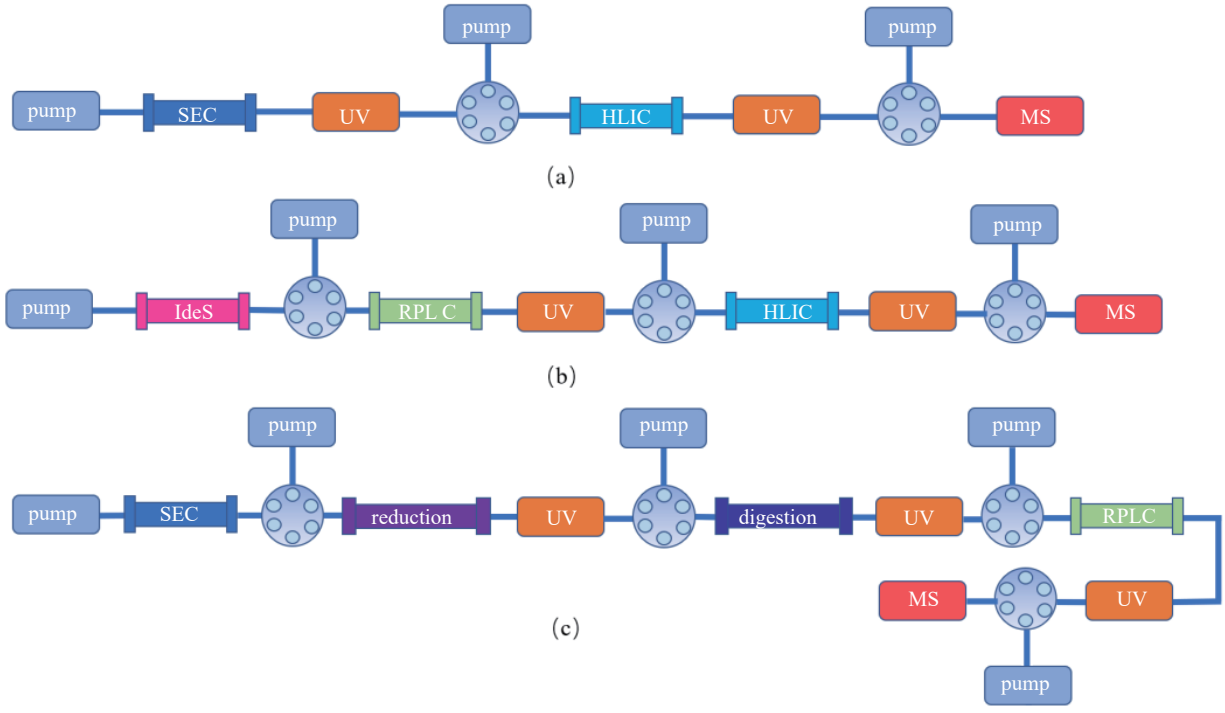
到关键目标碎片离子，并且对于复杂样品，仍需要进行多种酶的结合、裂解。

3.2 *n*D-LC-MS

*n*D-LC-MS 是先后经过多根作用机制不同 / 相同的色谱柱分离，最终进入 MS 检测的在线体系，实现了从离线到在线的理想自动化分析转变。这种自动化和高通量的分析平台在生物制药环境中具有简化方法，节省操作时间，提高灵敏度、精密度和准确度等多方面优势。

2D-LC-MS 联用已经是常规分析方法（图 2a），在抗体类药物中应用广泛[29—31]，主要进行待测物的完整分析，具有提高色谱分离能力和实现样品自动化制备的优势。GOYON 等[32] 采用 2D- 尺寸排阻色谱法（size exclusion chromatography，SEC）- 疏水相互作用层析（hydrophobic interaction chromatography，HIC）法分离抗体偶联药物 3 种不同的变体 —— 主峰、二聚体和高阶聚集体，比较主峰与聚集体的平均药物抗体偶联比率（drug to antibody ratio，DAR）差异。将 2D-LC-MS 技术与亲和色谱结合后应用到生产和纯化阶段中，可以在线纯化富集目标物，然后进行分离分析。DUNN 等[33] 开发的 2D-ProA-SEC 方法可实现 5 min 内从培养液中定量捕获 ProA 纯化的单个 mAb 洗脱峰，然后使用 SEC 柱分离聚体。该法的多种性能指标（包括分析时间、定量精度、准确性、耐用性、回收率、稳定性和分辨率）与离线方法相比都有明显优势。

在 2D-LC-MS 的基础上进一步出现了更高串联维度的 3D-LC-MS 的应用技术，所需样本量更低，且能够节省几倍甚至几十倍时间。3D-LC-MS 多采用 1D-LC 进行酶裂解、2D-LC 进行还原、3D-LC 进行分离的自中而下的分析策略对抗体药物进行结构鉴定（图 2b）。CAMPERI 等[34] 首次引入了创新性的 3D-LC/MS 工作流程用于快速、自动、有效地完整表征 mAb 的糖基化，其性能与传统的离线程序非



注：HILIC 表示亲水作用液相色谱法（hydrophilic interaction liquid chromatography）。

a—2D-LC-MS；b—3D-LC-MS；c—4D-LC-MS。

图 2　*n*D-LC-MS 工作示意图

Fig.2　Workflow of *n*D-LC-MS

常相近，并且整个程序运行仅需 95 min。

在 3D-LC-MS 基础上，增加了固定化酶酶解过程的 4D-LC-MS（图 2c）可在线进行肽图表征，实现更高的序列覆盖度[35]。GOYON 等[32,36]在 2D-LC-MS 基础上建立了 4D-LC-MS 方法［SEC/ 离子交换层析（ion exchange chromatography，IEC）- 还原 - 酶解 -RP-LC］，在 2 h 的运行中实现了抗体药物 CQAs 的在线表征，包括聚集、平均 DAR、氧化和脱酰胺化等，这种高通量的在线自动化简化系统大幅加快了抗体药物的开发、设计。CAMPERI 等[37]首次将 Protein A 亲和色谱与 4D-LC-MS 技术相结合，在线纯化细胞培养液后直接进行还原 - 酶解 - 肽图分析，序列覆盖度高达 93%～ 94%。目前，4D-LC-MS 技术也可分离和表征抗体药物的电荷异质体。如图 3 所示，酸碱变异体在一维分离后能够在肽图层面进行修饰类型和位点对比，从而为上游研发提供参考。与常规方法相比，该法减少了样品用量、提高了分析效率，序列覆盖度达 95% 以上[38—41]。多维色谱进行在线前处理的关键问题在于快速在线酶解的程度能否与离线状态下的效果相当。随着固定化酶反应器的不断发展，*n*D-LC-MS 快速表征技术的应用将更广泛。

3.3 CE-MS

CE 是根据样品中各组分的淌度和分配行为的

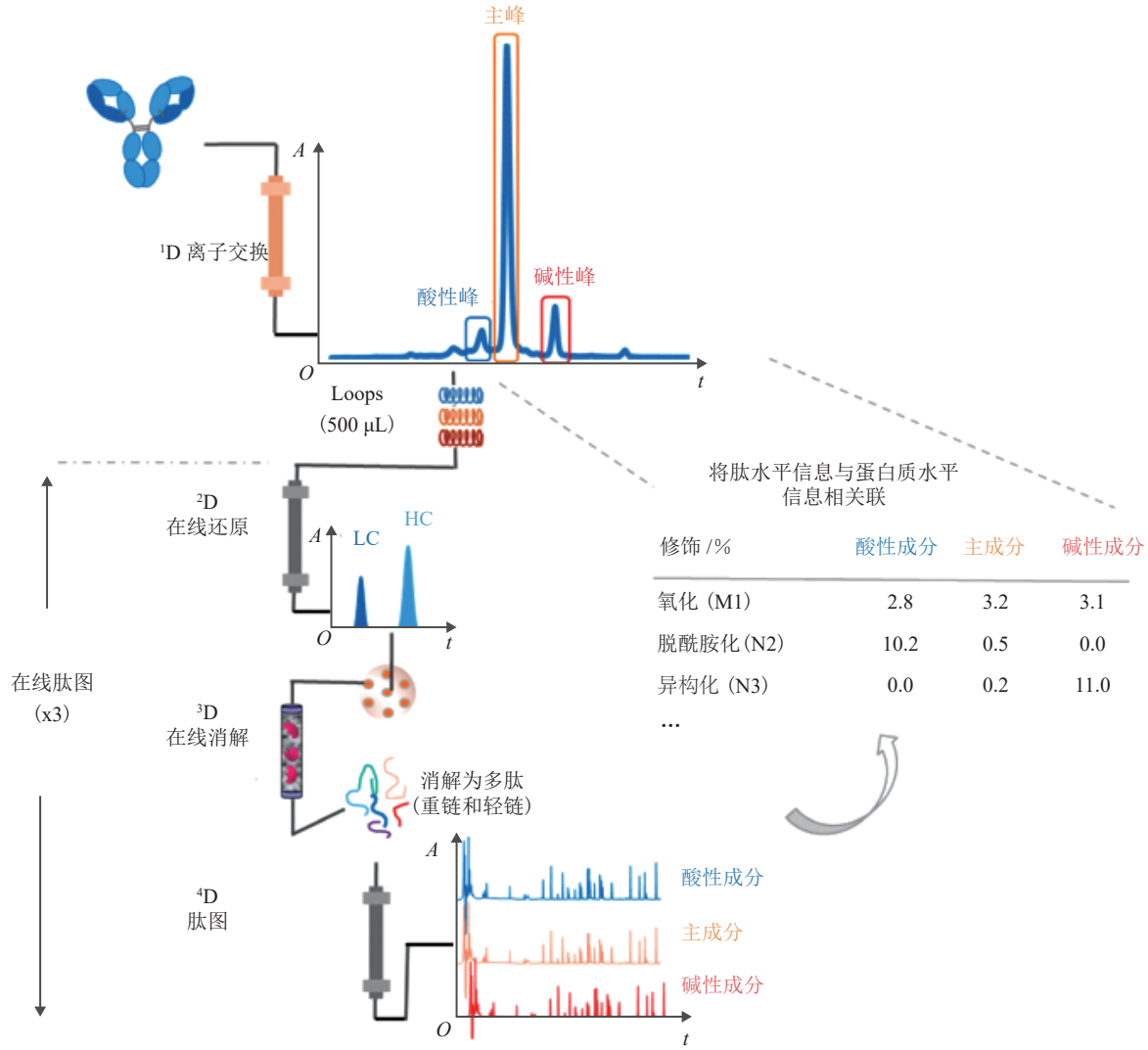


图 3 4D-LC-MS 肽图工作示意图[33]

Fig.3 Workflow of 4D-LC-MS for Peptide Mapping[33]

差异而实现分离的一类分析技术。相比于 LC-MS，CE-MS 在生物药的表征和分析中存在明显优势：(1) 分析时间缩短，MS 性能提升，更适合高通量筛选；(2) 微流控 CE-MS 样品用量小、灵敏度高，更适合有限数量的样品分析；(3) 更适合于亲水性的二肽、三肽，以及大型疏水性肽的分析 [42—43]。目前，CE-MS 广泛应用于表征纯化后生物样品的 CQAs，如纯度、电荷异质性和各种 PTMs[44—46]。

无鞘液 CE-MS 的联用已被证明能够快速分离和表征 mAb 的变异体蛋白形式，专属性强、精密度高、灵敏度高 [47]。GSTÖTTNER 等 [48] 首次使用无鞘液 CE-MS 表征双特异性抗体，15 min 内可实现多糖型的基本分离；通过对完整抗体的分析发现了同源双特异性抗体之间的差异，说明不同的生产过程会导致不同的宏观异质性；通过对亚基特异性分析，分离并定位出特定的 PTMs。

微流控芯片 CE-MS 是一种快速、低样品需求和高重复性的新方法，适用于抗体药物 CQAs 的大规模研究 [49]。CAO 等 [42] 利用 Zip-Chip CE-MS 平台，开发了快速肽图和完整电荷变异体分析来全面表征和监测 mAb 的 CQAs，能在一次运行中表征一级结构、多个 PTMs[氧化、脱酰胺、琥珀酰亚胺、C- 末端赖氨酸 (Lys) 剪切、N- 末端环化和糖基化]，并且测定结果与常规 RP-LC 方法的结果相当，分析时间缩短至 10 min 内。GIORGETTI 等 [50] 采用 CE-MS 在 12 min 内从完整水平、亚基水平及肽段水平这 3 个水平实现了对 7 个 mAb 的电荷异质性分析、PTM 定性 / 定位、肽图和二硫键分析。

CE-MS 的分离模块可通过联用技术与富集、纯化过程整合成一体化的在线平台。HAN 等 [51] 将免疫亲和 (immunoaffinity，IA) 纯化与 CE-MS 联用，开发了生物药物提取与表征的全自动化 IA-CE-MS 平台，基于微色谱的自动化 IA 系统能够实现快平衡、快吸附、快洗脱，且大幅提高了样品制备的重复性。该平台适用于体内外样品分析，可广泛应用于生物药物发现和临床前开发。

成像毛细管等电聚焦 (imaged capillary isoelectric focusing，icIEF) 是一种基于蛋白质等电点的分离技术，常用于生物制药背景下的电荷异质性测定，被认为是治疗性 mAb 开发和质量控制中可靠且稳定的常规方法 [52]。近年来，icIEF 技术与 MS 检测器的联用可实现快速等电点测量、基于 UV 的电荷变异体直接定量测定和电荷变异体的质量表征 [53]。ZHANG 等 [54] 开发了一种高效、稳定的 icIEF 综合 MS 策略，通过 icIEF 与 MS 的联用可对完整蛋白进行表征，通过制备型 icIEF 收集 mAb 电荷变异体组分可进行 HPLC-MS 肽图谱分析，既可以确定 mAb 纯度，又能进一步进行组分表征，为蛋白药物的质量控制提供了新的、更快的技术选择。

3.4 IM-MS

IM-MS 是由非变性质谱 (native MS) 演变，最早被开发用于表征蛋白分子 [55]。IM-MS 的分离原理是基于离子在弱电场的漂移管中与缓冲气体碰撞时，由于碰撞截面不同，导致迁移时间的差异。通过这种方式，离子可根据大小、形状和电荷的差异进行气相分离。IM 给传统 MS 增加了新的分离维度，主要应用于二硫键异构体 [56]、糖基化异构体 [57]、构象异质性等分离和鉴定 [58]。此外，IM-MS 也可用于考察抗体偶联药物的 DAR，以快速评估其结构异质性 [59]。IM-MS 的最大优势是分析时间为毫秒级。

FERGUSON 等 [60] 考察了用 IM-MS 分析不同 mAb 药物的适用性并进行方法验证，结果表明该技术在 10 ms 内不仅可以检测包含不同靶蛋白的 mAb 之间的差异，还能检测具有相同靶蛋白、但生产工艺不同的 mAb 之间的差异。在肽段水平分析上，该方法仍具有潜在优势。DESLIGNIÈRE 等 [61] 利用离子淌度色谱 (ion mobility spectrometry，IMS)-HRMS 谱图上的峰形和达峰时间分析经胰蛋白酶消化后的人源化免疫球蛋白 (immunoglobulin，Ig)G4 中所含二硫键的肽段，可以在 10 ms 内定性鉴别出含二硫键的肽。多通道环形 IMS(cyclic ion mobility spectrometry，cIMS) 的分析时间虽然比线性 IMS 长几倍，但能更好地分离构象异构体，识别低丰度的构象异构体，最终更准确地鉴别二硫键的连接关系，适用于复杂的二硫键网络定位。LARSON 等 [62] 将捕获离子淌度 (trapped ion mobility spectrometry，

TIMS）与 top-down MS 结合，实现了对现有抗体偶联药物分析技术的重要补充。该法能在单次 3 min 的运行时间内对抗体偶联药物结构进行多级 MS 分析，得到主要氨基酸序列信息和多个 CQAs，即使加上置换缓冲液的前处理部分，整个工作循环也少于 30 min，并且能够同时对 15 个样品进行分析。

IM-MS 是一种功能强大的完整抗体鉴定新方法：IM 与色谱联用可提高 MS 的分辨率；无需任何额外的样品处理，从而大大缩短分析时间；允许同时定量、脱盐、鉴定和构象表征工作，从而实现高通量、高灵敏度和高自动化[63−64]。EHKIRCH 等[65] 建立的 SEC-IM-MS 方法可实现在线脱盐和高通量分析，几分钟内就可完成分离、鉴别、构象表征。

3.5 其他

仪器、方法和操作的可变性极易产生结果偏差，如酶解条件的改变会产生不同的 PTMs，因此自动化的前处理平台一直受到广泛关注。SONG 等[66] 开发的自动化质谱 MAM 分析方法在 Hamilton STARline 工作站实现了自动化酶解。为探索 MAM 平台的全球化应用，分别在 3 个实验室内实施该自动化前处理方法，对比氧化、脱酰胺、异构等 PTMs 的检测结果；最终结果高度相似，偏差 <2.5%，提示该自动化前处理方法可避免人为操作带来不可预测的影响。COGHLAN 等[67] 在分析二硫键错配和降解杂质时利用 Agilent AssayMAP Bravo 液体处理平台实现了半自动化前处理，也提高了数据结果的准确性。

4 数据处理软件

抗体药物的相对分子质量大，裂解后产生的质量碎片丰富且各片段产生的信号强度不一，手动处理抗体药物的 MS 谱图和数据是具有难度和挑战性的，需要相关领域经验丰富的工作者花费大量时间进行数据解析与统计。自动化软件能够快速解析 MS 数据，降低人工分析的难度，节省大量数据处理时间，扩大了 MS 分析在抗体药物质量控制中的应用，加快了抗体药物的研发生产进程。CHEN 等[68] 设计 的 Global Characterization Data Processing Site 程序兼容各种裂解（包括酶解和化学裂解）数据，通过与人工计算结果对比，验证了其可靠性。手工计算和图形格式化每个质谱数据点约需要 20 min，而在网站上用该软件计算并生成图形 / 表格 / 三维分子模型，所需不到 1 min。SKALA 等[69] 利用所开发的 MoFi 软件对糖蛋白进行鉴定；随后，FUSS 等[70] 使用 MoFi 软件进一步对蛋白序列和修饰进行注释，通过列表对比相对分子质量的理论值与实测值，从而确定每个糖基化位点上存在的糖基的丰度。MassMatrix、DBond、MS2DB+、pLink-SS 等[71] 能够自动分析二硫键修饰情况的软件的开发也受到广泛关注。X!Tandem 作为免费的开源软件可以检索肽图、序列对比、MS^n 等多种数据库，让蛋白质等分子的结构表征更为便捷。商用的自动化数据处理软件（表 4）的普及，为实现抗体药物肽图、糖型、二硫键等 PTMs 的快速和高通量表征分析提供了有力的工具。

5 结语

抗体药物的研发数量不断攀升，因此需要一种兼备高灵敏度和高通量的分析方法来支持其巨大的生产研发和质量控制需求。MS 技术为抗体药物的表征分析提供了有力的工具，目前已有研究基于

表 4 常见的商用数据处理软件

Tab.4 Common Commercial Data Processing Softwares

研发公司	软件名称	软件特点
美国 Thermo Fisher 公司	BioPharma Finder 3.2，PepFinder2.0	可采用还原和非还原裂解肽段对照质谱图同时解析、表征二硫键
美国 Waters 公司	BiopharmaLynx 1.3	具有审计追踪功能，可根据模板自动生成报告
荷兰 SCIEX 公司	BioPharmaView 3.0	兼容毛细管电泳－质谱分析的原始数据，适用 MAM 和新峰检测（new peak detection，NPD）
美国 Agilent 公司	MassHunter BioConfirm 12.0	具有复杂混合物的分子特征提取的解卷积算法，区分共流组分
加拿大 BSI 公司	PEAKS Studio 12	兼容数据依赖型采集（data dependent acquisition，DDA）与数据非依赖型采集（data independent acquisition，DIA）的数据，包含 De novo 算法从头测序
美国 Protein Metrics 公司	Byos 4.4	top-down 数据分析、宿主残留蛋白和 PTMs 的 MAM 报告
美国 Matrix Science 公司	Mascot 2.7	支持目前主流的 3 种检索算法，包括蛋白质、表达序列标签以及基因组数据库

MS 技术进行了一系列改进以加快药物表征速度：MS 联用技术能提供多种碎裂模式形成肽段的指纹图谱；多维 LC 串联可实现在线前处理，形成可控性强、重复性高的多维度一体化工作流程；微流控芯片 CE-MS 能够实现大规模批量分析；IM-MS 可进一步加深、加快蛋白组学的表征研究，提高 PTMs 分析的灵敏度、重复性等。基于 MS 技术快速表征抗体药物结构的基本策略是前端实现自动化前处理，中端开发在线富集和分离、在线酶解、实时质谱检测的一体化质谱联用平台，后端完善数据库和软件，提升数据分析处理速度，从而提高研发效率、缩短研发周期，降低人为干扰因素，实现方法的可监控性、追溯性、转移性。随着相关研究的不断深入，趋于自动化的快速质谱表征技术将更加完善、成熟，能支持全面监测抗体药物质量属性的要求。

参考文献：

[1] ECKER D M, JONES S D, LEVINE H L. The therapeutic monoclonal antibody market [C]//MAbs. Taylor & Francis, 2015, **7**(1): 9-14.

[2] SINGH S, TANK N K, DWIWEDI P, *et al*. Monoclonal antibodies: a review [J]. *Curr Clin Pharmacol*, 2018, **13**(2): 85-99.

[3] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. *Nat Rev Drug Dis,* 2021, **20**(7): 491-495.

[4] ZHANG Y, FANG C, BAO H, *et al*. Discover the post-translational modification proteome using mass spectrometry [J]. *Chin J Chem*, 2021, **39**(3): 550-558.

[5] EDMAN P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides [J]. *Arch Biochem*, 1949, **4**(3): 475.

[6] KITA A, PONNIAH G, NOWAK C, *et al*. Characterization of cysteinylation and trisulfide bonds in a recombinant monoclonal antibody [J]. *Anal Chem*, 2016, **88**(10): 5430-5437.

[7] 武　刚, 王文波, 于传飞, 等. 利用高分辨液相质谱综合表征抗 CTLA4 单克隆抗体的研究 [J]. 中国药学杂志, 2020, **55**(6): 457-464.

[8] DICK J R L W, MAHON D, QIU D, *et al*. Peptide mapping of therapeutic monoclonal antibodies: Improvements for increased speed and fewer artifacts [J]. *J Chromatogr B*, 2009, **877**(3): 230-236.

[9] 崔新玲, 胡志上, 孟晓光, 等. IgG1 型单克隆抗体对照品的一级结构解析 [J]. 分析测试学报, 2019, **38**(8): 939-945.

[10] 乔玉玲, 黄　铮, 秦海艳, 等. 抗 CD52 单克隆抗体 HPLC-肽图分析方法的建立 [J]. 生物技术通报, 2018, **34**(11): 216-222.

[11] ZHANG H, CUI W, GROSS M L. Mass spectrometry for the biophysical characterization of therapeutic monoclonal antibodies [J]. *FEBS Lett*, 2014, **588**(2): 308-317.

[12] U. S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use(1997) [J]. *J Immunother*, 1997, **20**(3): 214-243.

[13] ICH. Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products(ICH Q6B) [EB/OL]. (1999-03-10) [2024-02-03]. https://database. ich. org/sites/default/files/Q6B％ 20Guideline. pdf.

[14] WHO. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biological medicinal products prepared by recombinant DNA technology [EB/OL]. (2014-06-18) [2024-02-03]. https://www. who. int/publications/m/item/recombinant-dna-annex-4-trs-no-987.

[15] 国家食品药品监督管理总局. 关于发布生物类似药研发与评价技术指导原则的通告 (2015 年第 7 号) [EB/OL]. (2015-02-28) [2024-02-03]. http://www. sfda. gov. cn/WS01/CL0087/115103. html.

[16] 国家药品监督管理局药品审评中心. 人用单克隆抗体质量控制技术指导原则 [EB/OL]. (2003-03-20) [2024-02-03]. https://www. cde. org. cn/zdyz/domesticinfopage?zdyzIdCODE=16627e8521f7936896ffbe7e128f72c4.

[17] EMA/CHMP/BWP. Guideline on development, production, characterisation and specification for monoclonal antibodies and related products [EB/OL]. (2016-07-21) [2024-02-03]. https://www. ema. europa. eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-development-production-characterisation-specification-monoclonalantibodies-related_en. pdf.

[18] QIAN C, NIU B, JIMENEZ R B, *et al*. Fully automated peptide mapping protocol for multi-attribute method by liquid chromatography-tandem mass spectroscopy with a high-throughput robotic liquid handling system [J]. *Bio Rxiv*, 2020, **20**: 1-4.

[19] 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]. 药学学报, 2020, **55**(9): 2092-2098.

[20] HAO Z, MOORE B, REN C, *et al*. Multi-attribute method performance profile for quality control of monoclonal antibody therapeutics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, **205**: 114330.

[21] BECK A, LIU H. Macro-and micro-heterogeneity of natural and recombinant IgG antibodies [J]. *Antibodies*, 2019, **8**(1): 18.

[22] HIGEL F, SEIDL A, SÖRGEL F, *et al*. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, **100**: 94-100.

[23] LIM A, REED-BOGAN A, HARMON B J. Glycosylation profiling of a therapeutic recombinant monoclonal antibody with two N-linked glycosylation sites using liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer [J]. *Anal Biochem*, 2008, **375**(2): 163-172.

[24] BONDT A, ROMBOUTS Y, SELMAN M H J, *et al*. Immunoglobulin G(IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, **13**(11): 3029-3039.

[25] 李梦林, 朱文文, 张金兰. 基于 N- 聚糖和完整糖肽的单克隆抗体药物糖基化修饰表征 [J]. 药学学报, 2021, **56**(9): 2360-2366.

[26] TODOROKI K, MIZUNO H, SUGIYAMA E, *et al*. Bioanalytical methods for therapeutic monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates: a review of recent advances and future perspectives [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **179**: 112991.

[27] MAO Y, ZHANG L, KLEINBERG A, *et al*. Fast protein sequencing of monoclonal antibody by real-time digestion on emitter during nanoelectrospray [C]//MAbs. Taylor & Francis, 2019, **11**(4): 767-778.

[28] CRAMER C N, KELSTRUP C D, OLSEN J V, *et al*. Complete mapping of complex disulfide patterns with closely-spaced cysteines by in-source reduction and data-dependent mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(11): 5949-5957.

[29] SARRUT M, CORGIER A, FEKETE S, *et al*. Analysis of antibody-drug conjugates by comprehensive on-line two-dimensional hydrophobic interaction chromatography x reversed phase liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry. Optimization of separation conditions [J]. *J Chromatogr B,* 2016, **1032**: 103-111.

[30] STOLL D, DANFORTH J, ZHANG K, *et al*. Characterization of therapeutic antibodies and related products by two-dimensional liquid chromatography coupled with UV absorbance and mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr B*, 2016, **1032**: 51-60.

[31] LARGY E, CATRAIN A, VAN VYNCHT G, *et al*. 2D-LC-MS for the analysis of monoclonal antibodies and antibody-drug conjugates in a regulated environment [J]. *Curr Trends Mass Spectrom*, 2016, **14**: 29-35.

[32] GOYON A, KIM M, DAI L, *et al*. Streamlined characterization of an antibody-drug conjugate by two-dimensional and four-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(23): 14896-14903.

[33] DUNN Z D, DESAI J, LEME G M, *et al*. Rapid two-dimensional Protein-A size exclusion chromatography of monoclonal antibodies for titer and aggregation measurements from harvested cell culture fluid samples [C]//MAbs. Taylor & Francis, 2020, **12**(1): 1702263.

[34] CAMPERI J, DAI L, GUILLARME D, *et al*. Development of a 3D-LC/MS workflow for fast, automated, and effective characterization of glycosylation patterns of biotherapeutic products [J]. *Anal Chem,* 2020, **92**(6): 4357-4363.

[35] CAMPERI J, GUILLARME D, STELLA C. Targeted bottom-up characterization of recombinant monoclonal antibodies by multidimensional LC/MS [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(19): 13420-13426.

[36] GOYON A, DAI L, CHEN T, *et al*. From proof of concept to the routine use of an automated and robust multi-dimensional liquid chromatography mass spectrometry workflow applied for the charge variant characterization of therapeutic antibodies [J]. *J Chromatogr A*, 2020, **1615**: 460740.

[37] CAMPERI J, DAI L, GUILLARME D, *et al*. Fast and automated characterization of monoclonal antibody minor variants from cell cultures by combined Protein-A and Multidimensional LC/MS methodologies [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(12): 8506-8513.

[38] CAMPERI J, GOYON A, GUILLARME D, *et al*. Multi-dimensional LC-MS: the next generation characterization of antibody-based therapeutics by unified online bottom-up, middle-up and intact approaches [J]. *Analyst*, 2021, **146**(3): 747-769.

[39] VERSCHEURE L, CERDOBBEL A, SANDRA P, *et al*. Monoclonal antibody charge variant characterization by fully

automated four-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2021, **1653**: 462409.

[40] GSTOTTNER C, KLEMM D, HABERGER M, *et al*. Fast and automated characterization of antibody variants with 4D HPLC/MS [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(3): 2119-2125.

[41] CAMPERI J, GRUNERT I, HEINRICH K, *et al*. Inter-laboratory study to evaluate the performance of automated online characterization of antibody charge variants by multi-dimensional LC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2021, **234**: 122628.

[42] CAO L, FABRY D, LAN K. Rapid and comprehensive monoclonal antibody Characterization using microfluidic CE-MS [J]. *J Pharm Biomed Anal,* 2021, **204**: 114251.

[43] CHENG J, WANG L, RIVE C M, *et al*. Complementary methods for de novo monoclonal antibody sequencing to achieve complete sequence coverage [J]. *J Proteome Res*, 2020, **19**(7): 2700-2707.

[44] HE Y, ISELE C, HOU W, *et al*. Rapid analysis of charge variants of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in dynamically coated fused-silica capillary [J]. *J Sep Sci*, 2011, **34**(5): 548-555.

[45] MACK S, ARNOLD D, BOGDAN G, *et al*. A novel microchip-based imaged CIEF-MS system for comprehensive characterization and identification of biopharmaceutical charge variants [J]. *Electrophoresis*, 2019, **40**(23-24): 3084-3091.

[46] FARSANG E, GUILLARME D, VEUTHEY J L, *et al*. Coupling non-denaturing chromatography to mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **185**: 113207.

[47] ZHAO Y, SUN L, KNIERMAN M D, *et al*. Fast separation and analysis of reduced monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2016, **148**: 529-533.

[48] GSTÖTTNER C, NICOLARDI S, HABERGER M, *et al*. Intact and subunit-specific analysis of bispecific antibodies by sheathless CE-MS [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, **1134**: 18-27.

[49] CARILLO S, JAKES C, BONES J. In-depth analysis of monoclonal antibodies using microfluidic capillary electrophoresis and native mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **185**: 113218.

[50] GIORGETTI J, BECK A, LEIZE-WAGNER E, *et al*. Combination of intact, middle-up and bottom-up levels to characterize 7 therapeutic monoclonal antibodies by capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, **182**: 113107.

[51] HAN M, WANG Y, COOK K, *et al*. Universal automated immunoaffinity purification-CE-MS platform for accelerating next generation biologic design [J]. *Anal Chem*, 2021, **93**(13): 5562-5569.

[52] SCHLECHT J, MORITZ B, KIESSIG S, *et al*. Characterization of therapeutic mAb charge heterogeneity by iCIEF coupled to mass spectrometry (iCIEF-MS) [J]. *Electrophoresis*, 2023, **44**(5-6): 540-548.

[53] MACK S, ARNOLD D, BOGDAN G, *et al*. A novel microchip-based imaged CIEF-MS systemfor comprehensive characterization and identification of bio-pharmaceutical charge variants [J]. *Electrophoresis*, 2019, **40**: 3084-3091.

[54] ZHANG X, CHEN T, LI V, *et al*. Cutting-edge mass spectrometry strategy based on imaged capillary isoelectric focusing (icIEF) technology for characterizing charge heterogeneity of monoclonal antibody [J]. *Anal Biochem*, 2023, **660**: 114961.

[55] HALL Z, POLITIS A, BUSH M F, *et al*. Charge-state dependent compaction and dissociation of protein complexes: insights from ion mobility and molecular dynamics [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(7): 3429-3438.

[56] BAGAL D, VALLIERE-DOUGLASS J F, BALLAND A, *et al*. Resolving disulfide structural isoforms of IgG2 monoclonal antibodies by ion mobility mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2010, **82**(16): 6751-6755.

[57] TIAN Y, RUOTOLO B T. Collision induced unfolding detects subtle differences in intact antibody glycoforms and associated fragments [J]. *Int J Mass Spectrom*, 2018, **425**: 1-9.

[58] TERRAL G, BECK A, CIANFÉRANI S. Insights from native mass spectrometry and ion mobility-mass spectrometry for antibody and antibody-based product characterization [J]. *J Chromatogr B*, 2016, **1032**: 79-90.

[59] DEBAENE F, BOEUF A, WAGNER-ROUSSET E, *et al*. Innovative native MS methodologies for antibody drug conjugate characterization: high resolution native MS and IM-MS for average DAR and DAR distribution assessment [J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(21): 10674-10683.

[60] FERGUSON C N, GUCINSKI-RUTH A C. Evaluation of ion mobility-mass spectrometry for comparative analysis of monoclonal antibodies [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2016, **27**(5): 822-833.

[61] DESLIGNIÈRE E, BOTZANOWSKI T, DIEMER H, *et al*.

High-resolution IMS-MS to assign additional disulfide bridge pairing in complementarity-determining regions of an IgG4 monoclonal antibody [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2021, **32**(10): 2505-2512.

[62] LARSON E J, ROBERTS D S, MELBY J A, *et al*. High-throughput multi-attribute analysis of antibody-drug conjugates enabled by trapped ion mobility spectrometry and top-down mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2021, **93**(29): 10013-10021.

[63] DESLIGNIÈRE E, EHKIRCH A, BOTZANOWSKI T, *et al*. Toward automation of collision-induced unfolding experiments through online size exclusion chromatography coupled to native mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(19): 12900-12908.

[64] EHKIRCH A, GOYON A, HERNANDEZ-ALBA O, *et al*. A novel online four-dimensional SEC×SEC-IM×MS methodology for characterization of monoclonal antibody size variants [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(23): 13929-13937.

[65] EHKIRCH A, HERNANDEZ-ALBA O, COLAS O, *et al*. Hyphenation of size exclusion chromatography to native ion mobility mass spectrometry for the analytical characterization of therapeutic antibodies and related products [J]. *J Chromatogr B,* 2018, **1086**: 176-183.

[66] SONG Y E, DUBOIS H, HOFFMANN M, *et al*. Automated mass spectrometry multi-attribute method analyses for process development and characterization of mAbs [J]. *J Chromatogr B*, 2021, **1166**: 122540.

[67] COGHLAN J, BENET A, KUMARAN P, *et al*. Streamlining the characterization of disulfide bond shuffling and protein degradation in IgG1 biopharmaceuticals under native and stressed conditions [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, **10**: 862456.

[68] CHEN Y, DOUD E, STONE T, *et al*. Rapid global characterization of immunoglobulin G1 following oxidative stress [C]//MAbs. Taylor & Francis, 2019, **11**(6): 1089-1100.

[69] SKALA W, WOHLSCHLAGER T, SENN S, *et al*. MoFi: a software tool for annotating glycoprotein mass spectra by integrating hybrid data from the intact protein and glycopeptide level [J]. *Anal Chem*, 2018, **90**(9): 5728-5736.

[70] FÜSSL F, TRAPPE A, CARILLO S, *et al*. Comparative elucidation of cetuximab heterogeneity on the intact protein level by cation exchange chromatography and capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(7): 5431-5438.

[71] LAKBUB J C, SHIPMAN J T, DESAIRE H. Recent mass spectrometry-based techniques and considerations for disulfide bond characterization in proteins [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(10): 2467-2484.