重组蛋白药物中聚山梨酯降解酶及其检测技术研究进展

李佳惠[1,2]，胡志上[2*]，张雅芬[1*]

（1. 中国计量大学生命科学学院，浙江杭州 310018；2. 中国计量科学研究院，北京 100029）

摘要：聚山梨酯降解酶（PSDE）是重组蛋白药物生产过程中由细胞株自身产生的与目标产物无关的蛋白质混合物。PSDE 会导致重组蛋白药物中的常用赋形剂（聚山梨酯 20 和聚山梨酯 80）降解，从而产生脂肪酸颗粒、蛋白颗粒及复合颗粒，降低蛋白药物的安全性并缩短其有效期。对 PSDE 的检测和定量分析是保证药品安全性的重要环节，常用方法包括 ELISA 和 MS 法。该文综述了赋形剂的酶解原理、PSDE 的类别及常用检测分析方法，并指出标准物质的研制是定量分析的关键，为后续 PSDE 的检测提供了参考和指导。

关键词：重组蛋白药物；聚山梨酯降解酶；宿主细胞蛋白；检测；杂质；研究进展

中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)05-0508-08

引用：李佳惠, 胡志上, 张雅芬. 重组蛋白药物中聚山梨酯降解酶及其检测技术研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(5): 508-515. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.05.002

Research Progress on Polysorbate-degrading Enzymes in Recombinant Protein Therapeutics and Related Detection Technologies

LI Jiahui[1,2], HU Zhishang[2*], ZHANG Yafen[1*]

(*1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018; 2. National Institute of Metrology, Beijing 100029*)

ABSTRACT: Polysorbate-degrading enzymes (PSDE) are endogenous protein mixtures secreted by host cell lines during the manufacture of recombinant protein drugs and are unrelated to target products. PSDE degrade common excipients (such as polysorbate 20 and polysorbate 80) in protein formulations, thereby generating fatty acid particles, protein particles, and composite particles, further compromising product safety and reducing shelf-life stability. The detection and quantitative analysis of PSDE are critical steps to ensure drug safety. ELISA and MS are commonly used for PSDE detection. This article reviews the principles of enzymatic hydrolysis of excipients, the classification of PSDE, and commonly used detection methods. It highlights that the development of reference materials is critical for quantitative analysis, providing reference and guidance for subsequent PSDE detection.

Key Words: recombinant protein drug; polysorbate-degrading enzyme; host cell protein; detection; impurity; research progress

重组蛋白药物是通过重组 DNA 技术将目标编码基因导入宿主细胞，在体外表达和纯化后获得的蛋白类生物制剂。在其生产过程中，宿主细胞蛋白（host cell protein，HCP）也会释放到细胞培养基 / 发酵液中，并残留在终产品中。HCP 是影响药品质量的重要因素，并且不能被现有的分离及纯化方法完全去除[1-2]。聚山梨酯降解酶（polysorbate-degrading enzymes，PSDE）是能酶解蛋白类药物制剂配方中聚山梨酯（polysorbate，PS）的特殊 HCP，会严重威胁产品的有效性、稳定性及安全性，需建立去除及监

收稿日期：2025-10-21

基金项目：国家重点研发计划专项课题（2021YFF0600800）、国家重点研发计划“国家质量基础设施体系”重点专项课题（2021YFF0600702）、中国计量科学研究院基本业务费重点领域项目课题（AKYZD2114-1）

作者简介：李佳惠，硕士研究生，专业方向：蛋白质化学计量。

通信作者：胡志上，副研究员，从事蛋白质化学计量相关研究。

张雅芬，副教授，从事植物学相关研究。

测的控制策略[3-4]。

目前，PSDE 的检测包括 ELISA、二维差异凝胶电泳（2D-differential gel electrophoresis，2D-DIGE）、二维 PAGE（2D-PAGE）、免疫印迹、毛细管电泳（capillary electrophoresis，CE）- 免疫印迹及质谱等方法。其中，2D-DIGE、2D-PAGE、免疫印迹、CE-免疫印迹主要用于工艺开发中 PSDE 的监测，以及工艺参数的优化和调整，但由于操作复杂、灵敏度差、成本高等缺点，常作为半定量技术用于补充分析，应用相对较少。ELISA 和基于 MS 的检测方法不仅能提供已知 / 未知 PSDE 的总量信息，还能鉴定特殊的 PSDE，具有高准确性、高灵敏度等优势，在 PSDE 检测中的应用广泛。

本文介绍了蛋白药物制剂中常用赋形剂（PS 20 和 PS 80）的酶解机制，综述了目前已识别的 PSDE 及定量分析方法，重点阐述研究进展、优缺点及应用范围，旨在为重组蛋白类药物制剂中 PSDE 残留的标准化检测提供参考。

1 PS 的酶解

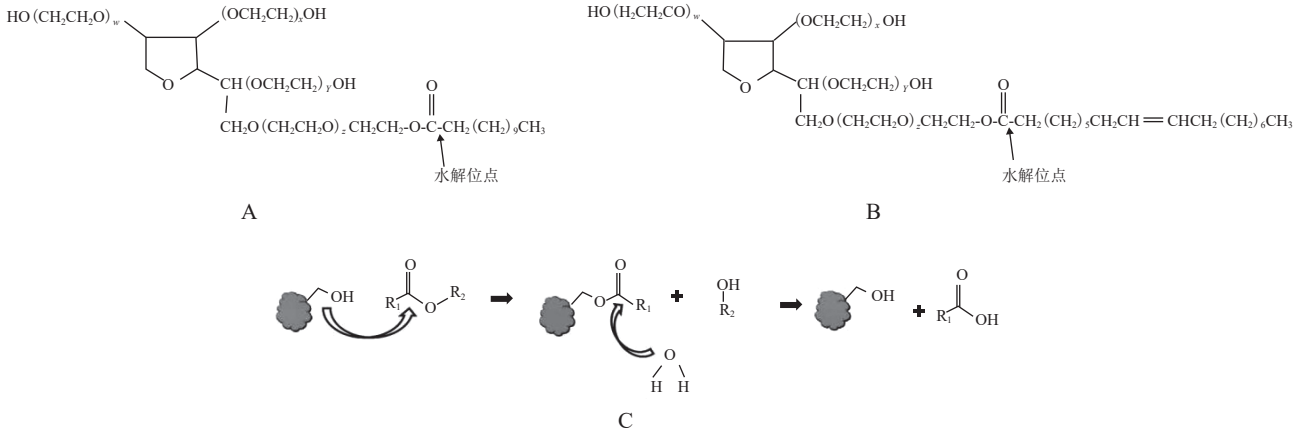
1.1 酶解机制

PS 20 与 PS 80 均属于非离子型表面活性剂，常用于防止重组蛋白类药物中蛋白质的变性、聚集及表面吸附[5-7]。其分子由亲水头部（聚氧乙烯失水山梨醇）和疏水尾部（脂肪酸酯链）经酯键连接而成（图 1）。在制剂贮存过程中，酯键易因温度升高、pH 值变化或残留脂肪酶作用等水解断裂，生成游离脂肪酸和聚氧乙烯失水山梨醇[8]（图 1C）。

酶促水解是重组蛋白类药物制剂中 PS 的主要降解机制[9-11]。研究[12-13]表明，质量分数 <1 μg/g 的第ⅩⅤ族溶酶体磷脂酶 A2 异构体Ⅹ1（group ⅩⅤ lysosomal phospholipase A2 isomer Ⅹ1，LPLA2）就可使 PS 酶解，导致药品质量缺陷。PS 经酶解后会释放游离脂肪酸，而当脂肪酸浓度高于溶解度时会形成可见 / 亚可见颗粒[6-7]。此外，PS 酶解后会暴露出蛋白类药物原本被掩盖的疏水区域，促使蛋白质自聚集，形成蛋白质颗粒[14]。有研究[13]指出，PS 20 的高阶酯发生酶解后，其单酯强度将发生变化；而 PS 80 则是单酯水解完后，高阶酯才开始水解。

1.2 PSDE 的种类

目前已知的 PSDE 大多来源于中国仓鼠卵巢细胞（CHO 细胞）[15-16]，而 CHO 细胞是目前工业生产重组蛋白类药物较为常用的哺乳动物表达系统[17]。因此，CHO 细胞来源的 PSDE 受到了广泛关注。HCP 中的 PSDE 主要为国际酶学委员会（Enzyme Commission，EC）分类系统中的羧酸酯水解酶（包括羧酸酯酶、脂肪酶、磷脂酶 A2、唾液酸乙酰酯酶等），还有少量的其他类型酶（如异戊酸乙酯水解酯酶 1、棕榈酰蛋白质硫酯酶等）[9,18]。磷脂酶 B 样蛋白 2 是首个在药品中被检测到的 HCP，DIXIT 等[19]认为其具有催化 PS 水解的活性，但后续研



A—PS 20；B—PS 80；C—PS 酶解机制。

图 1 PS 结构及酶解机制示意图

Fig.1 Structures and Enzymolysis Mechanism Diagram of PS

究[20]却指出其并不参与PS的酶解。HALL等[13]在研究基于CHO细胞的蛋白类药物制剂中PS 20和PS 80的酶解过程时，成功鉴定出了LPLA2，并指出LPLA2对PS 20和PS 80的酶解表现出浓度和时间依赖特性。后续研究[21]则证实LPLA2的酶解活性。KOVNER等[22]测试了羧酸酯酶1(carboxylesterase 1，CES1)、CES1f、脂肪酶A(lipase A，LAL)等18种HCP，证实其中13种具有PS酶解活性。研究指出，不同PSDE对混合物中酯类物质的酶解反应具有特异性，例如LPL会快速水解PS 80中连接油酸的酯键，但难以水解PS 80中连接棕榈酰基和硬脂酰基的酯键[12,22]。

目前，已知的对PS起作用的PSDE包括：CES1f[14]、LAL[14,22-23]、CES1[17]、乙酸异戊酯水解酯酶1(isoamyl acetate hydrolyzing esterase 1，IAH1)[13,20,23]、脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase，LPL)[9,14]、溶血磷脂酶样蛋白2(lysophospholipase like protein 2，LYPLA2)[9,14,17]、*N*-酰基鞘氨醇酰胺水解酶1(*N*-acylsphingosine amidohydrolase 1，ASAH1)[9,18,20]、棕榈酰蛋白硫酯酶2[9]、磷脂酶A1亚型A(phospholipase A1 member A，PLALA)[9,22]、血小板活化因子乙酰水解酶(platelet-activating factor acetylhydrolase，PLA2g7/Paf-Ah)[15,18]、羧酸酯水解酶(carboxylic ester hydrolase，CES-2c)[9,17,24]、LPLA2、唾液酸乙酰酯酶(sialic acid acetylesterase，SIAE)[9,14,25]、鞘磷脂磷酸二酯酶1(sphingomyelin phosphodiesterase 1，SMPD1)[14,20]。

2　PSDE的检测技术

PSDE的检测技术在灵敏度、分辨率及适用体系等方面各具优势与局限性。表1系统总结了当前工业生产与科学研究中常用于检测PSDE的方法的特点及适用场景[26-37]。

2.1　ELISA

ELISA是一种常用的免疫学和分子生物学分析方法，具有操作简便、自动化、高通量、可定量检测的优势。由于契合生物制品的工艺开发需求，ELISA被作为监测HCP清除效果的标准方法。根据USP-NF 2025年版<1132>章节“生物制品中宿主细胞蛋白残留检测”及其补充章节<1132.1>“质谱法测定生物药中残留宿主细胞蛋白”的指导原则，ELISA可作为PSDE定量分析的首选方法。ChP 2020年版四部通则<3414>“酵母工程菌菌体蛋白质残留量测定法”中也明确[2]采用ELISA法测定生物制品中的PSDE残留量。

传统的ELISA法常用于提供总PSDE信息，作为整体水平参照，适用于大规模样本筛查和初步分

表1　PSDE检测技术

Tab.1　Detection Techniques of PSDE

检测方法	优点	缺点	用途	参考文献
ELISA	自动化，操作简便，快捷	需要特异性抗体，缺少标准物质	初步筛查，大量样品的快速检测	[26-27]
Luminex技术（高通量液相芯片检测技术）	高通量，高灵敏度，需要的样品、材料和时间更少	成本高，操作复杂，需要特异性抗体	高通量和高灵敏度检测	[28]
数据依赖性采集(data dependent acquisition，DDA)-MS	操作及数据分析相对简单	覆盖率有限，重复性差	快速筛查目标蛋白，鉴定新蛋白、新修饰，建立数据库	[24,29-30]
数据非依赖采集(data-independent acquisition，DIA)-MS	信息采集完整，高通量，高准确度，重复性良好	数据处理和分析流程复杂	丰度差异较高，需要无偏采集的蛋白样本	[31-32]
多反应监测(multiple reaction monitoring，MRM)-LC	高灵敏度，高精确度，不需要特异性抗体，重复性良好	不合适高通量检测，缺乏标准物质	适于小规模或特定目标物的分析	[16,33-34]
平行反应监测(parallel reaction monitoring，PRM)-LC	高选择性，高准确性，高通量	成本高，缺乏标准物质	复杂样品中目标蛋白的精确定量	[20,24,31]
2D-PAGE	高分辨率，重复性良好	灵敏度较低，仅能半定量分析	分析PSDE的表达模式，纯化后样品的存在性检测与种类鉴定	[35-36]
2D-DIGE	高重复性，高准确性	荧光标记成本高，仅能半定量分析	比较2种或多种样品之间的蛋白质表达差异，进行存在性检测与种类鉴定	[35-36]
CE-免疫印迹	特异性检测，结果直观、可视化	仅能半定量分析	特异性检测和半定量分析，PSDE种类的初步筛查	[37]

析。特异性 ELISA 试剂盒能实现特定 PSDE 的准确定量，定量范围通常为 0.312 5 ～ 20 ng/g，并可兼容多种样本类型，如培养液、血清、血浆等，完整检测流程约为 170 min[26]。该法具有成本低、操作简便和稳定性高等优势，但检测结果的精确度会受到抗体数量和活性的限制 [28]。此外，采用 ELISA 进行定量分析需借助标准曲线，但市场缺乏统一尺度的标准品，因此其定量结果的一致性有待提升。

在 ELISA 法基础上，OSKO 等 [28] 开发了基于 Luminex 技术的多重检测方法，可在同一反应体系中精准定量 LPL 和磷脂酶 B 样蛋白 2。与 ELISA 法相比，Luminex 技术使用的样品、材料和时间更少，并可同时检测出更多分析物，为 PSDE 的批量检测分析奠定了研究基础。

2.2 基于 MS 的检测方法

USP-NF 2025 年版 <1132> 章节在强调选择 ELISA 为首选方法的同时，明确指出单一 ELISA 法不足以全面表征 PSDE，需结合正交方法（如 1D/2D-PAGE 或 LC-MS/MS）来识别和追踪单个 PSDE。在此基础上，补充章节 <1132.1> 进一步为 LC-MS/MS 法在 PSDE 鉴定与定量分析中的应用提供了标准化指导，专门阐述了 MS 法与传统 ELISA 方法之间的正交关系，涵盖样品制备、数据采集、定量分析策略及方法验证等环节，标志着 MS 在 HCP 分析体系中正交地位的正式确立 [38]。PSDE 检测可分为靶向与非靶向检测。靶向检测依赖于同位素标记和精确富集，以实现绝对定量；非靶向检测则需借助肽库和生物信息学进行系统鉴定与相对定量分析，需开发提取范围更广泛的工艺以实现对更多杂质的覆盖。无论何种策略，样品预处理都是质谱检测成功的关键环节。

2.2.1 样品前处理

由于 PSDE 与蛋白药物含量相差 6 个数量级，因此需要对样品进行“干扰去除”和“目标浓缩”的前处理，再经 LC-MS/MS 分析才能精准检测到微量 PSDE。

HUANG 等 [39] 采用原生消化法富集 PSDE，即在非变性条件下直接向样品中添加胰蛋白酶，在保持治疗性蛋白完整性的同时，消化低丰度的 PSDE，以供质谱分析。由于操作简便、效率高，该法已逐渐成为 MS 检测 PSDE 的关键样品制备方法 [19]。YANG 等 [20] 进行了改进：通过提高底物与酶的比值、在还原步骤中添加脱氧胆酸钠，减少了 PSDE 与药物产品间的相互作用；并通过增设固相萃取步骤优化了抗体去除效果，检测灵敏度提升到 0.1 μg/g。

CHEN 等 [40] 采用超滤（截留分子量 50 000）技术进行样品前处理，再经 LC-MS 法识别、鉴定其中高丰度的 HCP。该法能去除大部分蛋白药物，有效富集大部分 PSDE，LOQ 低至 0.05 μg/g。采用该技术在美国国家标准与技术研究院提供的单克隆抗体（NIST mAb）配方中鉴定出的 PSDE 数量是天然消化法的 3 倍。研究 [13] 报道超滤技术结合有限消化法，也可提高 HCP 的检测灵敏度，LOQ 为 2 ng/g。但超滤法仅适用于相对分子质量低的酶，不适于检测相对分子质量 >50 000 的酶。

GRAF 等 [18] 建立了一种综合富集方法，首先采用蛋白 A 亲和色谱结合硫酸铵沉淀法去除高度纯化的单抗，随后联合抗 PSDE 亲和色谱进一步纯化硫酸铵沉淀过程中所得的析出物，采用 1D LC-MS 法检测痕量 PSDE，LOQ 为 50 μg/g。

2.2.2 非靶向检测

质谱数据采集方法取得的进展也进一步提升了 MS 法检测低丰度 PSDE 的能力。常见的非靶向质谱数据采集模式可分为 2 类：DDA 和 DIA。DDA 模式下，依据肽段母离子经离子化后的信号强度，筛选出信号强度最高的离子进行二级质谱（MS^2）碎裂分析 [28]。DIA 模式下，则通过采集特定质量范围内的完整碎片离子信息，实现 HCP 的非靶向鉴定。值得注意的是，DIA 模式需依托 DDA 模式生成的谱库，对复杂的 MS^2 信号进行分离和重建，并将其归属至匹配的肽段碎片特征谱。

YANG 等 [20] 采用 DDA-MS 法检测 PSDE，再结合“原生消化”策略，辅以固相萃取、表面活性剂添加等方法来增强低丰度 PSDE 肽段的回收率和检测信号。研究结果显示，该法可成功鉴定包括 LPLA2、棕榈酰蛋白硫酯酶、LPL、LAL 等 PSDE

在内的 845 种 HCP，对未知 HCP 展现出高覆盖率的优势，检测灵敏度提升至 0.1 μg/g。MA 等 [30] 采用 top10 DDA 方法（系统单次一级扫描后，优先对信号最强的 10 个母离子做二级碎裂）检测 NIST mAb 标准品中的 HCP。该研究采用胰酶进行样品前处理，并利用高温沉淀法去除未消化 / 部分消化的 mAb，从而显著减少了主成分的干扰。进一步引入高 pH 稳定性反相液相色谱柱，可在 3 h 内鉴定出 171 种 HCP。该方法打破了该标准品的检出纪录，显示出良好的深度表征潜力。

KREIMER 等 [31] 采用 DIA-MS 法，对所有前体离子进行片段化处理以实现循环选择，并记录所有生成的子离子信息，从而识别 HCP。该研究将 DIA 数据转换为伪 DDA 数据，并结合靶向和非靶向搜索策略，提高了分析的全面性及检测灵敏度，最终成功检测到 16 种 HCP，质量分数范围为 0.5 ～ 100 μg/g。该团队还使用 PRM 技术对所有标准品和 16 种 HCP 进行了验证，证实该基于 DIA 模式的 LC-MS 法可在短时间内高效、可靠地完成 HCP 分析。

CARVALHO 等 [32] 采用 LC-MS 法，基于顺序窗口采集全部理论质谱（sequential window acquisition of all theoretical mass spectra，SWATH）-DIA 相结合的方法，成功定量分析了特定 HCP。该法的显著优势为：即使某些 HCP 缺乏对应的同位素标记肽，仍可通过非靶向策略进行相对定量评估。这大幅提升了 HCP 检测与定量评估的灵活性和覆盖范围，有利于高风险 HCP 的定性与定量评估。与 ELISA 法相比，SWATH-DIA 法能提供更详细的 HCP 谱型。该方法的 LOD 为 0.92 μg/g，LOQ 为 1.84 μg/g，且能在单次试验中同时处理多个样品，大幅提高了检测效率，可用于生物工艺开发中的高通量筛选。

GUO 等 [41] 将基于 SWATH 的定量方法与标准加入法结合，检测 mAb 中的 HCP 水平，并通过靶向定量技术 MRM-MS/MS 法和 ELISA 法验证其定量结果。结果表明，这种基于 SWATH 的定量工作流程能有效监测不同处理合并液中的 PSDE 清除率，为下游工艺开发提供支持。DIA 模式下产生的数据集较为复杂，通常需要进行大量原始数据分析。目前，Spectronaut 软件支持直接从 DIA 采集的原始数据出发，依据蛋白质数据库（FASTA 文件）生成质谱谱图库，无需独立的 DDA 建库步骤 [16]。

2.2.3　靶向检测

靶向 MS 分析（如基于 MRM、PRM 以及 DIA 等模式）能借助预先设定的离子对实现特定肽段的绝对定量分析，具有高度特异性，可显著提升 PSDE 的检测灵敏度。该方法通常需依赖内标物质，以获取准确的定量信息。这些标准品与待测样品中的内源性肽段在理化性质上应高度一致，从而保证了目标酶浓度测定结果的精确性。针对 LPL、LPLA2 等高风险 PSDE，可基于上述策略快速建立相应的靶向检测方案，从而实现从早期工艺开发到生产放大的全过程监测。MRM 模式通常需配合三重四极杆质谱仪使用，通过检测特定肽段产生的特征碎片离子实现目标物的定量分析。PRM 模式则基于轨道阱高分辨质谱平台，能同步采集目标肽段的全部碎片离子信号。

CHIU 等 [16] 采用 LC-MS 法鉴定并表征了 CHO 细胞培养物中频繁检出的 HCP，包括 LPL。该研究也将 LC-MS 用于追踪深层过滤过程中 HCP（包括 LPL）的去除情况，以评估工艺的纯化效果。

GAO 等 [33] 采用多路复用 LC-MRM 法监测生物制品生产过程中 LPLA2 的含量。结果显示，该方法的检测范围为 1 ～ 500 μg/g，灵敏度高（LOQ 为 1 μg/g），可用于支持上游和下游工艺开发，特别是在过程优化阶段，能提供快速、准确的数据支持。

CHEN 等 [34] 利用 LC-MS/MS 结合高分辨率多反应监测靶向技术对 3 种 PSDE 进行了定量分析。该研究以合成肽段标准品和同位素标记肽段为内标，借助质谱系统增强模式，显著提高了目标肽段的信号强度，成功将 PSDE 的 LOQ 降至 1 μg/g 以下。

ZHANG 等 [42] 采用活性位点导向富集技术，结合纳升液相色谱 - 串联质谱（nanoLC-MS/MS）及 PRM 分析，成功鉴定并定量了肝羧酸酯酶 B-1 样蛋白和肝羧酸酯酶 1 样蛋白。

KREIMER 等 [31] 采用 DIA-MS 技术，在复杂药物背景中高通量地初步筛选出可能存在的 HCP 肽段；针对筛选出的候选 HCP 肽段，利用 PRM 技术

进行靶向验证，并实现了精确定量（定量范围为 1 ～ 100 ng/mg）。

YANG 等[20]采用添加离子去污剂脱氧胆酸钠的方法来打破 PSDE 与 mAb 之间的相互作用，以提高肽的溶解度，并用长梯度 nanoLC-MS PRM 法检测 PSDE。结果显示，该法对特异性 PSDE 的 LOQ 低至 0.06 ng/g，有效解决了“在不同相对分子质量和序列特征的 PSDE 之间，低于 1 μg/g 的 HCP 识别灵敏度及重复性较差”的问题。

3 挑战与展望

HCP 的检测是重组蛋白质类药物制剂质量控制的重要环节。标准检测方法包括 ELISA 和 MS。然而，这 2 种定量方法在结果一致性和溯源性方面仍然面临挑战，主要体现在以下方面。①缺乏尺度统一且可溯源的标准物质。无论是总 HCP 检测还是特定 PSDE（如 LPLA2）的定量分析，均缺乏经权威机构认证的标准品。这导致不同实验室、不同企业、不同地区间检测结果难以有效比对和验证，检测结果的准确性和可靠性难以保证。ELISA 及 MS 法的检测结果均无法锚定“绝对含量”，难以进行跨企业、跨地区的结果比对。②缺乏标准化检测流程。检测 HCP 不仅需要统一的测量标准，还需标准化的检测流程。然而，现有检测流程差异显著，不同实验室和企业采用的方法与技术各异，进一步加剧了检测结果的不一致性。

各国药品监管机构已经意识到这一领域的空白。USP-NF 2025 年版的补充章节 <1132.1> 收录了用于鉴定和定量的肽段，并提供了磷脂酶 B 样蛋白 2 标准物质。这一举措为 HCP 检测提供了一套标准化的参考流程，也为关键 PSDE 的检测和定量分析提供了重要的参考。从长远来看，研制 PSDE 标准物质不仅可填补该领域标准物质的空白，还将为其他功能性工艺杂质的标准物质研制提供参考依据。此外，这也将推动生物制品杂质检测技术的进步，助力实现“全品类覆盖、全流程溯源、全生命周期监控”的目标。这些举措将使生物制药行业中的 HCP 检测更具科学性、严谨性与高效性，从而为药品质量控制和患者安全提供可靠保障。

参考文献：

[1] 梁超超, 咸瑞卿, 石 峰, 等. 生物制品中宿主细胞残留蛋白的检测研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(11): 1371-1378.

[2] 刘冀虹. 宿主细胞蛋白残留检测技术在单抗质控中的运用[J]. 中国质量监管, 2025, (12): 106-107.

[3] WANG F Q, LI X W, SWANSON M, *et al*. Holistic analytical characterization and risk assessment of residual host cell protein impurities in an active pharmaceutical ingredient synthesized by biocatalysts [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, **119**(8): 2088-2104.

[4] OH Y H, BECKER M L, MENDOLA K M, *et al*. Characterization and implications of host-cell protein aggregates in biopharmaceutical processing [J]. *Bintechnol Bioeng*, 2023, **120**(4): 1068-1080.

[5] WUCHNER K, YI L D, CHERY C, *et al*. Industry perspective on the use and characterization of polysorbates for biopharmaceutical products part 1: survey report on current state and common practices for handling and control of polysorbates [J]. *J Pharm Sci*, 2022, **111**(5): 1238-1245.

[6] CHENG Y, HU M, ZAMIRI C, *et al*. A rapid high-sensitivity revers-dephase ultra high performance liquid chromatography mass spectrometry method for assessing polysorbate 20 degradation in protein therapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2019, **108**(9): 2880-2886.

[7] KHAN T A, MAHLER H C, KISHORE R S K, *et al*. Key interactions of surfactants in therapeutic protein formulations: a review [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, **97**(pt A): 60-67.

[8] 李 英, 李加齐, 姚雪静, 等. 聚山梨酯在治疗性抗体中应用和引发不溶性颗粒的研究概况[J]. 中国现代应用药学, 2024, **41**(3): 428-438.

[9] LI X W , CHANDRA D, LETARTE S, *et al*. Profiling active enzymes for polysorbate degradation in biotherapeutics by activity-based protein profiling [J]. *Anal Chem*, 2021, **93**(23): 8161-8169.

[10] LI X W, WANG F Q, LI H, *et al*. The measurement and control of high-risk host cell proteins for polysorbate degradation in biologics formulation [J]. *Antib Ther*, 2022, **5**(1): 42-54.

[11] YUK I H, KOULIS T, DOSHI N, *et al*. Formulation mitigations for particle formation induced by enzymatic hydrolysis of polysorbate 20 in protein-based drug products:

insights from a full-factorial longitudinal study [J]. *AAPS Open*, 2022, **8**(1): 18.

[12] ZHANG S S, RICCARDI C, KAMEN D, *et al*. Identification of the specific causes of polysorbate 20 degradation in monoclonal antibody formulations containing multiple lipases [J]. *Pharm Res*, 2022, **39**(1): 75-87.

[13] HALL T, SANDEFUR S L, FRYE C C, *et al*. Polysorbates 20 and 80 degradation by group XV lysosomal phospholipase A2 isomer X1 in monoclonal antibody formulations [J]. *J Pharm Sci*, 2016, **105**(5): 1633-1642.

[14] GUPTA S K, GRAF T, EDELMANN F T, *et al*. A fast and sensitive high-throughput assay to assess polysorbate-degrading hydrolytic activity in biopharmaceuticals [J]. *J Pharm Sci*, 2023, **187**: 120-129.

[15] ZHANG J T, HE J Y, SMITH K J. Fatty acids can induce the formation of proteinaceous particles in monoclonal antibody formulation [J]. *J Pharm Sci*, 2022, **111**(3): 655-662.

[16] CHIU J, VALENTE K N, LEVY N E, *et al*. Knockout of a difficult-to-remove CHO host cell protein, lipoprotein lipase, for improved polysorbate stability in monoclonal antibody formulations [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2017, **114**(5): 1006-1015.

[17] LIU G Y, NIE S, ZHENG X J, *et al*. Activity-based protein profiling probe for the detection of enzymes catalyzing polysorbate degradation [J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(24): 8625-8632.

[18] GRAF T, TOMLINSON A, YUK I H, *et al*. Identification and characterization of polysorbate-degrading enzymes in a monoclonal antibody formulation [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(11): 3558-3567.

[19] DIXIT N, SALAMAT-MILLER N, SALINAS P A, *et al*. Residual host cell protein promotes polysorbate 20 degradation in a sulfatase drug product leading to free fatty acid particles [J]. *J Pharm Sci*, 2016, **105**(5): 1657-1666.

[20] YANG F, LI D, KUFER R, *et al*. Versatile LC-MS-based workflow with robust 0.1 ppm sensitivity for identifying residual HCPs in biotherapeutic products [J]. *Anal Chem*, 2022, **94**(2): 723-731.

[21] MAIER M, WEIß L, ZEH N, *et al*. Illuminating a biologics development challenge: systematic characterization of CHO cell-derived hydrolases identified in monoclonal antibody formulations [J]. *MAbs*, 2024, **16**(1): 2375798.

[22] KOVNER D, YUK I H, SHEN A, *et al*. Characterization of recombinantly-expressed hydrolytic enzymes from Chinese hamster ovary cells: identification of host cell proteins that degrade polysorbate [J]. *J Pharm Sci*, 2023, **112**(5): 1351-1363.

[23] ZHANG S S, XIAO H, GOREN M, *et al*. Putative phospholipase B-like 2 is not responsible for polysorbate degradation in monoclonal antibody drug products [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(9): 2710-2718.

[24] DEHGHANI A, BINDER F, ZORN M, *et al*. Investigating pH effects on enzymes catalyzing polysorbate degradation by activity-based protein profiling [J]. *J Pharm Sci*, 2024, **113**(3): 744-753.

[25] ZHANG S S, XIAO H, LI N. Degradation of polysorbate 20 by sialate *O*-acetylesterase in monoclonal antibody formulations [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(12): 3866-3873.

[26] Immunology Consultants Laboratory. Hamster (CHO) lysosomal phospholipase A2 (LPLA) [EB/OL]. [2025-04-07]. https://www.icllab.com/media/catalog/product//pdf/E-65LPLA_V4.1.pdf.

[27] 相裕静, 陆　娇. 酶联免疫吸附法检测艾滋病抗体的影响因素研究[J]. 生命科学仪器, 2025, **23**(1): 80-82.

[28] OSKO J D, RIVERA S, WANG F Q, *et al*. Development of a multiplexing method for the quantification of "high-risk" host cell lipases in biotherapeutics by Luminex [J]. *Anal Chim Acta*, 2024, **1332**: 343349.

[29] HUANG Y, MOLDEN R, HU M Q, *et al*. Toward unbiased identification and comparative quantification of host cell protein impurities by automated iterative LC-MS/MS (HCP-AIMS) for therapeutic protein development [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, **200**: 114069.

[30] MA J, KILBY G W. Sensitive, rapid, robust, and reproducible workflow for host cell protein profiling in biopharmaceutical process development [J]. *J Proteome Res*, 2020, **19**(8): 3396-3404.

[31] KREIMER S, GAO Y W, RAY S, *et al*. Host cell protein profiling by targeted and untargeted analysis of data independent acquisition mass spectrometry data with parallel reaction monitoring verification [J]. *ACS Chem*, 2017, **89**(10): 5294-5302.

[32] CARVALHO S B, PROFIT L, KRISHNAN L, *et al*. SWATH-MS as a strategy for CHO host cell protein identification and quantification supporting the characterization of mAb purification platforms [J]. *J Biotechnol*, 2024, **384**: 1-11.

[33] GAO X L, RAWAL B, WANG Y, *et al*. Targeted host cell protein quantification by LC-MRM enables biologics

processing and product characterization [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(1): 1007-1015.

[34] CHEN Y Q, XU C F, STANLEY B, *et al*. A Highly Sensitive LC-MS/MS method for targeted quantitation of lipase host cell proteins in biotherapeutics [J]. *J Pharm Sci*, 2021, **110**(12): 3811-3818.

[35] 朱中松, 赵丽丽, 张贵民, 等. 鼠源抗CD47单克隆抗体的筛选及活性评价[J]. 中国医药工业杂志, 2022, **53**(5): 672-678.

[36] 王志明. 基因工程药物中宿主细胞蛋白的检测与控制[J]. 中国新药杂志, 2016, **25**(22): 2550-2557.

[37] CHENG Y T, KISHIMOTO J, YE Z H, *et al*. Quantitative western blotting adapted for expanded sample capacity with non-linear curve fitting [J]. *J Plant Res*, 2026, **139**(2): 317-329.

[38] 于继伟, 尹红锐, 邵 泓. 质谱技术在单克隆抗体类药物宿主细胞残留蛋白检测中的应用进展[J]. 药物流行病学杂志, 2023, **32**(4): 458-465.

[39] HUANG L H, WANG N, MITCHELL C E, *et al*. A novel sample preparation for shotgun proteomics characterization of HCPs in antibodies [J]. *Anal Chem*, 2017, **89**(10): 5436-5444.

[40] CHEN I H, 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**(5): 3751-3757.

[41] GUO J, KUFER R, GREENWOOD-GOODWIN M, *et al*. A workflow for accurate and consistent quantitation of host cell proteins by SWATH LC-MS/MS analysis to support process development [J]. *J Pharm Sci*, 2025, **114**(2): 1002-1009.

[42] ZHANG S S, XIAO H, MOLDEN R, *et al*. Rapid polysorbate 80 degradation by liver carboxylesterase in a monoclonal antibody formulated drug substance at early stage development [J]. *J Pharm Sci*, 2020, **109**(11): 3300-3307.

