

特约专题

治疗性单克隆抗体修饰变异体的液质联用分析技术进展

叶沛均,左成意,刘振虎,廖玉玲,江正瑾,王启钦*

(暨南大学 药学院 药物分析研究中心,广东 广州 511436)

摘要:治疗性单克隆抗体(mAbs)因具有靶向性高、药效作用强等优点而广泛应用于恶性肿瘤和自身免疫性疾病的高效治疗,成为全球新药研发热点。由于抗体药物自身结构复杂,尤其在生产、储存等过程甚至在病人体内易出现各种修饰变化,如氧化、脱酰胺化、糖基化等,这些修饰不仅会增加 mAbs 的异质性,还会影响其稳定性和生物活性,因此监测 mAbs 体内外修饰变化情况,对于药物研发、生产及体内动态变化分析意义重大。液质联用技术(LC-MS)通过将液相色谱分离和质谱检测相结合已成为抗体质量研究和临床监测的重要分析手段,而 mAbs 体内分析的生物样本前处理面临着基质干扰严重以及血药浓度低等分析挑战。系统总结了抗体修饰变异体分析技术涉及的样本前处理过程和 LC-MS 技术的应用进展。

关键词:单克隆抗体;修饰变异体分析;样品前处理;基于质谱的蛋白质组学策略;液质联用技术

中图分类号:R917 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)12-0001-12

DOI:10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0410

Advances in LC-MS Analysis of Therapeutic Monoclonal Antibody Modification Variants YE Pei-jun, ZUO Cheng-yi, LIU Zhen-hu, LIAO Yu-ling, JIANG Zheng-jin, WANG Qi-qin* (Institute of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 511436, China)

Abstract: Therapeutic monoclonal antibodies (mAbs) are widely used in the efficient treatment of malignant tumors and autoimmune diseases due to their advantages of high targeting and potent effects, and have become a hotspot for new drug research and development worldwide. Due to the complex structure of antibody drugs, modification variants, such as oxidation, deamidation, glycosylation, etc., easily occur in the process of production, storage, and even in patients, which not only increase the heterogeneity of the mAb, but also affect its stability and bioactivity, so the monitoring of the changes of mAb's in vitro and ex vivo modification is essential for the analysis of the drug research and development, production, and the dynamics of the fate of mAb in vivo analysis. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has become an important analytical tool for antibody quality research and clinical monitoring by combining liquid chromatography separation and mass spectrometry detection, whereas the pre-treatment of biological samples for in vivo analysis of mAb faces analytical challenges such as severe matrix interferences as well as low blood drug concentrations. The sample pre-treatment process and the progress of the application of LC-MS technology involved in the analysis of antibody modification variants were summarised.

Key words: monoclonal antibodies; modification variant analysis; sample pre-treatment; MS-based proteomic strategies; LC-MS

治疗性单克隆抗体(mAbs)是由单一 B 细胞克隆产生的具有高度均一性且仅针对如人表皮生长因子受体 2(HER2)、B 淋巴细胞抗原(CD19 或 CD20)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)等某一特定抗原表位的蛋白药物,具有高特异性、高靶向性等特点^[1]。抗体药物已成为全球重大疾病治疗药物研究热点^[2-4],从早期的鼠源单抗发展到全人源单抗,许多产品被批准用于治疗癌症、自身免疫性疾病等^[5-9],其中商业化发展比较成熟的有阿达木单抗、英夫利昔单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗等^[10]。治疗性抗体药物具有广阔的市场前景,截至 11 月 17 号,2023 年共有 16 个新的抗体产品

收稿日期:2024-09-18;网络首发日期:2024-10-17

基金项目:暨南大学中央高校基本科研业务费-JG 计划项目(21623407);国家自然科学基金面上项目(82173773);广东省药品监督管理局科技创新项目(2023TDZ11);广东省自然科学基金-省企联合基金面上项目(2021A1515220099);广州市科技计划“续航”项目(2024A04J9919)。

作者简介:叶沛均(2000-),女,广东东莞人,硕士生,主要研究方向为抗体及其偶联物的生物转化分析。

通讯作者:王启钦,E-mail:qiqinxu@163.com。

引用本文:叶沛均,左成意,刘振虎,等.治疗性单克隆抗体修饰变异体的液质联用分析技术进展[J].化学试剂,2024,46(12):1-12。

获得首次批准上市,未来获批数量将呈快速增加趋势^[11,12];许多基于 mAb 的衍生化产品,如抗体偶联药物、双特异性抗体、Fc 融合蛋白等发展极其迅速,全球抗体药物市场价值在 2025 年预计将达到 3 000 亿美元^[3]。

抗体药物翻译后修饰 (PTMs) 或体内化学修饰可能将诱导产生一级结构、电荷、大小变异体等,如果修饰发生在互补决定区 (CDR) 关键位点处,将可能影响“抗原-抗体”结合能力诱发免疫识别缺陷,降低药效,亦或改变原来的药代动力学特征,增加患者治疗的不良效果。因此监测体内外 mAb 的修饰变化,不仅利于抗体药物研发早期各个阶段对 PTMs 的表征和风险评估,确保产品的批次一致性和有效性,而且利于了解抗体药物体内命运动态以及在不同患者体内发生修饰程度的差异化结果,为新药开发提供重要参考。然而抗体体内分析所用的样本往往来自复杂的血清样本,存在血药浓度低和同源性人免疫球蛋白 G (hIgG) 以及其他杂蛋白干扰严重的分析难点,传统抗体生产纯化工艺采用的富集方法应用局限于简单样本体系以及无法解决 hIgG 非特异性干扰的难题,因此不适用于临床样本分析。近年来一系列能够实现抗体高效、精准捕获的前处理技术如新型分子识别材料的开发等迅速发展,以满足抗体药物体内分析的迫切需求。本文聚焦于免疫亲和-LC-MS 技术在抗体药物修饰分析中的应用进展,主要从样本前处理和 LC-MS 两个方面系统介绍相关技术的发展情况。

1 抗体结构与性质

治疗性 mAbs 分子量约 150 kDa,目前临床上大多数抗体药物是 IgG1 型抗体^[13]。IgG1 主要由两条分子量约为 50 kDa 的相同重链、两条分子量约为 25 kDa 的相同轻链以及铰链区 3 部分组成具有特定空间结构的四肽链结构^[14],其中轻重链通过一对链间二硫键相连,两条重链之间通过含有两对链间二硫键的铰链区连接。根据氨基酸序列的变异程度可将单抗的轻重链划分为独特的可变区 (V 区) 和保守的恒定区 (C 区) 两种结构域,分别对应可变轻链 V_L 、恒定轻链 C_L 和可变重链 V_H 、恒定重链 C_H1 、 C_H2 、 C_H3 (图 1)。从 IgGs 生理功能的角度解释其结构,Y 字形抗体两臂的一端是由完整轻链和重链的 V 区、 C_H1 区构成的抗原识别片段 (Fab 段),其中靠近 N 端轻重链的 2 个

可变区中含有 3 段高度变化的氨基酸序列,该区域被称为互补决定区 (CDR),负责调节与抗原表位的相互作用和决定结合亲和力大小;靠近 C 端两条重链的 Fc 区相当于 IgG 恒定区的 C_H2 、 C_H3 区域,是效应细胞和补体的结合位点,能够发挥一系列免疫效应,如抗体依赖细胞介导的细胞毒性作用 (ADCC)、抗体依赖细胞介导的吞噬作用 (ADCP) 和补体依赖的细胞毒性作用 (CDC)^[15];2 个 Fab 段通过富含弹性和柔性的铰链区与 2 个 Fc 段相连,二者结合具有靶向治疗和增强肿瘤杀伤整体的协同作用,同时有研究证明通过将 Fab 段或 Fc 段进行工程化改造能够合理改善其在体内的性质与疗效^[16]。

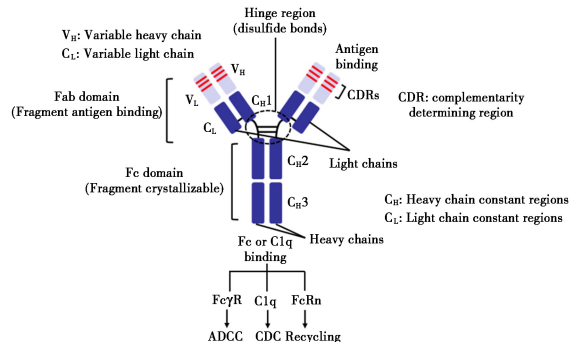


图 1 IgG1 的结构

Fig.1 Structure of IgG1

单克隆抗体受合成工艺和各种理化条件如 pH、温度、光照等^[17]的影响,使得其在生产储存过程中容易诱发各种修饰,加速降解。常见的修饰变异体有糖基化、糖化、氧化、脱酰胺化、异构化、N 端谷氨酰胺或谷氨酸环化、C 端赖氨酸剪切、二硫键的形成^[18,19]等类型 (图 2)。由此产生的多种糖型、电荷、一级序列变异体造成抗体的不均一性和免疫原性,引起生物活性下降,这些修饰在药物开发的过程中常常被认为是检测的关键质量属性之一^[20]。此外,这些修饰在体内的动态追踪也是单抗生物转化研究的重要内容,抗体给药以后各类修饰可能在体内加速产生,甚至这些变化将对其稳定性、安全性以及药代动力学特征^[21-23]产生不可忽视的影响。研究表明单抗 CDR 区天冬酰胺脱酰胺化和异构化因为破坏 CDR 区的局部结构,产生变构效应使 Fab 段结合抗原的效价降低^[24];糖基化的聚糖类型会影响蛋白的血浆清除效率,如连接高甘露糖糖链的抗体相比其他糖型在体内被清除得更快^[25];甲硫氨酸或色氨酸氧化导致抗体高级结构的改变可能会引

入聚集体,带来免疫原性风险^[26];可变结构域表面的电荷分布与 FcRn 受体的结合有关,影响抗体的组织清除率和半衰期^[27]。抗体药物体内外修饰分析研究关注一级结构氨基酸序列不同位点,尤其是 CDR 区发生的修饰类型和变异程度,分析具体位点对修饰的易感性^[28,29],通过发现一些潜在的化学降解位点,有利于更好地评估各类修饰带来的质量风险以及监测其在体内的生物转化情况。然而这些修饰变异体往往丰度低、不稳定,容易受样品前处理和质谱离子化过程的影响,其修饰状态的表征和量化仍存在一定的挑战^[30]。

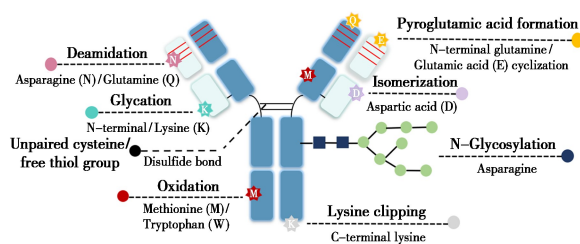


图 2 IgG1 的常见修饰变异体

Fig.2 Common modification variants of IgG1

2 样品前处理技术

样品前处理是 mAbs 生物分析过程中一个繁琐、耗时的步骤,如何从复杂样本中实现有效富集、减少基质效应、提高分析灵敏度是前处理的关键和 LC-MS 有效分析的前提。将 mAbs 切割成亚基或肽段是常规质谱检测兼容性较好的形式,选择合适的酶切策略有利于增加蛋白序列覆盖度和目标肽段质谱响应。也有相关研究尝试设计将富集纯化、酶切、除盐等步骤集成化的平台以简化处理操作,体现快速、高效的优点^[31],或者实现在线前处理与质谱检测的结合^[32]。缩短样品制备时间,前处理的高通量和自动化对于维持单抗药物的同质性、减少人为引入的修饰变异体是非常有意义的。

2.1 富集纯化技术

传统单抗生产纯化工艺如过滤法、蛋白沉淀法、离子交换层析法等利用蛋白质共有的物化特性实现简单的初步分离,其富集纯化往往不具有选择性。然而抗体药物体内分析的临床样本往往来自人体血清,面临血清复杂基质中内源性成分非特异性干扰的挑战,血清蛋白种类丰富,其中白蛋白和免疫球蛋白约占蛋白总重量的 75%^[33],因此如何开发高效精准识别的富集纯化方法对后续

mAbs 体内准确的修饰分析至关重要。目前 PTMs 富集方法主要是基于电荷性质、抗体识别、酶学等原理在蛋白完整或者肽段水平实现(图 3)^[34],本文主要总结基于完整水平下抗体识别的亲纯化富集方法,与传统纯化相比,亲和纯化法因高选择性和高亲和活性已逐渐成为 mAbs 生物样本前处理的新关注点。

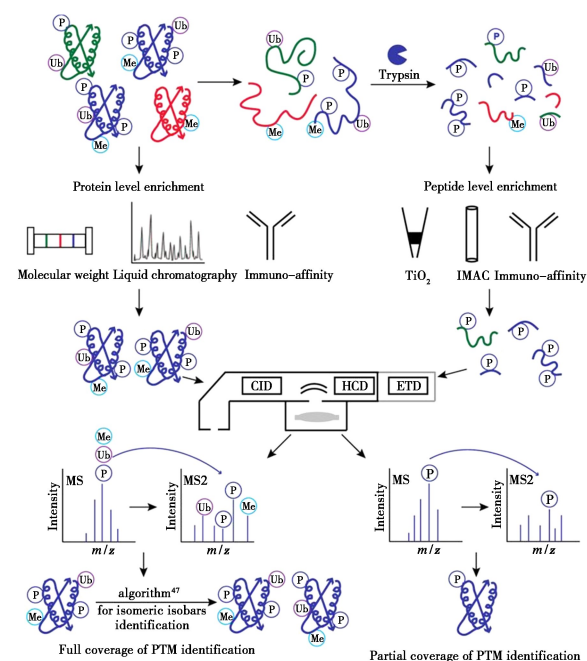


图 3 修饰变异体的富集策略^[34]

Fig.3 Enrichment strategies for modification variants^[34]

亲和纯化法是利用模拟生物学中蛋白与配体关键区域之间相互作用的识别元件实现可逆、特异性结合目标物,通过改变离子强度、pH 等优化淋洗条件去除杂质干扰,然后在合适的洗脱条件下富集目标物^[35,36]。传统的 IgG Fc 亲和配体如金黄色葡萄球菌的蛋白 A 或 G 型链球菌的蛋白 G 虽然能够结合 IgG 的 Fc 片段,但是与宿主细胞蛋白之间也存在非特异性吸附,使用过程中容易出现蛋白泄漏、稳定性较差、可重复利用性低等缺点^[37-40],因此后续也发展了其他各种 IgG 免疫亲和和代替性配体克服以上不足^[41]。但是 mAbs 的临床样本分析面临的基质干扰主要来自于内源性抗体 IgG,这要求富集纯化方法需要兼具特异性和高效性,目前抗体药物体内分析多采用抗独特性抗体结合 ELISA 法,然而这类方法存在开发周期长、难度大、成本高等缺点。随着材料化学、噬菌体展示等技术的发展,通过筛选合成或设计得到的有抗体表面结合区域的替代性结合蛋白、适

配体、表位模拟肽^[42-44]等新型仿生亲和配体作为特异性分子识别元件时,能够减少序列同源性很高的 IgG 非特异性干扰,高效精准捕获复杂血清样本的目标单抗。除此之外,固定亲和配体的载体在整个富集体系中的稳定性、配体接枝密度以及非特异性吸附情况等也会影响着纯化效果,为克服这些问题逐渐发展出了纳米材料^[45]、亲和整体材料^[46]、功能化膜^[47]等多样化的固定相形式(图 4)^[48]。Yang 等^[49]将组氨酸标签标记的 CD20 表位模拟肽通过金属离子 Ni^{2+} 螯合固定在比表面积大、分离速度快的微米级磁性复合材料表面,该仿生复合材料能够应用于临床非霍金淋巴瘤患者血清样本中利妥昔单抗的有效富集和脱酰胺、氧化修饰的生物转化分析;Lu 等^[44]将 HER2 表位模拟肽固定在整体柱材料上,对患者血清中的曲妥珠实现了有效富集,结合胰蛋白酶消化和 LC-QTOF-MS 技术构建了一个全新的生物分析平台,监测到曲妥珠单抗在患者体内发生修饰程度的差异化结果;Lei 等^[50]开发了一种双配体固定的多表位识别复合纳米材料来靶向抗体药物的不同关键区域,实现了超高的配体接枝密度和高度的特异性,能够对血清中的 ADC 药物实现精准富集,通过结合 RPLC-QTOF-MS 技术,实现了血清中 ADC 药物的动态监测变化;He 等^[51]提出了一种“多价识别”策略,采用 CD20 表位模拟肽衍生物作为靶标抗体识别的超分子纳米纤维,成功追踪了利妥昔单抗在入血清中孵育 21 d 后重链第 55 号位天冬酰胺的脱酰胺变化。

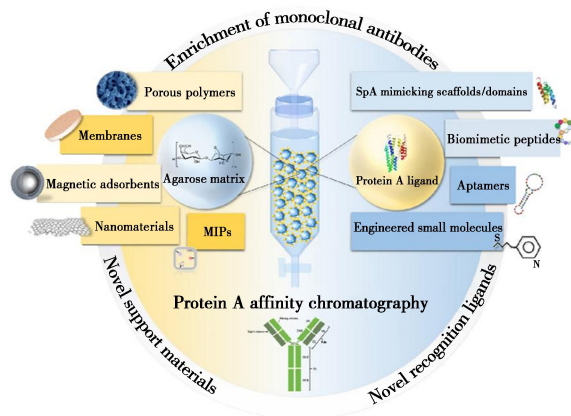


图 4 单克隆抗体亲和纯化的新兴方法^[48]

Fig.4 Emerging methods for mAb affinity purification^[48]

2.2 酶切策略

酶切是指大分子单抗的消化过程,目的是通过特异性的酶如免疫球蛋白 G 降解酶(IdeS)、木

瓜蛋白酶(papain)、胰蛋白酶(trypsin)、赖氨酸 C 端内切酶(Lys-C)、糜蛋白酶(chymotrypsin)等在相应的氨基酸位点上切成亚基或肽段混合物(图 5^[52]和表 1)。酶切策略常与自中而上/下(middle-up/down)和自下而上(bottom-up)这两种蛋白质组学的质谱分析策略相对应,与不酶切的自上而下分析(Top-down)相比,酶切后分子量减小的亚基片段或者肽段更有利于在质谱中的电离,而且对于监测特定结构域或者肽段具体位点的翻译后修饰具有重要意义,缺点是酶切之后无法获得完整蛋白的天然结构信息。

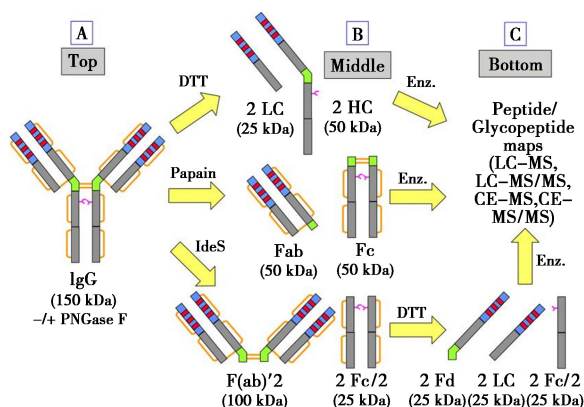


图 5 单抗的酶切^[52]

Fig.5 Enzymatic digestions of mAb^[52]

表 1 常见酶及其酶切位点^注

Tab.1 Common enzymes and their cleavage sites

酶	酶切位点	酶切产物形式
免疫球蛋白 G 降解酶 (IdeS)	重链铰链区二硫键以下两个连续的甘氨酸位置	1 个 $\text{F}(\text{ab}')_2$ + 2 个单链 $\text{Fc}/2$
木瓜蛋白酶 (papain)	重链铰链区二硫键近 N 端	2 个 Fab 片段 + Fc 片段
胃蛋白酶 (pepsin)	苯丙氨酸、亮氨酸、酪氨酸和色氨酸等的 C 端进行水解	1 个 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 2 片段和部分肽段
胰蛋白酶 (trypsin)	赖氨酸或精氨酸的 C 端 (其后不接脯氨酸)	肽段
赖氨酸内切酶 (Lys-C)	赖氨酸的 C 端 (其后不接脯氨酸)	肽段
糜蛋白酶 (chymotrypsin)	苯丙氨酸、亮氨酸、色氨酸、酪氨酸、蛋氨酸的 C 端 (其后不接脯氨酸, 酪氨酸前没有脯氨酸)	肽段

注:1)代表二价的抗原结合片段。

酶切之前一般经过变性、还原、烷基化等处理,对于一些复杂的糖蛋白可加入糖苷酶进行去糖基化以简化谱图,提高质谱分析结果的准确性。不同酶的酶切效率和特异性存在差异,酶切后的

序列覆盖度会影响肽段的修饰定位^[53]。目前也有许多研究通过多种酶切策略联用、优化酶切条件或者建立新的酶切平台等以达到快速、高通量处理单抗的目的。Wu 等^[54]评估赖氨酸内切酶/梭菌蛋白酶 (Lys-C/Arg-C) 组合作为酶切工具应用于蛋白质组学研究中的定性和定量分析时,发现这两种酶联合使用比目前广泛使用的 Trypsin 或者 Lys-C/Trypsin 具有更好的酶切特异性、酶切效率和鉴别能力;Wang 等^[55]提出的超快 Trypsin 酶切的液质联用法 (ultrafast LC-MS) 是将单抗经还原处理后直接进行 5 min 的酶切产物进入 LC-MS 分析,省去了烷基化的步骤,结果表明不仅能同时监测多种类型的修饰变异体,而且大大减少了因酶切时间过长而导致人为引入的甲硫氨酸氧化、天冬氨酸异构化及脱酰胺化等变异体;Chiu 等^[56]在捕获单抗的磁珠体系中提高温度至 60 °C 加入 Trypsin 分别对 5 种不同单抗进行酶解,与传统的低 pH 洗脱后酶切方法相比,磁珠原位酶切法的 LC-MS 定量结果展现出更好的灵敏度和重现性,在最优条件下成功应用于曲妥珠单抗治疗临床样本的定量分析。

3 质谱分析技术

质谱 (MS) 技术主要是通过测定样品气态离子的质荷比大小进行鉴定,目标物在离子源中发生电离变成不同质荷比的带电离子后,通过质量分析器筛选形成的质谱图可用于定性和定量分析。对于生物大分子来说,离子化技术如电喷雾

电离 (ESI) 和基质辅助激光解吸电离 (MALDI) 的出现大大提高了其在气相中的电离效率,二级质谱中多样化的裂解方式如碰撞诱导解离 (CID)、新型的电子转移解离 (ETD)、电子捕获解离 (ECD)、紫外光诱导解离 (UVPD) 以及高分辨质谱技术如静电场轨道阱 (Orbitrap) 质谱、四级杆-飞行时间 (Q-TOF) 串联质谱、傅立叶变换离子回旋共振质谱 (FT-ICR MS)^[57] 等的出现为蛋白质药物的深度表征提供了更多可能。

目前,质谱因其优越的结构分辨能力广泛应用于抗体分子量测定、一级结构测序及空间结构鉴定等各种结构表征,是蛋白质组学研究中应用最强大的分析技术,也是蛋白修饰分析的“金标准”。各类翻译后修饰或化学修饰引起的分子质量差值 (Δm) 在质谱图中表现为相应的峰位移,根据酶切的特异性和修饰导致的 Δm 这种可视化结果推断可能发生的修饰位点及类型。蛋白质组学常见的质谱分析策略可分为 top-down、middle-up/down 和 bottom-up 这 3 种策略 (图 6)^[58],其中 bottom-up 策略主要是指蛋白酶切成肽段后再进入质谱分析得到肽图的过程,该策略肽段检测的灵敏度和裂解效率远高于 top-down 和 middle-up/down,应用更广泛,有利于提供微小质量差异的变异体定性和定位信息。肽图在 mAbs 多属性监测方法应用中具有很大潜力,主要缺点是前处理耗时且操作复杂,容易引入人工副产物,无法获得完整蛋白结构和不同修饰之间的关联信息。对于以完整蛋白为分析对象的 top-down 策略来说,

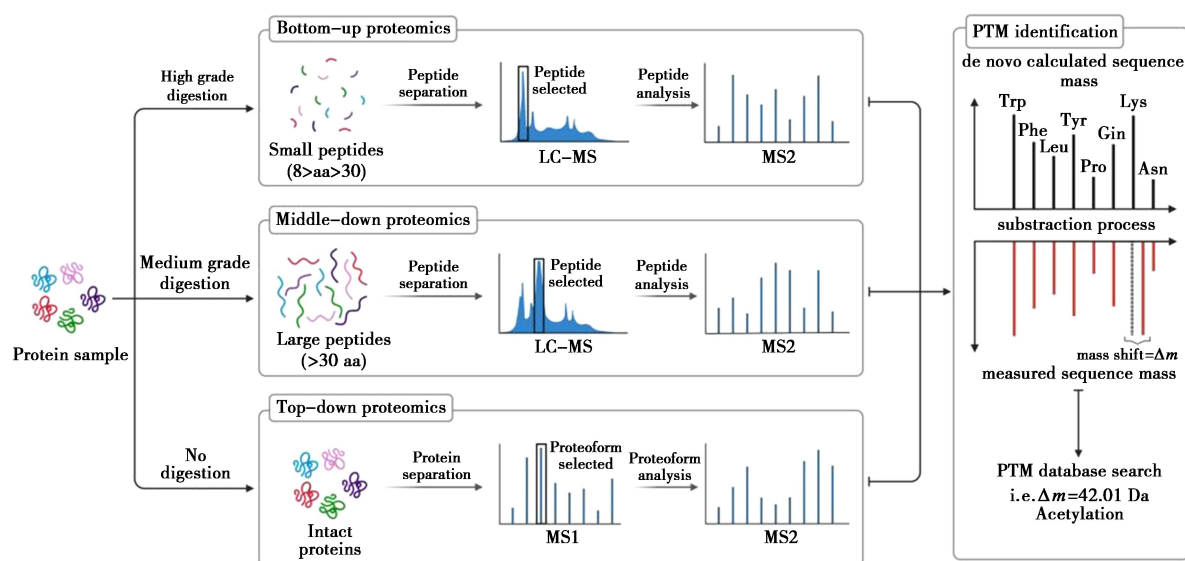


图 6 3 种基于质谱的蛋白质组学策略^[58]

Fig.6 Three MS-based proteomics strategies^[58]

其不需要经过耗时、步骤繁琐的酶切过程直接进入质谱电离,可获得完整分子质量、部分修饰、100%的序列覆盖率等信息,但是进入质谱分析的蛋白质分子量越大得到的谱图越复杂,解析谱图对仪器的分辨率和质量范围要求更高,受限于检测难度以及成本,其方法开发尚未成熟。介于以上两种质谱分析策略的优缺点, middle-up/down 策略是指通过将完整蛋白进行有限酶切获得亚基片段大小的混合物,与 top-down 相比可降低大分子难电离和碎裂的困难,对仪器测量的分辨率要求适中,可提供亚基水平的变异体表征信息如糖基化、氧化,为揭示特定结构域上不同修饰之间的相关性提供可能,与 bottom-up 相比其简化了前处理步骤,但是和 top-down 一样获得的修饰位点特异性信息有限。根据分析目的和仪器条件选择不

同的策略或者多种策略联用^[59]以获得更为互补、更为全面的单抗表征信息。

3.1 液质联用技术

由于抗体发生修饰可能会不同程度地改变其疏水性、表面带电分布等理化性质,导致不同分离机制的色谱方法对各种修饰变异体的保留和分离产生显著差异(表 2)^[60]。目前与质谱联用分析抗体修饰变异体的液相色谱模式主要有反相液相色谱(RPLC)、亲水相互作用色谱(HILIC)、离子交换色谱(IEX)、疏水相互作用色谱(HIC)等。部分非变性条件下的色谱体系(如 HIC、IEX)因采用高浓度的非挥发性盐而存在与质谱不兼容的问题,可通过更换成含可挥发盐如乙酸铵的流动相体系或者采用多维色谱联用^[61]等技术脱盐来克服这一问题。

表 2 常见翻译后修饰相对于主峰的洗脱顺序^注

Tab.2 Elution order of common post-translational modifications relative to the main peak

Modification	RPLC protein	CEX ²⁾	SEC	HIC	RPLC peptide
Aspartate isomerization	Pre-peak	Variable	—	Pre-peak	Pre-peak
Asparagine deamidation ¹⁾	Post-peak+Pre-peak	Post-peak	—	Post-peak+Pre-peak	Post-peak+Pre-peak
Oxidation	Pre-peak	Variable	—	Pre-peak	Pre-peak
PyroGlu from Glu(—H ₂ O)	Post-peak	Post-peak	—	Post-peak	Post-peak
PyroGlu from Gln(—NH ₃)	Post-peak	Pre-peak	—	Post-peak	Post-peak
Succinimide	Post-peak	Post-peak	—	Post-peak	Post-peak
Sugar	Pre-peak	Variable	—	Pre-peak	Pre-peak
C-terminal lysine	Pre-peak	Post-peak	—	Pre-peak	Pre-peak
Aggregation	—	—	Pre-peak	Post-peak	—
Fragmentation	Variable	Variable	Post-peaks	Variable	Variable

注:1) Under certain conditions, asparagine deamidation gives rise to aspartate and isoaspartate with the latter appearing as a post-peak and the former as a pre-peak; 2) Situation is typically reversed in AEX.

3.1.1 RPLC-MS

反相液相色谱因具有较高的分辨率和良好的 MS 兼容性(RPLC-MS)成为肽图分析中使用最广泛的方法。其主要原理是根据疏水性差异分离,疏水性越强的物质与 RPLC 非极性固定相作用越强,出峰越慢,因此抗体原形和修饰变异体产生的疏水性差异比如常见的有 N 末端谷氨酸环化形成疏水性增加的焦谷氨酸盐,甲硫氨酸侧链氧化生成极性相对更大的甲硫氨酸亚砷等使得二者在 RPLC 中实现一定的有效分离后进入质谱鉴定。Yan 等^[62]采用 RPLC 有效分离 DTT 还原人重组单抗 IgG1 得到的轻链、重链或 papain 酶切得到的 Fab、Fc 片段,再用 TOF-MS 对主峰及其变体进行解析,可鉴别和定位发生在不同亚基片段的脱酰胺化、异构化、氧化、N 末端环化等修饰,同时可根

据 RPLC 测得的紫外峰面积定量修饰比例。Zhang 等^[63]基于亚基水平开发了一种能够代替肽图的快速、高通量的反相超高效液相色谱与质谱联用方法(RP-UHPLC-MS)评估单抗 Mab1 的 Fc-氧化修饰情况,经羧肽酶 B(CpB 酶)预处理和 IdeS 酶切后的亚基片段(Fc、LC 和 Fd)在 10 min 内能够实现 RP-UHPLC 的高效分离以及单抗特定结构域相关的氧化、脱酰胺化、N 末端谷氨酸环化等变异体的鉴定,CpB 酶预处理的目的是为了去除 C 末端赖氨酸以避免其与 Fc 区的氧化变体共洗脱的干扰,该方法还可应用于 Fc 结构域氧化水平(主要由第 257 位甲硫氨酸引起)的定量,计算的氧化比例与肽图测定该位点的结果具有良好相关性。RPLC-MS 法存在的主要不足是分析条件较苛刻,常用的有机流动相、各种离子对添加

剂、较高温度等因素容易导致蛋白发生不可逆的变性和三维结构的改变,无法获得蛋白原生结构信息,而且对于高度亲水肽段或者聚糖变体表征能力有限。此外蛋白大分子、多肽容易在 RPLC 固定相中发生吸附等问题也是不可忽视的^[64]。

3.1.2 HILIC-MS

亲水相互作用色谱(HILIC)对亲水性化合物有较高的保留能力和选择性,能够弥补 RPLC 难以保留极性、强极性化合物的不足,目前生物药物研究中 HILIC 与质谱联用大多用于糖肽分离和聚糖分析^[65-67]。D'Atri 等^[65]比较了 RPLC-MS 和 HILIC-MS 模式下英夫利昔、曲妥珠、西妥昔单抗及其类似药通过 IdeS 酶解、DTT 还原得到的 Fd、LC、Fc/2 亚基片段对应的糖谱,证明了 HILIC-MS 表征单抗亲水性变异体的能力以及与 RPLC-MS 在解析单抗糖型上的互补性,为后续应用于原研药与类似药在聚糖异质性上的质控分析提供强有力工具。Duivelshof 等^[66]在 middle-up 水平上开发一种 HILIC-MS 相对定量方法对阿达木单抗进行糖谱鉴定,并与作为参考技术 2-AB 标记的 N-聚糖分析定量结果具有较好的相关性,同时应用于多种糖基工程化单抗以及英夫利昔单抗原研药和类似药的糖型表征,证明了亚基水平 HILIC-MS 方法对 mAb 糖基化谱定性和定量的可靠性。

3.1.3 IEX-MS

离子交换色谱法(IEX)常用于定性和定量分析单抗修饰引起的电荷异质性,分为阳离子交换色谱法(CEX)和阴离子交换色谱法(AEX)两类。由于大多数单抗具有碱性等电点,阳离子交换色谱法最常用于分离单抗 PTMs 引起的电荷变异体^[68],比如天冬酰胺脱酰胺化、唾液酸聚糖、糖化等产生的酸性变异体,N 末端环化、甲硫氨酸氧化、天冬氨酸异构化形成琥珀酰亚胺等产生的碱性变异体^[69-72]。这些样品离子与固定相的离子交换基团作用强度不同,并通过改变流动相中的 pH、盐梯度将单抗与其变异体以不同的出峰顺序洗脱下来,从而形成相应的主峰和酸碱峰。Shi 等^[73]采用 Top-down 策略的 CEX-MS 法能够用于单克隆抗体、双特异性抗体和 Fc 融合蛋白产生电荷变异体的化学修饰鉴定以及 H₂O₂ 氧化模型下单抗氧化比例的定量,同时发现了一种新的连有高甘露糖和 C 末端赖氨酸残基完整蛋白的成对修饰变异体。Murisier 等^[74]通过考察出质谱兼容

的 CEX 色谱体系以实现与非变性 TOF-MS 直接联用,该方法适用于多种商业化单抗结构的快速在线表征,可解析出 N 末端环化、C 末端赖氨酸剪切、唾液酸化聚糖等多种修饰。

3.1.4 HIC-MS

与 RPLC 相似的是,HIC 也是一种根据疏水性大小分离物质的色谱方法,与 MS 联用在表征单抗氧化、天冬氨酸异构化、游离巯基等各种改变疏水性 PTMs 也有较广泛的应用^[75-77];与 RPLC 不同的是,HIC 是在非变性条件下(生理 pH、室温、避免使用有机试剂)通过改变流动相中的盐浓度改变蛋白表面疏水斑块与色谱柱固定相之间的盐调控疏水作用来实现分离^[78-80],非变性的 HIC-MS 联用可以使蛋白维持非共价相互作用的原有构象和生物活性,分离和表征其天然状态下的疏水变异体,主要缺点是 HIC 模式下使用的高浓度非挥发性盐与 MS 不兼容,影响分析。Wei 等^[75]开发一种含 150 mmol/L 挥发性、MS 兼容的乙酸铵盐作流动相、等度洗脱的 HIC-MS 方法可在天然条件下分离和表征单抗的甲硫氨酸和色氨酸氧化变异体、可变区域游离巯基变异体。Yan 等^[80]在 HIC 和四极杆-静电轨道阱高分辨质谱之间设计一种最优的分流装置,这种质谱检测前的柱后处理可稀释 HIC 中的高盐流动相以及减少进入 MS 的流量以克服在线偶联不兼容的问题,结果不仅展现了单抗在 HIC 分离中的高选择性而且其结构完整性能较好保留,同时去卷积化 MS 可揭示由 O-糖基化、氧化导致疏水性减少的分子变体。

3.1.5 多维液质联用

单一分离机理的液相色谱分离的 PTMs 变异体类型有限,尤其是性质相似的、低丰度的物种容易共洗脱,难以分辨。而多维液质联用法(mD-LC-MS)一方面可以使样品通过多根色谱柱分别实现肽段捕获、还原和酶切等在线柱内前处理和肽段分离,大大缩短样品制备时间,适用于样品的高通量与自动化分析;另一方面也可以通过多种分离机制的色谱模式联用,提高 PTMs 变异体的分离度,提供与一维色谱互补的表征信息,有利于实现单次进样的多属性分析,提高效率,同时 LC×LC 模式能够解决非变性 LC(IEX、HIC 等)与质谱直接偶联不兼容的问题,最后一维液相如 RPLC 与质谱连接可起到在线除盐的作用。Pot 等^[81]基于 mD-LC-MS 开发了一种能够快速(<2 h)、在线

实现单抗前处理和分析的 bottom-up 策略,利用第一、二维液相分别对样品进行自动化的柱内还原和 trypsin 酶解,然后在第三维反相 C_{18} 柱中完成相应的肽图分析,通过优化各种 LC 参数,提高了极性小肽在反相柱中的捕获率,因此蛋白序列覆盖度由离线前处理的 86%~94% 提高到 94%~98%,而且该方法具有一定的评估 PTMs 能力,能够在一次分析中识别天冬酰胺脱酰胺、甲硫氨酸氧化和赖氨酸糖化修饰。Sarin 等^[82]使用与质谱兼容的缓冲液体系统构建了由第一维表征疏水变异体的 HIC 和第二维表征电荷变异体的弱阳离子交换色谱(WCX)组成的二维 LC 分离系统与 MS 联用的工作流程,能够监测到两种 IgG1 亚类单克隆抗体 mAb A 和 mAb B 多种氧化、游离巯醇、天冬氨酸异构化等类型修饰变异体,而且与单独使用 HIC 或 WCX 分析方法相比,能够增加监测到的变异体数目。正交 LC 技术与 MS 联用有利于从不同维度解析单一 LC 无法分离的共流出峰,提高 mAb PTM 变体的分辨率,然而多维液质联用平台的搭建和方法开发是一个难点,从经济效益考虑,其适用于批量样本分析。

3.2 其他新型质谱技术

上述基于不同分离模式下的 LC-MS 技术能够有效鉴定和定量大部分与单抗理化性质相关的各种 PTMs 变体,然而部分不稳定的 PTMs 如脱酰胺中间产物琥珀酰亚胺的监测、复杂的聚糖同分异构体以及 PTMs 造成的单抗构象稳定性变化等深度表征难以实现,因此氢氘交换质谱、离子淌度质谱、库伦质谱等新型质谱技术研究的出现有利于提供 PTMs 的多维度表征信息。

氢氘交换质谱(HDX-MS)是表征蛋白质高级构象的一种常见手段,通过将蛋白质置于被稀释的含 D_2O 缓冲液中,溶剂可及的肽链骨架及侧链的酰胺氢能够与氘发生交换,氘置换起的质量位移被质谱监测到,不同序列片段的氢氘交换速率反映了蛋白的空间构象信息。部分 PTMs 可能会改变 mAbs 整体构象稳定性,HDX-MS 结合生物学实验有利于揭示单抗化学修饰、结构与功能活性之间的联系,对维持蛋白结构的各种共价和非共价作用进行解析。Yan 等^[83]结合 HDX-MS 和酶联免疫吸附反应评估 mAb1 重链 CDR 区的第 54 位天冬氨酸(Asp)异构化和第 56 位甲硫氨酸(Met)氧化引起的整体或局部构象改变对抗体 CDR 区与抗原结合活性的影响并与天然状态下

未发生修饰 mAb 的抗原结合活性作比较,结果发现随着 Asp54 的异构化破坏 CDR 结构的程度越大,其抗原结合活性也显著降低到 13%,与之相反的是 Met56 氧化对局部的主链构象有稳定作用,活性略微增加到 118%。

库伦质谱(CMS)定量的原理是通过含有酪氨酸、色氨酸残基等电化学活泼肽段在发生电化学氧化时产生的氧化电流对时间积分得到总电荷量 Q ,然后结合法拉第定律 $Q = n z F$ 计算出氧化肽的物质的量,同时根据活性肽氧化过程中 MS 响应差异用其提取离子色谱(EIC)峰面积的相对变化确定氧化产率 Δi ,最后由 $n / (\Delta i) = Q / (z F \delta i)$ 计算得到该肽段的总丰度。Ai 等^[84]利用库伦质谱首次开发了无需额外同位素标记实现对 3 种蛋白混合物同时绝对定量的方法,并与同位素稀释标记的定量结果比较,二者差异小于 5%,由此验证 CMS 具有良好的定量准确性,随后作者以 NIST mAb 的 VVSVLTVLHQDWLN318GK 作为特征替代肽,鉴定和定量出 N318 位的未修饰、脱酰胺、异构化、琥珀酰亚胺 4 种修饰形式肽,并且该方法首次在免同位素标签的情况下成功用于 mAb 脱酰胺反应修饰产物琥珀酰亚胺的绝对定量。

离子淌度质谱(IM-MS)与传统质谱相比增加了离子淌度分离和测量因素,是一种新型的二维质谱分析技术。淌度分离是指基于形状、大小、电荷不同的离子在漂移管中与缓冲气体碰撞时的碰撞截面(CCS)不同导致迁移率的差异从而实现分离,因此 IM-MS 不仅能获得质荷比信息,还可以获得样品构象信息。Hinneburg 等^[85]发现在单个糖肽同一糖基化位点中复合物型聚糖选择性连接在末端 N-乙酰神经氨酸(NeuAc) $\alpha 2,3$ -或 $\alpha 2,6$ -造成的不同位置异构体可通过 IM-MS 的迁移时间不同得到分离和鉴定,然而串联质谱分析几乎无法提供聚糖结构位点特异性信息,证实了 IM-MS 区分糖链结构微观异质性的应用潜力。

4 总结与展望

治疗性单克隆抗体作为医药领域新兴发展的蛋白药物之一,其独特优越的作用机制和疗效使得它在传统的化药治疗中脱颖而出,成为广泛研发的热点。然而翻译后修饰产生的各种变异体是单抗内在异质性的主要原因之一,也是关键质量属性分析的重要内容,影响着药物的安全性和有效性,这些不确定因素需要严格监控,因此单抗药

物的体内外修饰变化研究非常必要。与小分子不同的是,单抗具有分子量大、变体多样、空间结构复杂等特点,对前处理和表征方法的要求更高,而质谱技术因其成熟的仪器发展和强大的结构解析能力,常与液相色谱联用于单抗翻译后修饰的表征和定量分析。目前研究单抗修饰的发生机制及分析方法已经非常全面和成熟,通过构建体外监测模型有望预测体内外修饰的相关性,有利于药物研发初期的风险评估,为指导药物设计、评估其安全性和有效性提供依据。然而实际临床样本因获取来源有限、分析困难等,关于单抗体内生物转化研究仍不够深入,在未来如何选择合适的前处理和液质联用技术开发新型的方法策略构建抗体体内分析平台值得探索。

参考文献:

- [1] ZAHAVI D, WEINER L. Monoclonal antibodies in cancer therapy [J]. *Antibodies*, 2020, **9**(3): 34.
- [2] QIAN L, LIN X, GAO X, et al. The dawn of a new era: Targeting the “undruggables” with antibody-based therapeutics [J]. *Chem. Rev.*, 2023, **123**(12): 7 782-7 853.
- [3] LU R M, HWANG Y C, LIU I J, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases [J]. *J. Biomed. Sci.*, 2020, **27**(1): 1.
- [4] IMAMURA C K. Therapeutic drug monitoring of monoclonal antibodies: Applicability based on their pharmacokinetic properties [J]. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2019, **34**(1): 14-18.
- [5] ZITVOGEL L, KROEMER G. Antibodies regulate antitumour immunity [J]. *Nature*, 2015, **521**(7 550): 35-37.
- [6] CHEN L, HAN X. Anti-PD-1/PD-L1 therapy of human cancer: Past, present, and future [J]. *J. clin. Invest.*, 2015, **125**(9): 3 384-3 391.
- [7] REDMAN J M, HILL E M, ALDEGHAITHER D, et al. Mechanisms of action of therapeutic antibodies for cancer [J]. *Mol. Immunol.*, 2015, **67**(2): 28-45.
- [8] CHEN D S, MELLMAN I. Oncology meets immunology: The cancer immunity cycle [J]. *Immunity*, 2013, **39**(1): 1-10.
- [9] EMU B, FESSEL J, SCHRADER S, et al. Phase 3 study of ibalizumab for multidrug-resistant HIV-1 [J]. *N. Engl. J. Med.*, 2018, **379**(7): 645-654.
- [10] 高倩, 江洪, 叶茂, 等. 全球单克隆抗体药物研发现状及发展趋势 [J]. *中国生物工程杂志*, 2019, **39**(3): 111-119.
- [11] CRESCIOLI S, KAPLON H, CHENOWETH A, et al. Antibodies to watch in 2024 [J]. *mAbs*, 2024, **16**(1): 2 297-450.
- [12] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2021, **20**(7): 491-495.
- [13] SALFELD J G. Isotype selection in antibody engineering [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2007, **25**(12): 1 369-1 372.
- [14] LIU H, MAY K. Disulfide bond structures of IgG molecules: Structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function [J]. *mAbs*, 2012, **4**(1): 17-23.
- [15] ZAHAVI D, WEINER L. Monoclonal antibodies in cancer therapy [J]. *Antibodies*, 2020, **9**(3): 34.
- [16] DUCANCEL F, MULLER B H. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes [J]. *mAbs*, 2012, **4**(4): 445-457.
- [17] NOWAK C K, CHEUNG J M, DELLATORE S, et al. Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide [J]. *mAbs*, 2017, **9**(8): 1 217-1 230.
- [18] LIU H, GAZA-BULSECO G, FALDU D, et al. Heterogeneity of monoclonal antibodies [J]. *J. Pharm. Sci.*, 2008, **97**(7): 2 426-2 447.
- [19] MANNING M C, CHOU D K, MURPHY B M, et al. Stability of protein pharmaceuticals: An update [J]. *Pharm. Res.*, 2010, **27**(4): 544-575.
- [20] XU X. In vivo characterization of therapeutic monoclonal antibodies [J]. *J. Appl. Bioanal.*, 2016, **2**(1): 10-15.
- [21] LI Y, MONINE M, HUANG Y, et al. Quantitation and pharmacokinetic modeling of therapeutic antibody quality attributes in human studies [J]. *mAbs*, 2016, **8**(6): 1 079-1 087.
- [22] LI W, KERWIN J L, SCHIEL J, et al. Structural elucidation of post-translational modifications in monoclonal antibodies [M]. New York: American Chemical Society, 2015: 119-183.
- [23] LU X, MACHIESKY L A, DE MEL N, et al. Characterization of IgG1 Fc deamidation at asparagine 325 and its impact on antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity and FcγRIIIa binding [J]. *Sci. Rep.*, 2020, **10**(1): 1-11.
- [24] YAN B, STEEN S, HAMBLY D, et al. Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain [J]. *J. Pharm. Sci.*, 2009, **98**(10): 3 509-3 521.
- [25] GOETZE A M, LIU Y D, ZHANG Z, et al. High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies

- increase serum clearance in humans [J]. *Glycobiology*, 2011, **21**(7): 949-959.
- [26] TOROSANTUCCI R, SCHÖNEICH C, JISKOOT W. Oxidation of therapeutic proteins and peptides; Structural and biological consequences [J]. *Pharm. Res.*, 2014, **31**(3): 541-553.
- [27] SCHOCH A, KETTENBERGER H, MUNDIGL O, et al. Charge-mediated influence of the antibody variable domain on FeRn-dependent pharmacokinetics [J]. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 2015, **112**(19): 5 997-6 002.
- [28] HABERGER M, BOMANS K, DIEPOLD K, et al. Assessment of chemical modifications of sites in the CDRs of recombinant antibodies; Susceptibility vs. functionality of critical quality attributes [J]. *MAbs*, 2014, **6**(2): 327-339.
- [29] GRASSI L, CABRELE C. Susceptibility of protein therapeutics to spontaneous chemical modifications by oxidation, cyclization, and elimination reactions [J]. *Amino Acids*, 2019, **51**(10-12): 1 409-1 431.
- [30] SEO J W, LEE K J. Post-translational modifications and their biological functions; Proteomic analysis and systematic approaches [J]. *BMB Rep.*, 2004, **37**(1): 35-44.
- [31] CHEN W, WANG S, ADHIKARI S, et al. Simple and integrated spintip-based technology applied for deep proteome profiling [J]. *Anal. Chem.*, 2016, **88**(9): 4 864-4 871.
- [32] VERSCHURE L, OOSTERLYNCK M, AN C, et al. Middle-up characterization of monoclonal antibodies by online reduction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2021, **1 637**: 461 808.
- [33] JAROS J A J, GUEST P C, BAHN S, et al. Affinity depletion of plasma and serum for mass spectrometry-based proteome analysis [J]. *Proteomics Biol. Discovery*, 2013, **1** 002: 1-11.
- [34] DOLL S, BURLINGAME A L. Mass spectrometry-based detection and assignment of protein posttranslational modifications [J]. *ACS Chem. Biol.*, 2015, **10**(1): 63-71.
- [35] MURPHY C, DEVINE T, O'KENNEDY R, et al. Technology advancements in antibody purification [J]. *Antibody Technology J.*, 2016, **6**: 17-32.
- [36] WALTERS R R. Affinity chromatography [J]. *Anal. Chem.*, 1985, **57**(11A): 1 099-1 114.
- [37] ELGUNDI Z, RESLAN M, CRUZ E, et al. The state-of-play and future of antibody therapeutics [J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2017, **122**: 2-19.
- [38] EY P L, PROWSE S J, JENKIN C R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose [J]. *Immunochemistry*, 1978, **15**(7): 429-436.
- [39] DUHAMEL R C, SCHUR P H, BRENDDEL K, et al. pH Gradient elution of human IgG1, IgG2 and IgG4 from protein A-sepharose [J]. *J. Immunol. Methods*, 1979, **31**(3/4): 211-217.
- [40] BLOOM J W, WONG M F, MITRA G. Detection and reduction of protein—A contamination in immobilized protein—A purified monoclonal-antibody preparations [J]. *J. Immunol. Methods*, 1989, **117**(1): 83-89.
- [41] YANG C, HE B, ZHANG H, et al. IgG Fc affinity ligands and their applications in antibody-involved drug delivery; A brief review [J]. *Pharmaceutics*, 2023, **15**(1): 187.
- [42] OLADAPO O, BAUBEK S, ROBERT F, et al. Enrichment and liquid chromatography-mass spectrometry analysis of trastuzumab and pertuzumab using affimer reagents [J]. *Anal. Chem.*, 2021, **93**(40): 13 597-13 605.
- [43] BOERSMA Y L, PLÜCKTHUN A. DARPins and other repeat protein scaffolds; Advances in engineering and applications [J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2011, **22**(6): 849-857.
- [44] LU L, LIU X, ZUO C, et al. In vitro/in vivo degradation analysis of trastuzumab by combining specific capture on HER2 mimotope peptide modified material and LC-QTOF-MS [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1 225**: 340 199.
- [45] GONZÁLEZ-GARCÍA E, MARINA M L, GARCÍA M C. Nanomaterials in protein sample preparation [J]. *Sep. Purif. Rev.*, 2020, **49**(3): 229-264.
- [46] ZHU C, HAN H, CHEN Z, et al. Tetrapeptide-based mimotope affinity monolith for the enrichment and analysis of anti-HER2 antibody and antibody-drug conjugate [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2023, **1 246**: 340 892.
- [47] MA N, YAO D X, YANG H, et al. Surface modification of cellulose membranes to prepare a high-capacity membrane adsorber for monoclonal antibody purification via hydrophobic charge-induction chromatography [J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2018, **57**(39): 13 235-13 246.
- [48] LEI Y, SHEN Y, ZUO C, et al. Emerging affinity ligands and support materials for the enrichment of monoclonal antibodies [J]. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2022, **157**: 116 744.
- [49] YANG J, ZHOU A, LI M, et al. Mimotope peptide modified pompon mum-like magnetic microparticles for precise recognition, capture and biotransformation analysis of rituximab in biological fluids [J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2024, **14**(3): 1 317-1 328.
- [50] LEI Y, SHEN Y, CHEN F, et al. Multiepitope recognition

- technology promotes the in-depth analysis of antibody-drug conjugates [J]. *Acta Pharm. Sin. B*, 2024, DOI: 10.1016/j.apsb.2024.06.007.
- [51] HE Q, CHEN F, ZHAO Z, et al. Supramolecular mimotope peptide nanofibers promote antibody-ligand polyvalent and instantaneous recognition for biopharmaceutical analysis [J]. *Anal. Chem.*, 2024, **96**(15): 5 940-5 950.
- [52] BECK A, WAGNER-ROUSSET E, AYOUB D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products [J]. *Anal. Chem.*, 2013, **85**(2): 715-736.
- [53] GIANSAINTI P, TSIATSIANI L, LOW T Y, et al. Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin [J]. *Nat. Protoc.*, 2016, **11**(5): 993-1 006.
- [54] WU Z, HUANG J, HUANG J, et al. Lys-C/Arg-C, a more specific and efficient digestion approach for proteomics studies [J]. *Anal. Chem.*, 2018, **90**(16): 9 700-9 707.
- [55] WANG Y, LI X, LIU Y H, et al. Simultaneous monitoring of oxidation, deamidation, isomerization, and glycosylation of monoclonal antibodies by liquid chromatography-mass spectrometry method with ultrafast tryptic digestion [J]. *mAbs*, 2016, **8**(8): 1 477-1 486.
- [56] CHIU H H, TSAI Y J, LO C, et al. Development of an efficient mAb quantification assay by LC-MS/MS using rapid on-bead digestion [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1193**: 339 319.
- [57] 张倩, 宋玮, 王昊阳. 质谱分析导向的稳定同位素标记技术进展 [J]. *化学试剂*, 2022, **44**(1): 1-9.
- [58] HERMANN J, SCHURGERS L, JANKOWSKI V. Identification and characterization of post-translational modifications; Clinical implications [J]. *Mol. Asp. Med.*, 2022, **86**: 101 066.
- [59] JIN Y, LIN Z, XU Q, et al. Comprehensive characterization of monoclonal antibody by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *mAbs*, 2019, **11**(1): 106-115.
- [60] SANDRA K, VANDENHEEDE I, SANDRA P. Modern chromatographic and mass spectrometric techniques for protein biopharmaceutical characterization [J]. *J. Chromatogr. A*, 2014, **1335**: 81-103.
- [61] 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**: 113 207.
- [62] YAN B, VALLIERE-DOUGLASS J, BRADY L, et al. Analysis of post-translational modifications in recombinant monoclonal antibody IgG1 by reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1164**(1/2): 153-161.
- [63] ZHANG B, JEONG J, BURGESS B, et al. Development of a rapid RP-UHPLC-MS method for analysis of modifications in therapeutic monoclonal antibodies [J]. *J. Chromatogr. B*, 2016, **1032**: 172-181.
- [64] BOBÁLY B, SIPKÓ E, FEKETE J. Challenges in liquid chromatographic characterization of proteins [J]. *J. Chromatogr. B*, 2016, **1032**: 3-22.
- [65] D'ATRI V, FEKETE S, BECK A, et al. Hydrophilic interaction chromatography hyphenated with mass spectrometry: A powerful analytical tool for the comparison of originator and biosimilar therapeutic monoclonal antibodies at the middle-up level of analysis [J]. *Anal. Chem.*, 2017, **89**(3): 2 086-2 092.
- [66] DUIVELSHOF B L, DENORME S, SANDRA K, et al. Quantitative N-glycan profiling of therapeutic monoclonal antibodies performed by middle-up level HILIC-HRMS analysis [J]. *Pharmaceutics*, 2021, **13**(11): 1 744.
- [67] 王登辉, 李欣怡, 程国良, 等. 中药糖类上市药物研究进展 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(6): 26-34.
- [68] VLASAK J, IONESCU R. Heterogeneity of monoclonal antibodies revealed by charge-sensitive methods [J]. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2008, **9**(6): 468-481.
- [69] GRIAUD F, DENEFEELD B, LANG M, et al. Unbiased in-depth characterization of CEX fractions from a stressed monoclonal antibody by mass spectrometry [J]. *mAbs*, 2017, **9**(5): 820-830.
- [70] MILLÁN-MARTÍN S, CARILLO S, FÜSSL F, et al. Optimisation of the use of sliding window deconvolution for comprehensive characterisation of trastuzumab and adalimumab charge variants by native high resolution mass spectrometry [J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2021, **158**: 83-95.
- [71] KHAULI L A, GOSWAMI S, HUTCHINSON R, et al. Charge variants in IgG1: Isolation, characterization, in vitro binding properties and pharmacokinetics in rats [J]. *mAbs*, 2010, **2**(6): 613-624.
- [72] DADA O O, JAYA N, VALLIERE-DOUGLASS J, et al. Characterization of acidic and basic variants of IgG1 therapeutic monoclonal antibodies based on non-denaturing IEF fractionation [J]. *Electrophoresis*, 2015, **36**(21/22): 2 695-2 702.
- [73] SHI R L, XIAO G, DILLON T M, et al. Characterization of therapeutic proteins by cation exchange chromatogra-

- phy-mass spectrometry and top-down analysis[J]. *mAbs*, 2020, **12**(1): 173-182.
- [74] MURISIER A, DUIVELSHOF B L, FEKETE S, et al. Towards a simple on-line coupling of ion exchange chromatography and native mass spectrometry for the detailed characterization of monoclonal antibodies[J]. *J. Chromatogr. A*, 2021, **1** 655: 462-499.
- [75] WEI B, HAN G, TANG J, et al. Native hydrophobic interaction chromatography hyphenated to mass spectrometry for characterization of monoclonal antibody minor variants[J]. *Anal. Chem.*, 2019, **91**(24): 15 360-15 364.
- [76] EAKIN C M, MILLER A, KERR J, et al. Assessing analytical methods to monitor isoAsp formation in monoclonal antibodies[J]. *Front. Pharmacol.*, 2014, **5**: 77-520.
- [77] HAVERICK M, MENGISEN S, SHAMEEM M, et al. Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: Overview and applications[J]. *mAbs*, 2014, **6**(4): 852-858.
- [78] LIENQUEO M E, MAHN A, SALGADO J C, et al. Current insights on protein behaviour in hydrophobic interaction chromatography [J]. *J. Chromatogr. B*, 2007, **849**(1/2): 53-68.
- [79] FEKETE S, VEUTHEY J L, BECK A, et al. Hydrophobic interaction chromatography for the characterization of monoclonal antibodies and related products [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, **130**: 3-18.
- [80] YAN Y, XING T, WANG S, et al. Online coupling of analytical hydrophobic interaction chromatography with native mass spectrometry for the characterization of monoclonal antibodies and related products[J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2020, **186**: 113-131.
- [81] POT S, GSTÖTTNER C, HEINRICH K, et al. Fast analysis of antibody-derived therapeutics by automated multidimensional liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2021, **1** 184: 339-015.
- [82] SARIN D, KUMAR S, RATHORE A S. Multiattribute monitoring of charge-based heterogeneity of recombinant monoclonal antibodies using 2D HIC-WCX-MS [J]. *Anal. Chem.*, 2022, **94**(43): 15 018-15 026.
- [83] 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**(4): 2 041-2 050.
- [84] AI Y, GUNAWARDENA HP, LI X, et al. Standard-free absolute quantitation of antibody deamidation degradation and host cell proteins by coulometric mass spectrometry[J]. *Anal. Chem.*, 2022, **94**(36): 12 490-12 499.
- [85] HINNEBURG H, HOFMANN J, STRUWE W B, et al. Distinguishing N-acetylneuraminic acid linkage isomers on glycopeptides by ion mobility-mass spectrometry[J]. *Chem. Commun.*, 2016, **52**(23): 4 381-4 384.