

生物类似药质量分析方法研究进展

谭会洁, 杭宝建, 石峰, 李军* (山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

摘要 目的: 为生物类似药的研发提供参考和借鉴。方法: 通过查阅国内外大量文献, 结合生物类似药相关法规, 重点对生物类似药的理化特性、生物学活性、纯度与杂质、免疫学特性等药学特性进行梳理, 并对相关分析方法进行汇总分析。结果与结论: 生物类似药的研发需要采用先进的、敏感的技术和方法表征生物类似药的质量属性, 评估生物类似药与参照药的生物相似性。通过对生物类似药的药学特性分析方法的相关研究进行综述, 为生物类似药的研发和质量控制提供参考和借鉴。

关键词: 生物类似药; 参照药; 药学特性; 分析方法

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)12-1391-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.12.010

Development of Analytical Methods for Quality Assessment of Biosimilars

Tan Huijie, Hang Baojian, Shi Feng, Li Jun* (Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract Objective: To provide information and references for the research and development of biosimilars. **Methods:** Through reviewing a great deal of domestic and foreign literature in recent years, biosimilars' physics and chemistry characteristics, biological activities, purity and impurity, immunological properties, the current research status and trend in the development of quality analysis methods were summarized and analyzed by combing pharmaceutical regulations of biosimilars. **Results and Conclusion:** Advanced and sensitive analytical techniques are required for characterizing the biosimilars and assessing similarities between biosimilars and references. This article reviews the recent advances in analytical methods for pharmaceutical properties of biosimilars, thus providing references for biosimilar development and quality control.

Keywords: biosimilars; reference products; pharmaceutical properties; analytical methods

生物类似药是指在质量、安全性和有效性方面与已获准注册的参照药具有相似性的治疗用生物制品^[1]。生物类似药主要包括单克隆抗体、细胞因子类重组蛋白、重组激素等。随着早期上市生物技术药相关专利的到期, 以及生物类似药的出现将有助于提升药品可及性、降低药品价格、满足更多患者的临床用药需求, 我国将生物医药定位为国家战略型新兴产业, 在政策、研发、资本及临床需求的共同刺激下, 国内兴起了生物类似药开发的热潮。

为规范生物类似药的研发与评价, 推动我国生物类似药市场的发展, 2015年, 原国家食品药品监督管理总局药品审评中心 (Center for Drug Evaluation, CDE) 发布了《生物类似药研发与评价技术指导原则 (试行)》^[1], 明确了生物类似药的定义, 提出了生物类似药研发和评价的基本原则, 对生物类似药的药学、非临床和临床研究等评价内容提出了具体的要求; 2021年, CDE又出台了《生物类似药物相似性评价和适应症外推技术指

导原则》^[2]，对生物类似药的定义、相似性评价体系 and 适应症外推原则作了进一步阐述。生物类似药的相似性评价将“比对”贯穿于整个开发的全过程，主要包括：药学特性研究、非临床研究、临床研究，其中药学相似性研究是支持生物类似药研发的基石。生物类似药药学特性研究主要包括4个方面：理化特性、生物学活性，纯度与杂质、免疫学特性。有效的药学比对分析实验依赖于可靠的分析方法和能力，本文重点对生物类似药药学特性分析方法的研究进行整理分析。

1 理化特性

生物类似药是一种大分子药物，由氨基酸残基通过肽键相连形成的蛋白质组成，具有一级和高级结构^[3-4]。生物类似药的一级结构是指肽链中氨基酸的数目、组成和序列，决定高级结构的形成，而高级结构则与生物类似药的理化特性及功能直接对应。生物类似药的一级结构和高级结构的表征是生物类似药理化特性研究的主要内容。

1.1 一级结构分析

一级结构是生物类似药的最基本结构，是生物类似药高级结构和功能的基础，对药品的活性和稳定性有重要影响。一级结构研究项目主要包括：完整分子量、氨基酸序列及修饰、糖基化、二硫键分析。

1.1.1 完整分子量分析

完整蛋白分析不破坏蛋白样品，保证了结构的完整性，使翻译后修饰得以保留。色谱、电泳和质谱技术目前已经广泛用于完整蛋白分析，可以提供完整蛋白的分子量大小等信息。完整蛋白分析中常见技术包括凝胶电泳、分子排阻（Size Exclusion Chromatography, SEC）-高效液相色谱法（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）、基质辅助激光解吸电离（Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI）和电喷雾电离（Electrospray Ionization, ESI）质谱法等。凝胶电泳、SEC-HPLC具有快速、方便、重现性好等优点，广泛用于不同开发阶段的生物类似药和参照药分子量比较分析，但这2种方法的质量准确度相对较低，不能提供样品的精准分子量^[5]。MALDI和ESI质谱法已成为完整蛋白分子量测定最常用的方法之一，包括完整分子量、还原分子量、切N糖后分子量以及轻重链分子量测定。采用自上而下（Top-down）分析策

略对完整分子量样品进行碎裂，再进行质谱分析可以进行氨基酸序列、氨基酸修饰和蛋白亚型的表征^[6-8]。

1.1.2 氨基酸序列及修饰分析

基于质谱技术的肽图分析是生物类似药氨基酸序列及修饰分析中的常用方法。它是一种自下而上（Bottom-up）的方法^[9]，使用专一性较强的蛋白水解酶作用于特定的肽链位点将多肽裂解成小片段，基于纳升液相色谱进行肽段分离，利用高分辨质谱进行分析。肽段分析常用的蛋白酶有胰蛋白酶、LysC、GluC、Asp-N、胃蛋白酶等，不同蛋白酶的专一性酶切位点不同，使用不同的蛋白酶以及组合使用可以提高序列覆盖率^[10]。纳升液相色谱-高分辨质谱联用可以对多肽的序列及脱酰胺、氧化、糖基化等多种氨基酸修饰进行鉴定。末端修饰变异（例如C末端赖氨酸剪切和N末端焦谷氨酸盐形成）可以通过比较未修饰的末端肽进行鉴定^[11]。

1.1.3 糖基化分析

生物类似药由于多数采用哺乳动物细胞表达体系，细胞内存在复杂的翻译后修饰和酶反应，造成表达产物在糖基化分子结构的多样性，生产工艺和细胞株的微小变化都可能导致目的蛋白糖修饰基团结构上的明显差异。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，是治疗性蛋白药物的关键质量属性之一^[12-13]。主要通过糖基化位点、组成和支链对生物类似药的糖基化进行表征。完整蛋白的质量分析可以确定蛋白质的主要糖型，但难以确定糖基化位点。糖基化位点主要通过糖肽分析进行鉴定，通常用胰酶等蛋白酶对完整蛋白进行的酶解，产生小肽，采用色谱或电泳分离后进行串联质谱分析，可以鉴定糖肽氨基酸序列、糖基化位点，但糖肽分析对寡糖的类型分析不够全面^[14-15]。寡糖类型通常采用酶法或化学试剂法使寡糖从完整蛋白中游离出来进行分析^[16-17]，如N-糖苷酶F可定向切割N-乙酰葡萄糖胺与蛋白结构中的天冬酰胺的酰胺键、胍解反应可以裂解N-连接寡糖、 β -消除反应可以裂解O-连接寡糖。对游离寡糖的分析通常有3种方法：阴离子交换色谱、直接质谱分析、衍生化质谱联用法。寡糖结构中无生色团，常采用荧光试剂标记后进行光谱检测，如N-寡糖的分析常使用8-氨基-萘-1,3,6-三磺酸作为衍生试剂，衍生后利用荧光进行检测。质谱法虽然可以直

接对寡糖进行检测,但寡糖采用衍生试剂衍生后能极大提高质谱检测的离子化效率,并可提供更多的片段结构信息。

1.1.4 二硫键分析

二硫键是多肽和蛋白质中一种常见的翻译后修饰,它是氨基酸序列中2个半胱氨酸残基的巯基团发生氧化反应形成的共价键。二硫键并不是非常稳定,氧化形成的二硫键也可以被还原形成游离的巯基,所以通常二硫键是动态变化的化学键。蛋白质和多肽中的二硫键对其热力学、力学和化学稳定性至关重要,同时也参与对蛋白酶的抗性和活性的调节。精准、快速地定位蛋白质和多肽中二硫键配对方式是研究其结构与功能的重要内容之一^[18]。常用的二硫键分析方法为非还原酶解-质谱联用法,采用酶对蛋白进行非还原的酶解,产生肽段,用质谱检测各个肽段的具体信息后,通过二硫键特异性搜索软件(pLink-SS)实现对二硫键配对方式的表征^[19]。

1.2 高级结构分析

生产工艺及制剂配方的改变可能会导致维系蛋白质药物发挥功能的高级结构的改变,进而影响到药效以及免疫原性。常用的高级结构分析方法有圆二色谱法(Circular Dichroism, CD)^[20]、差示扫描量热法(Differential Scanning Calorimetry, DSC)^[21]、氘气交换(Hydrogen Deuterium Exchange HDX)-质谱法(Mass Spectrometry, MS)^[22]。远紫外CD数据可反映蛋白质的 α -螺旋、 β -折叠、转角和不规则卷曲的比例,能快速地计算出溶液中蛋白质的二级结构;近紫外CD数据可反映蛋白质侧链生色基团色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸等残基的排布信息和二硫键微环境的变化,蕴含着丰富的蛋白质三级结构信息。通过测量蛋白质等生物大分子的CD可以得到生物大分子的结构信息,CD广泛应用在蛋白质的折叠、蛋白质的构象研究及酶动力学等领域。DSC的工作原理是通过同时加热或冷却参比池与样品池的缓冲液或样品,测量二者维持相同温度所需的热量差。DSC可以分析蛋白质的高级结构的变化,研究各种储存因素对制剂稳定性的影响。HDX-MS的基本原理是利用蛋白质中不稳定的氢原子可以与溶液中的氘原子发生交换的特性研究蛋白质结构。首先,将蛋白质分子溶于重水,由于不同类型的氢原子氘气交换速率不同,处于蛋

白质表面的氢原子与重水接触更密切,比位于蛋白质内部的或参与氢键或盐桥形成的氢的交换速率要快;交换反应之后,将蛋白进行酶切,通过MS检测不同肽段的氘气交换速率,最终得到蛋白质的空间结构信息。HDX-MS是研究蛋白质三维结构的强有力工具,也是传统生物物理手段的重要补充,广泛应用于蛋白质结构及动态变化研究、活性位点鉴定等方面。

2 生物活性

生物活性测定是测定药物对机体的生物学效应,在生物类似药的开发和质量控制中至关重要。生物活性的测定方法包括:体内动物实验、基于细胞系的生物活性分析方法和基于转基因细胞系的生物活性分析方法。

动物实验是通过检测药物对实验动物的药效作用来反映其生物学活性,在药物研发中发挥着重要作用。然而动物实验操作复杂、变异性大,目前多数动物实验已经被细胞实验代替。但是,对作用机制复杂的生物技术药物如重组人红细胞生成素(rHuEPO)体内生物学活性测定仍采用动物实验方法即网织红细胞法^[23]。

随着药物高通量筛选平台的建立和生产规模的扩大,以及3R(Reduction, Refinement, Replacement)原则被科学工作者所接受,人们越来越多地寻求动物实验替代方法。基于细胞系的生物活性分析方法,由于其高通量、高效率、高精度等优势,越来越受到研究者和生产商的青睐。很多生长因子的活性测定是通过其对靶细胞的促增殖作用来实现的,例如表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)^[24]。

对于没有强反应性的细胞系,或者没有易检测的细胞学效应的生物技术药物,构建转基因的细胞系成了很好的选择。构建转基因的细胞系是在全面深入地研究药物的作用机制基础上,通过体外模拟创新药作用的信号转导机制,以导入药物作用受体报告基因或效应分子为策略,构建简便、快速、准确、安全、动物替代的系列转基因活性评价模型。于雷等^[25]将促胰岛素分泌肽天然受体和信号分子cAMP的萤光素酶报告基因同时导入CHO-K1细胞,建立了报告基因法检测促胰岛素分泌肽融合蛋

白生物活性的方法,成功应用于促胰岛素分泌肽活性测定。

3 纯度与杂质

纯度是生物技术药物的关键质量指标,生物类似药与原研药纯度上的差异可能导致其与原研药在人体内表现出不同的药代动力学特征及免疫原性,进而导致在体内的药效差异,甚至可能引起严重过敏反应。杂质主要包括产品相关杂质和工艺相关杂质。

3.1 产品相关杂质分析

蛋白质药物在生产和储存的过程中由于错误折叠、未完全装配、降解、聚合会产生不同分子大小的产物。复杂的翻译修饰以及降解过程可产生不同的电荷变异体。产品相关杂质主要包括分子量大小变异体和电荷变异体^[26]。

3.1.1 分子量大小变异体分析

SEC-HPLC和电泳法是检测分子大小变异体的常用方法。SEC是主要根据凝胶孔隙的孔径大小与高分子样品分子尺寸间的相对关系而对样品进行分离的分析方法。SEC的优点是应用简单,通量高;缺点是样品稀释可能导致可逆聚集体的解离,样品与色谱基质可能存在相互作用,从而减少聚集体的数量和影响单体蛋白质的检测^[27]。电泳法包括十二烷基磺酸钠(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(Polyacrylamide Gel Electrophoresis, PAGE)和十二烷基硫酸钠毛细管电泳^[28](Capillary Electrophoresis-SDS, CE-SDS)。聚丙烯酰胺凝胶为网状结构,具有分子筛效应,SDS-蛋白复合物带有过量的负电荷,质荷比约为常数,在聚丙烯酰胺凝胶中按其分子质量大小成比例地迁移。CE-SDS是将凝胶填充在毛细管中,在毛细管中形成分子筛,SDS蛋白复合物在毛细管内依分子量大小迁移,能有效减少组分扩散,分离效率高。非还原型SDS-PAGE和非还原型CE-SDS不破坏样品的二硫键,可以分析由二硫键连接的多聚体^[29-30]。

3.1.2 电荷变异体分析

生物类似药的生产及存储过程的糖基化修饰、降解、聚集等产生大量修饰和改变会造成电荷分布的改变,电荷的变异会影响药物的组织分布及药代动力学,例如:增加正电荷,会提高药物的组织停滞,降低血清清除;降低正电荷会减少药物的

组织停滞,提高药物的全身清除。电荷变异体是质控中关注的重点,对其进行有效的质量控制是十分必要的。电荷异质性分析的常用方法有平板等电聚焦电泳(Isoelectric Focusing, IEF)、离子交换色谱(Ion-exchange Chromatography, IEC)、毛细管区带电泳(Capillary Zone Electrophoresis, CZE)、毛细管等电聚焦电泳(Capillary Isoelectric Focusing, CIEF)和成像毛细管等电聚焦电泳(Imaging Capillary Electrofocusing Electrophoresis, iCIEF)^[31]。其中,IEF操作烦琐,分辨率比较低,定量不准确;IEC、CIEF和iCIEF具有较好的分辨率及定量优势;CZE通用性强、分析时间短,且具有相当的分选度和准确性。IEC、CZE与质谱联用可以对电荷变异体的分子量、序列、氨基修饰等特性进行进一步表征^[32-33]。

3.2 工艺相关杂质分析

生物技术药一般由微生物或细胞表达后纯化而来,宿主残留DNA、宿主残留蛋白(Host Cell Proteins, HCP)、纯化过程中亲和介质蛋白A(Protein A, ProA)的脱落等均对人体构成安全威胁。工艺相关杂质是影响生物技术药纯度的另一关键因素。

3.2.1 宿主残留DNA检测

残留的DNA可能带来传染性或致突变性风险,例如连续传代的细胞DNA具有潜在的致癌性^[34]。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)四部^[35]规定CHO细胞中DNA的残留量不高于10 pg/剂量。《中国药典》四部收载的宿主残留DNA检测方法有3种:DNA探针杂交法,荧光染色法,荧光定量PCR法。其中,DNA探针杂交法操作烦琐、耗时长,无法进行定量分析;荧光染色法特异性差、灵敏度低;荧光定量PCR法具有灵敏度高、准确性好、简便快速等优点,是常用的DNA残留检测方法^[36]。

3.2.2 HCP检测

HCP具有诱导免疫应答的潜在安全风险,常用的检测方法有酶联免疫吸附测定法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)和高效液相色谱质谱联用法(HPLC-MS)。ELISA法主要依赖抗体对HCP特异性的识别,具有灵敏度高、检测简便等优点,但HCP特异性抗体制备周期长、费用高、失败风险高,不能发现工艺改变等新引入的残留蛋白,

无法对HCP进行定性分析。与传统的ELISA方法相比, HPLC-MS方法开发时间短(只需几周), 可无偏性地对所有HCP进行定性和定量分析, 在HCP杂质分析中越来越常用^[37-38]。

3.2.3 Pro A残留检测

Pro A源于金黄色葡萄球菌, 它含有5个可以和抗体IgG分子的Fc段特异性结合的结构域, 是一种抗体结合蛋白, 作为亲和介质被广泛地应用于Fc融合蛋白和单克隆抗体的纯化^[39]。在抗体纯化过程中, Pro A能够从柱子中浸出, 从而导致污染。Pro A作为金黄色葡萄球菌的膜蛋白具有免疫原性, 控制其残留水平是保证药物安全性的一项重要指标。ELISA法是Pro A残留的主要检测方法, 但是Pro A能够结合IgG分子, 从而阻碍其与相应抗体的结合, 常常造成检测结果不准确, 所以在Pro A检测方法的建立过程中应进行方法的精密性和准确性的考察^[40]。

4 免疫学特性

免疫学特性指药物刺激机体形成特异性抗体或致敏淋巴细胞的性质。免疫学特性评价是生物类似药质量控制的重要内容, 主要包括生物类似药与靶标及FcRn、Fc γ 、c1q等各受体的亲和力、补体依赖的细胞毒性(Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)活性、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)活性。

4.1 与靶标及受体亲和力评价

生物类似药与靶标及受体亲和力的评价方法主要有ELISA法、细胞ELISA法^[41]、表面等离子共振技术(Surface Plasmon Resonance, SPR)效价测定法^[42-43]。ELISA法是评价药物与靶标及受体亲和力的常用方法, 其操作比较简单、耐用性好, 但需要制备抗原。细胞ELISA法与ELISA法原理基本相同, 不同的是将可溶性抗原展示在细胞表面, 并通过流式细胞仪测定细胞的阳性率指标来检测待测抗体与标记抗体的竞争结合情况。该方法的优点是避免了抗原的制备纯化过程, 特别适用于难制备抗原; 展示在细胞表面的抗原空间结构更接近体内存在形式, 使待测结果更反映药品在体内的活性状态。SPR是一种用于生物分子间相互作用分析的高新技术, 被2020年版《中国药典》四部正式收录。具体测定过程: 将抗体固定于芯片表面, 待测抗原通

过微流控系统流经其上, 抗原抗体一旦结合, 芯片表面的物质质量浓度就会增加, 进而引起芯片表面液体折射率的变化而被检测到。该技术测定抗原抗体结合活性时不需要标记, 避免了标记对分子结构的影响, 能更加真实地反映抗原抗体的结合情况。它测定周期短, 样品用量少, 一般仅有微克级, 可用于微量样品的测定。SPR技术可以用于抗体与抗原结合活性的分析、抗体候选物的筛选与评价、抗体与受体结合活性的分析, 如抗体与Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb等受体结合的亲和力、动力学信息。

4.2 CDC活性测定

CDC是指补体参与的细胞毒作用, 即通过特异性抗体与细胞膜表面相应抗原结合, 抗体Fc片段的补体结合位点暴露并与补体C1结合形成复合物而激活补体经典途径, 所形成的攻膜复合物(Membrane Attack Complex, MAC)造成细胞外离子大量内流, 最终导致肿瘤细胞的溶解。抗CD20单抗^[44]主要是通过CDC测定活性, 选择高表达CD(Cluster of Differentiation)抗原的细胞铺板, 使抗体与细胞表面抗原充分结合, 然后加入补体孵育, 结合于细胞表面的抗体将补体成分激活, 进而将细胞杀死。补体组分多, 热不稳定, 易失活, 其来源包括正常人血清、豚鼠、家兔等, 补体的选择以及对其质量的控制是CDC活性测定的关键环节。

4.3 ADCC活性测定

ADCC是指抗体药物通过Fab段与靶细胞(病毒感染细胞及肿瘤细胞)表面抗原决定簇特异性结合后, 抗体药物的Fc片段可以被杀伤性的细胞如NK细胞的Fc受体(FcR)识别并结合, 从而杀死靶细胞。早期ADCC验证方法多为基于新鲜制备的外周血单核细胞或NK细胞作为效应细胞的杀伤试验, 但是这些方法存在细胞分类和培养困难、操作烦琐、背景值高, 且受个体差异影响等缺陷。研究^[45]表明, 在NK细胞中Fc受体(FcR)活化, 尤其是FcRIIIa受体(CD16)活化能够激活活化的T细胞核内因子(Nuclear Factor of Activated T-cells, NFAT)信号通路。采用基因工程方法在Jurkat细胞表面稳定表达Fc受体, 在Jurkat细胞内构建NFAT信号驱动萤光素酶表达的基因回路, 并将萤光素酶与生物发光偶联。当抗体Fc片段与Jurkat细胞表面的Fc受体结合后, 激发NFAT信号通路, 增加萤光素酶的表达, 通过生物发光测定ADCC活

性。该方法操作简便易行,专属性强、重复性好、准确性高,可以直接检测抗体Fc片段与Fc受体结合能力^[46]。

5 结语

生物类似药的分子量大,具有多级结构,这对其质量控制提出了挑战。生物类似药的理化特性、生物学活性、杂质与纯度和免疫学特性等药理学特性应采用先进的、敏感的方法进行比对试验研究。首先考虑采用与参照药一致的方法;对采用其他技术和方法的,应提供依据;对某些关键的质量属性,应采用多种方法进行比对试验研究。本文对生物类似药药理学特性的研究项目及分析方法进行了梳理,对国内生物类似药研发企业的质量控制具有重要指导作用和参考价值。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理总局. 生物类似药研究与评价技术指导原则(试行)[S]. 2015.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 生物类似药相似性评价和适应症外推技术指导原则[S]. 2021.
- [3] Kragh-Hansen U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin[J]. Pharmacological Reviews, 1981, 33(1): 17-53.
- [4] 廉德君, 许根俊. 蛋白质结构与功能中的结构域[J]. 生物化学与生物物理进展, 1997(6): 482-486.
- [5] 吴霖萍, 汪泓, 陈钢. 阿达木单抗理化特性的关键质量属性分析[J]. 中国医药工业杂志, 2018, 49(3): 322-331.
- [6] Zhang Z, Hai P, Chen X. Mass Spectrometry for Structural Characterization of Therapeutic Antibodies[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2009, 28(1): 147-176.
- [7] Kitta V, Zhu M, Zhang J. Top-down Protein Characterization: Comparison of MALDI-TOFMS Versus ESI-FTMS[C]. American Society for Mass Spectrometry, 2008.
- [8] Toby T K, Fornelli L, Kelleher N L. Progress in Top-down Proteomics and the Analysis of Proteoforms[J]. Annual Review of Analytical Chemistry, 2016(9): 499-519.
- [9] 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.
- [10] Giansanti P, Tsiatsiani L, Low TY, et al. Six Alternative Proteases for Mass Spectrometry-based Proteomics Beyond Trypsin[J]. Nat Protoc, 2016(11): 993-1006.
- [11] Silva AMN, Vitorino R, Domingues MRM, et al. Post-translational Modifications and Mass Spectrometry Detection[J]. Free Radic Biol Med, 2013(65): 925-941.
- [12] Higel F, Seidl R, Sorgel F, et al. N-glycosylation Heterogeneity and the Influence on Structure, Function and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc Fusion Proteins[J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2016(100): 94-100.
- [13] 张忠兵, 韦薇, 罗建辉. 生物类似药糖基化相似性评价中的审评思考[J]. 中国新药杂志, 2020, 29(21): 2476-2480.
- [14] Morelle W, Canis K, Chirat F, et al. The Use of Mass Spectrometry for the Proteomic Analysis of Glycosylation[J]. Proteomics, 2010, 6(14): 3993-4015.
- [15] Xiao K, Han Y, Yang H, et al. Mass Spectrometry-based Qualitative and Quantitative N-glycomics: an Update of 2017 - 2018[J]. Analytica Chimica Acta, 2019(1091): 1-22.
- [16] Reusch D, Habegger M, Maier B, et al. Comparison of Methods for the Analysis of Therapeutic Immunoglobulin G Fc-glycosylation Profiles—Part 1: Separation-based Methods[J]. Mabs, 2015, 7(1): 167-179.
- [17] Reusch D, Habegger M, Maier B, et al. Comparison of Methods for the Analysis of Therapeutic Immunoglobulin G Fc-glycosylation Profiles—Part 2: Separation-based Methods[J]. Mabs, 2015, 7(4): 732-742.
- [18] 仇晓燕, 崔劭, 刘志强, 等. 蛋白质中二硫键的定位及其质谱分析[J]. 化学进展, 2008(6): 975-983.
- [19] Lu S, Fan SB, Yang B, et al. Mapping Native Disulfide Bonds at a Proteome Scale[J]. Nature Methods, 2015(12): 329-331.
- [20] 黄汉昌, 姜招峰, 朱宏吉. 紫外圆二色光谱预测蛋白质结构的研究方法[J]. 化学通报, 2007(7): 501-506.
- [21] 孙海源, 邓耿, 周瑜, 等. 差示扫描微量热法研究蛋白质及其相关体系进展[J]. 科学通报, 2016, 61(Z2): 3091-3099.
- [22] 黄静, 李惠琳. 氢氘交换质谱技术在蛋白质和蛋白复合物结构研究中的应用进展[J]. 分析测试学报, 2020, 39(1): 57-67.

- [23] 张卫婷, 王英, 张红霞. 实验小鼠数量对重组人促红细胞生成素体内活性测定的影响[J]. 实验动物科学, 2013, 30 (6): 13-16.
- [24] 于雷, 饶春明. 生物技术药物生物学活性测定方法研究进展[J]. 生物技术通讯, 2017, 28 (3): 392-396.
- [25] 于雷, 范文红, 王兰, 等. 报告基因法检测促胰岛素分泌肽融合蛋白生物学活性[J]. 药物分析杂志, 2016, 36 (3): 426-431.
- [26] 梁红远, 徐帆洪, 瞿爱东, 等. 利妥昔单抗及其生物类似药的杂质分析[J]. 国际生物制品学杂志, 2018, 41 (5): 209-212.
- [27] 王雅雯, 郑丽娥, 粟晓黎, 等. 生物类似药与参照药可比性评价的分析策略[J]. 中国药事, 2016, 30 (4): 321-330.
- [28] Shi Y, Li Z, Lin J. Advantages of CE-SDS over SDS-PAGE in mAb Purity Analysis[J]. Analytical Methods, 2012, 4 (6): 1637-1642.
- [29] 程立均, 魏敬双, 张世雄, 等. 重组单抗药物的非还原电泳纯度分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23 (1): 83-86.
- [30] 刘振东, 高铁, 徐玲丽, 等. 十二烷基硫酸钠毛细管电泳法分析非还原单克隆抗体药物纯度的前处理条件优化[J]. 色谱, 2019, 37 (6): 666-670.
- [31] 王文波, 武刚, 余传飞, 等. 治疗性单克隆抗体电荷异质性分析方法比较[J]. 药物分析杂志, 2017, 37 (8): 1383-1387.
- [32] Alvarez M, Tremintin G, Wang J, et al. On-line Characterization of Monoclonal Antibody Variants by Liquid Chromatography - mass Spectrometry Operating in a Two-dimensional Format [J]. Analytical Biochemistry, 2011, 419 (1): 17-25.
- [33] Whitmore CD, Gennaro LA. Capillary Electrophoresis-mass Spectrometry Methods for Tryptic Peptide Mapping of Therapeutic Antibodies[J]. Electrophoresis, 2012, 33 (11): 1550-1556.
- [34] Manohar M, Orrison B, Peden K, et al. Assessing the Tumorigenic Phenotype of Vero Cells in Adult and Newborn Nude Mice[J]. Biologicals, 2008, 36 (1): 65-72.
- [35] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020
- [36] 曹守春, 李玉华, 徐康为, 等. 阈值法检测人用狂犬病疫苗Vero细胞DNA残留量方法的建立及初步验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27 (3): 423-426.
- [37] Ma J, Kilby GW. A Sensitive, Rapid, Robust and Reproducible Workflow for Host Cell Protein Profiling in Biopharmaceutical Process Development[J]. Journal of Proteome Research, 2020, 19 (8): 3396-3404.
- [38] Reiter K, Suzuki M, Olano LR, et al. Host Cell Protein Quantification of an Optimized Purification Method by Mass Spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019 (174): 650-654.
- [39] Hober S, Nord K, Linhult M, et al. Protein a Chromatography for Antibody Purification[J]. J Chromatogr B, 2007, 848 (1): 40-47.
- [40] 毕华, 范文红, 史新昌, 等. 融合蛋白Protein A残留检测方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2014, 34 (2): 297-300.
- [41] 田生和, 王大坤. 细胞ELISA法的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 1992 (1): 27-29.
- [42] Englebienne P, Hoonacker AV, Verhas M. Surface Plasmon Resonance: Principles, Methods and Applications in Biomedical Sciences[J]. Spectroscopy, 2003 (17): 255-273.
- [43] Guo XW. Surface Plasmon Resonance Based Biosensor Technique: A Review[J]. Journal of Biophotonics, 2012, 5 (7): 483-501.
- [44] 刘春雨, 王兰, 郭玮, 等. 抗CD20单克隆抗体质量控制中生物学活性的趋势分析[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, 28 (1): 58-62.
- [45] Hsieh YT, Aggarwal P, Cirelli D, et al. Characterization of Fc γ RIIIA Effector Cells Used in In Vitro ADCC Bioassay: Comparison of Primary NK Cells with Engineered NK-92 and Jurkat T Cells[J]. Journal of Immunological Methods, 2017 (441): 56-66.
- [46] 刘春雨, 王馨, 于传飞, 等. 基于报告基因的抗HER2单克隆抗体ADCC生物学活性测定方法的建立及应用[J]. 药物分析杂志, 2019, 39 (1): 51-61.

(收稿日期 2021年9月8日 编辑 郑丽娥)