

基于 UPLC-Q-TOF-MS 的双特异性抗体关键表征方法研究

王姗姗¹, 李苗¹, 陈明¹, 熊晖², 冯光¹, 聂小春^{1*} (1. 武汉药品医疗器械检验所, 国家药品监督管理局药物制剂质量研究与控制重点实验室, 武汉 430073; 2. 武汉友芝友生物制药股份有限公司, 武汉 430073)

摘要: 目的 建立 Y-Body[®]型双特异性抗体一级结构的超高效液相色谱-三重四级杆/飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)研究方法。方法 以 Y-Body[®]型双特异性抗体 M808 为研究对象, 基于 UPLC-Q-TOF-MS 检测完整抗体及各亚基去糖基化处理前后的相对分子质量、肽图(氨基酸序列), 并通过 Unify 软件进行解析。结果 完整抗体去糖基化处理前后的相对分子质量分别为 128 417.660 5, 125 040.721 0; 轻链去糖基化处理前后的相对分子质量分别为 23 447.232 2, 23 445.560 8; 重链去糖基化处理前后的相对分子质量分别为 50 804.773 2, 49 201.605 1; 单链去糖基化处理前后的相对分子质量分别为 54 189.922 4, 52 415.764 4; 其氨基酸序列与理论序列基本一致, 肽图的互补决定区覆盖率为 100%; 推测 N-糖基化位点位于重链及单链 Fc 端, 糖型以 G1F 和 G2F 为主。结论 通过 UPLC-Q-TOF-MS 及 Unify 软件可有效表征双特异性抗体的一级结构, 为其质量标准的制定提供依据。

关键词: 双特异性抗体; 超高效液相色谱-三重四级杆/飞行时间质谱联用技术; 相对分子质量; 肽图分析

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)01-0099-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.01.013

引用本文: 王姗姗, 李苗, 陈明, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的双特异性抗体关键表征方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(1): 99-106.

Study on Key Characterizations of Bispecific Antibody Based on UPLC-Q-TOF-MS

WANG Shanshan¹, LI Miao¹, CHEN Ming¹, XIONG Hui², FENG Gang¹, NIE Xiaochun^{1*} (1. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Control of Drug Products, Wuhan 430073, China; 2. Wuhan YZY Biopharma Co., Ltd., Wuhan 430073, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the primary structure of Y-Body[®] bispecific antibody based on UPLC-Q-TOF-MS. **METHODS** Based on Y-Body[®] bispecific antibody M808 as the object of study, the relative molecular mass of intact antibody and each subunits before and after deglycosylation, peptide mapping(amino acid sequence) was detected and analyzed by UPLC-Q-TOF-MS and Unify software. **RESULTS** The relative molecular mass of intact antibody and deglycosylation intact antibody were 128 417.660 5, 125 040.721 0. The relative molecular mass of light chain(LC) and deglycosylation LC were 23 447.232 2, 23 445.560 8. The relative molecular mass of heavy chain(HC) and deglycosylation HC were 50 804.773 2, 49 201.605 1. The relative molecular mass of single chain(SC) and deglycosylation SC were 54 189.922 4, 52 415.764 4. The amino acid sequence was basically consistence with theoretical sequence, and the coverage of the complementary determining region attained 100%. N-glycosylation sites located at the Fc of HC and SC, mainly including G1F and G2F. **CONCLUSION** The primary structure of bispecific antibody can be effectively characterized by UPLC-Q-TOF-MS and Unify software, which provides a basis for ormulation of quality standards.

KEYWORDS: bispecific antibody; UPLC-Q-TOF-MS; relative molecular mass; peptide mapping

近年来, 治疗用抗体逐渐成为全球生物药物研发的重点^[1-2], 其中, 新型抗体药物种类-双特异性抗体(简称“双抗”)也迎来研发热潮。双抗是指可以同时特异性结合 2 个不同抗原的人工抗体, 由于其特异性和多功能性, 在肿瘤免疫治疗及自身免疫病等领域中具有广阔的应用前景^[3-4]。截至目前, 已经有>100 种双抗结构被报道, 处于临床研究的双抗>85 个, 其中已有 20 多种结构成为商业化平台, 构建技术包括 Triomab、CrossMab、

DAF、IgG-scFv 等^[5-7]。与小分子药物相比, 双抗是结构复杂且具有高度非均一性的分子, 生产参数的微小变化可能影响产品结构的巨大变化, 如何保证生产产品的安全有效是该行业的巨大挑战。对双抗分子的一级结构进行详细表征可以作为研究双抗产品质量的基础和重要依据^[8-9]。

质谱技术因其高精确性、高分辨率及较宽的质量测定范围等优点, 现已成为抗体类药物结构表征的关键技术手段之一, 可在分子水平上对抗体类药

作者简介: 王姗姗, 女, 硕士 E-mail: ws19910715@126.com

*通信作者: 聂小春, 男, 主任药师 E-mail: 253198223@qq.com

物的相对分子质量信息、*N*末端氨基酸序列、肽图分析、翻译后修饰等进行表征^[10-13]。本研究的研究对象 M808 为 Y-Body[®]型结构的双抗分子(结构见图 1), 是由 3 条亚基链组成的非对称结构, 一侧由一条轻链(light chain, LC)和一条重链(heavy chain, HC)藉由链间二硫键组成, 另一侧为与 Fc 融合的 VLs(variable region of light chain)通过柔性肽与 VHs(variable region of heavy chain)连接形成的单链(single chain, SC), 2 侧分别可以和不同的抗原分子 A、B 结合, 达到双靶标和多功能性的特点^[8]。该双抗分子较为复杂的结构对其一级结构的表征造成一定的困难。本研究着重以 M808 双抗为代表, 基于 UPLC-Q-TOF-MS, 建立 Y-Body[®]型双抗分子一级结构的研究方法, 为后续进一步研究提供基础和思路。

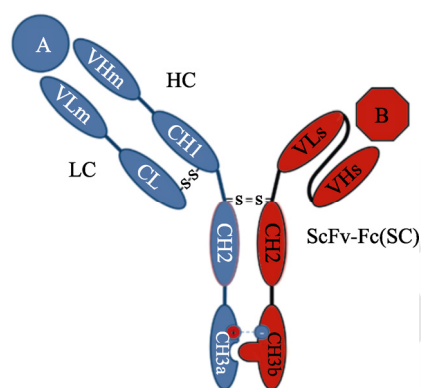


图 1 Y-Body[®]结构双特异性抗体分子结构图
Fig. 1 Molecular structure diagram of Y-Body[®] bispecific antibody

1 材料

1.1 样品和试剂

样品: 双特异性抗体 M808(由超纯水溶解并稀释至 $2.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, -20°C 保存)由武汉友芝友生物制药股份有限公司提供。

试剂: 盐酸胍、碳酸氢铵、碘乙酰胺、二硫苏糖醇、三羟甲基氨基甲烷均购自 Sigma; 胰蛋白酶(Promega, 货号: V5111): 内含 5 支 Sequencing Grade Modified Trypsin(规格: $20 \mu\text{g}$; Part No. V511A)和 1 支 Trypsin Resuspension Buffer(规格: 1.0 mL , Part No. V542A); *N*-糖苷酶 F(PNGase F)(Biolabs, 货号: P0704L): 内含 1 支 PNGase F(规格: $500\,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$; Part No. P0704L)、1 支 10%NP-40(规格: 1.0 mL ; Part No. B2704S)、1 支 Glycoprotein Denaturing Buffer(规格: 1.0 mL ; Part

No. B1704S)和 1 支 GlycoBuffer(规格: 1.0 mL ; Part No. B3704S); 10 kDa 超滤管(MerckMillipore, 货号: UFC801096); 甲酸(J&K)、乙腈(Merck)均为市售品。用于流动相及样品制备的去离子水均通过美国 Millipore 公司 Mili-Q 水系统制备而得。

1.2 仪器

ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统, Xevo G2 Q-TOF MS 串联四极杆飞行时间质谱系统, 控制仪器和采集数据的 MassLynx 4.1 软件, 处理数据的 UNIFI 1.8 软件(包含 UNIFI Workstation Large Molecule Option 及 UNIFI Glycan Library), 均购自美国 Waters 公司。MassPREP 在线脱盐装置($2.1 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$)、ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18} 色谱柱($2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$)均购自美国 Waters 公司。

2 方法与结果

2.1 完整抗体相对分子质量分析

完整抗体测定: 取 M808 抗体溶液 $20 \mu\text{L}$ ($2.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加入超纯水稀释至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 直接进样。

去糖基化抗体测定: 取 M808 抗体溶液 $20 \mu\text{L}$ ($2.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 加 Glycoprotein Denature Buffer $1 \mu\text{L}$, 100°C 水浴 10 min , 放置至室温, 加 GlycoBuffer 溶液 $2 \mu\text{L}$ 、10%NP-40 溶液 $2 \mu\text{L}$ 、PNGase F $1 \mu\text{L}$ 、超纯水 $175 \mu\text{L}$, 37°C 金属浴 2 h , 将上述处理的样品全部加入 0.5 mL 10 kDa 超滤管中, 离心($7\,500 \times g$, 10 min), 取上清液, 加入到内插管进样。

色谱条件: 采用 MassPREP 在线脱盐小柱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)- 0.1% 甲酸乙腈溶液(B), 流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 梯度洗脱($0 \sim 1 \text{ min}$, $5\% \text{B}$; $1 \sim 7 \text{ min}$, $5\% \rightarrow 70\% \text{B}$; $7 \sim 8 \text{ min}$, $70\% \rightarrow 90\% \text{B}$; $8 \sim 8.1 \text{ min}$, $90\% \rightarrow 5\% \text{B}$; $8.1 \sim 10 \text{ min}$, $5\% \text{B}$), 检测波长 280 nm , 柱温 80°C , 进样量为 $5 \mu\text{L}$ 。

质谱条件: 正离子模式, 脱溶剂气体温度 400°C , 源温度 100°C , 脱溶剂气流速 $600 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 毛细管电压 3 kV , 锥孔电压 40 V , 数据采集范围: $1\,500 \sim 4\,500 \text{ Da}$ 。用嵌入式辅助泵持续注射 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亮氨酸脑啡肽溶液(溶于 50% 乙腈水溶液, 添加 0.1% 甲酸), 流速 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 对所测得的质量数进行实时校准。控制仪器和采集数据的是 MassLynx 4.1 软件, 处理数据的是 UNIFI 1.8 软件。

完整抗体总离子流图及紫外色谱图见图 2A1、

图 2A2, 经 UNIFI 1.8 软件处理分析, 质谱图及解卷积图见图 3A1、图 3A2, 完整抗体相对分子质量为 128 417.660 5, 理论相对分子质量为 128 418.775 1, 偏差为-1.114 6(表 1), 偏差在 ± 5 Da 误差范围内, 存在 C-末端赖氨酸截除(-Lysine C-TERM)、甲硫氨酸氧化修饰(Oxidation M)和 N-糖基化修饰(Glycosylation)。经 PNGaseF 去糖基化处理后, 去糖完整抗体总离子流图及紫外色谱图见图 2B1、图 2B2, 质谱图及解卷积图见图 3B1、图 3B2, 完整抗体相对分子质量为 125 040.721 0, 理论相对分子质量为 125 041.687 2, 偏差为-0.966 2(表 1), 偏差在 ± 5 Da 误差范围内, 存在 C-末端赖氨酸截除(-Lysine C-TERM)和甲硫氨酸氧化修饰(Oxidation M)。去糖前后完整抗体相对分子质量相差 3 376.939 5, 推测 Fc 端存在 N-糖基化修饰位点, 据软件计算, 初步推测存在糖型为 1 $\times$ A2G1F(1 607.5)和 1 $\times$ A2G2F(1 769.6)。综上, M808 抗体分子中存在 C-末端赖氨酸截除、甲硫氨酸氧化修饰、N-糖基化修饰, HPLC-MS/MS 检测结

果显示 M808 抗体实测相对分子质量和理论相对分子质量一致。

2.2 亚基相对分子质量分析

完整抗体亚基处理: 取 M808 抗体溶液 20 μ L(2.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 加入水稀释至 100 μ L, 加二硫苏糖醇(DTT)溶液(0.5 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)8 μ L, 56 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 30 min, 放冷至室温。将上述处理的样品全部加入 0.5 mL 10 kDa 超滤管中, 离心(7 500 $\times$ g, 10 min), 取上清液, 加入到内插管进样。

去糖抗体亚基处理: 取 M808 抗体溶液 20 μ L(2.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 加 Glycoprotein Denature Buffer 1 μ L, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 放置至室温, 加 GlycoBuffer 溶液 2 μ L、10% NP-40 溶液 2 μ L、PNGase F 1 μ L、DTT 溶液(0.5 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$)8 μ L、超纯水 163 μ L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 4 h, 将上述处理的样品全部加入 0.5 mL 10 kDa 超滤管中, 离心(7 500 $\times$ g, 10 min), 取上清液, 加入到内插管进样。

色谱条件: 采用 ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18} 色谱柱(2.1 $\text{mm}\times 150$ mm, 1.7 μm), 流动相 A

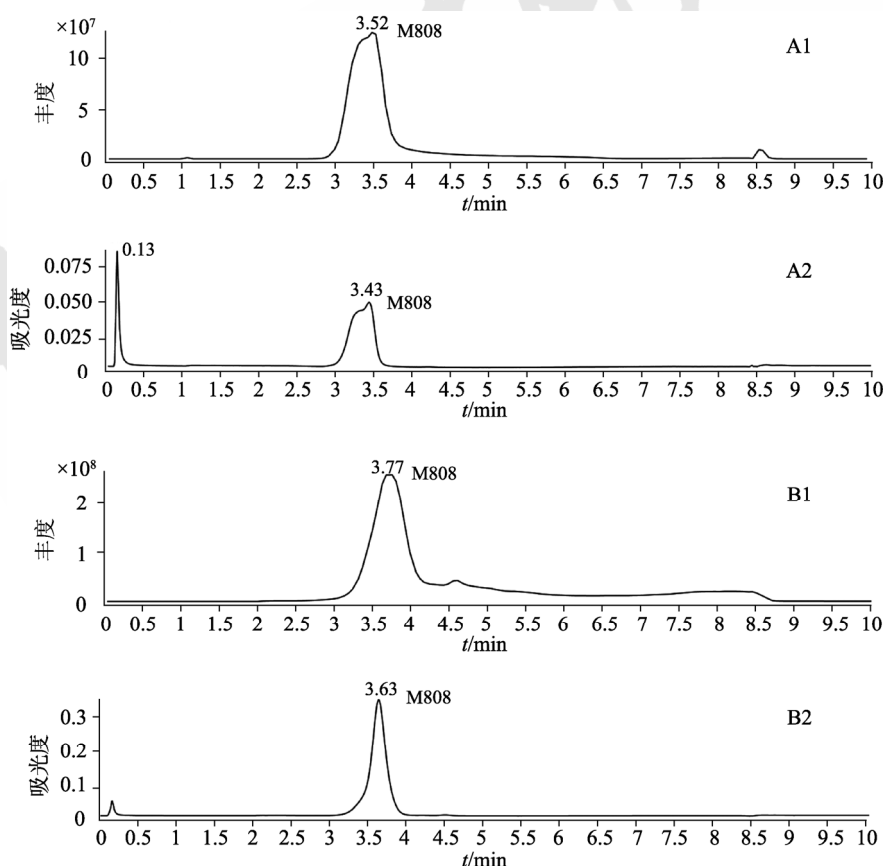


图 2 M808 完整抗体相对分子质量分析色谱图

A1-完整抗体总离子流图; A2-完整抗体紫外色谱图; B1-去糖抗体总离子流图; B2-去糖抗体紫外色谱图。

Fig. 2 HPLC chromatogram for intact antibody relative molecular mass of M808

A1-total ion chromatogram for intact antibody; A2-UV chromatogram for intact antibody; B1-total ion chromatogram for deglycosylated intact antibody; B2-UV chromatogram for deglycosylated intact antibody.

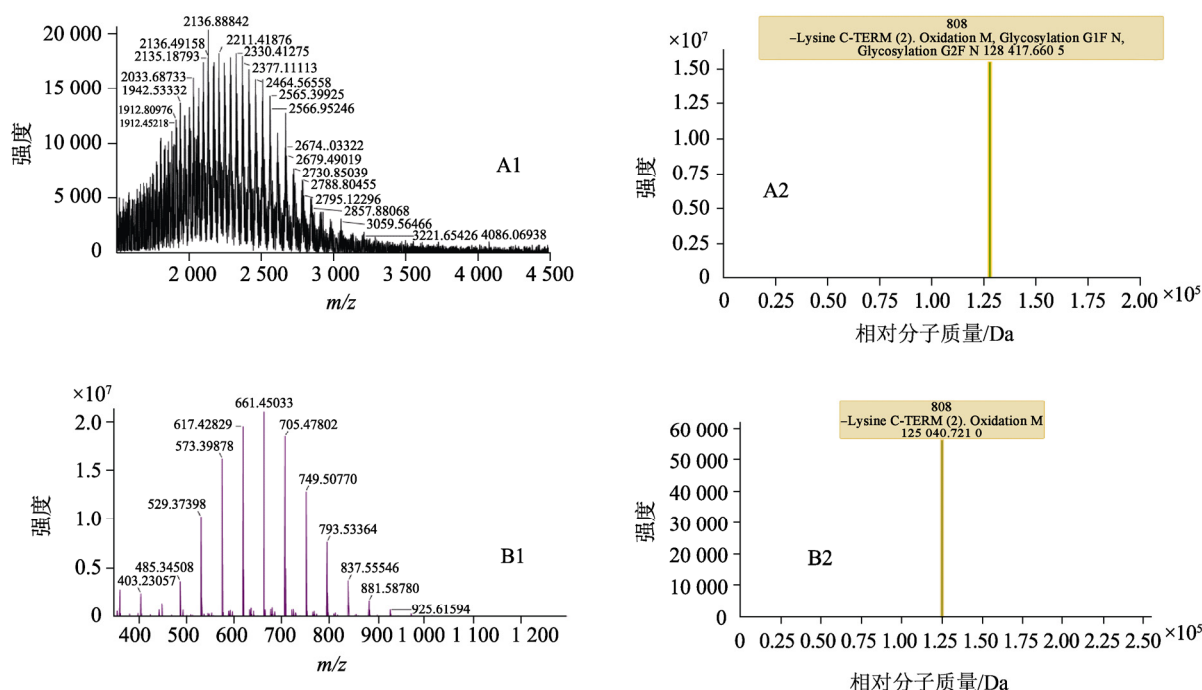


图3 M808 双特异性抗体完整抗体相对分子质量分析质谱图

A1-完整抗体质谱图；A2-完整抗体解卷积图；B1-去糖抗体质谱图；B2-去糖抗体解卷积图。

Fig. 3 MS chromatogram for relative molecular mass of intact antibody of bispecific antibody M808

A1-mass spectrum for intact antibody; A2-deconvolution map of intact antibody; B1-mass spectrum for deglycosylated intact antibody; B2-deconvolution map of deglycosylated intact antibody.

为含 0.1% 甲酸的水溶液，流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液，流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，梯度洗脱 (0~10 min, 1%B; 10~88 min, 1%→40%B; 88~90 min, 40%→90%B; 90~100 min, 90%B; 100~102 min, 90%→1%B; 102~112 min, 1%B)，柱温 80°C ，进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。

质谱条件：正离子模式，脱溶剂气体温度 400°C ，源温度 100°C ，脱溶剂气流速 $600 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ，毛细管电压 3 kV ，锥孔电压 40 V ，数据采集范围：500~4 000 Da。用嵌入式辅助泵持续注射 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亮

氨酸脑啡肽溶液(溶于 50% 乙腈水溶液，添加 0.1% 甲酸)，流速 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ，对所测得的质量数进行实时校准。控制仪器和采集数据的是 MassLynx 4.1 软件，处理数据的是 UNIFI 1.8 软件。

样品经二硫苏糖醇还原后表现为 3 条亚基：SC、HC 和 LC。去糖前后出峰顺序均为 SC、HC 和 LC，见图 4。各亚基的实测相对分子质量和理论相对分子质量的偏差均在 $\pm 5 \text{ Da}$ 之内，见表 1。完整抗体 LC 的相对分子质量为 23 447.232 2，去糖抗体 LC 的相对分子质量为 23 445.560 8，相差

表 1 M808 完整抗体及各亚基相对分子质量

Tab. 1 Relative molecular mass of intact antibody and its subunits of M808

完整抗体及其亚基	修饰	实测相对分子质量/Da	理论相对分子质量/Da	误差/Da
完整抗体	2×K_Loss, Oxidation M, Glycosylation G1F N, Glycosylation G2F N	128 417.660 5	128 418.775 1	-1.114 6
去糖抗体	2×K_Loss, Oxidation M	125 040.721 0	125 041.687 2	-0.966 2
完整抗体 LC		23 447.232 2	23 442.815 1	4.417 1
完整抗体 SC	1×K_Loss, Glycosylation G2F N	54 189.922 4	54 185.854 0	4.068 4
完整抗体 HC	1×K_Loss, Oxidation M, Glycosylation G1F N	50 804.773 2	50 806.233 1	-1.459 9
去糖抗体 LC		23 445.560 8	23 442.815 1	2.745 7
去糖抗体 SC	1×K_Loss	52 415.764 4	52 416.239 7	-0.475 3
去糖抗体 HC	1×K_Loss, Oxidation M	49 201.605 1	49 198.759 4	2.845 7

注：1×K_Loss：1 个赖氨酸截除；2×K_Loss：2 个赖氨酸截除。

Note: 1×K_Loss: 1×Ly sine amputation; 2×K_Loss: 2×Ly sine amputation.

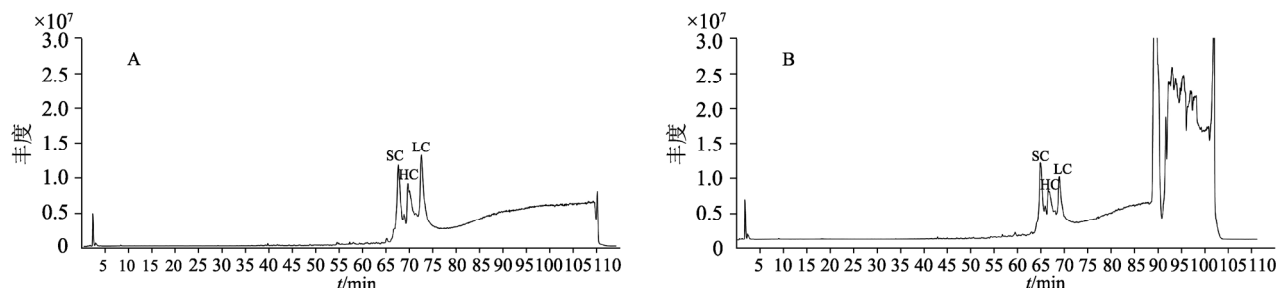


图4 M808 双特异性抗体亚基相对分子质量分析色谱图

A-完整抗体亚基色谱图; B-去糖抗体亚基色谱图。

Fig. 4 HPLC chromatogram for relative molecular mass of subunits of bispecific antibody M808

A-chromatogram for subunits of intact antibody; B-chromatogram for subunits of deglycosylated intact antibody.

1.671 4, 偏差在 ± 5 Da 误差范围内, 推测 LC 无糖基化修饰(质谱图见图 5B1、B2)。完整抗体 SC 去糖前后质谱图见图 5A2、A1, 经 UNIFI 1.8 软件计算, 去糖前质谱图中呈现 2 个糖基化修饰差异的主峰(相对分子质量分别为 54 023.373 5, 54 189.922 4), 去糖后质谱图中仅有 1 个峰(相对分子质量分别为 52 415.764 4), 根据相对分子质量推测亚基 SC 可能含有糖型为 G1F 和 G2F。完整抗体 HC 去糖前后质谱图见图 5C2、C1, 经 UNIFI 1.8 软件计算, 去糖前质谱图中呈现 3 个糖基化修饰差异的主峰(相对分子质量分别为 50 804.773 2, 50 607.559 1, 50 438.620 0), 去糖后质谱图中仅有 1 个峰(相对分子质量分别为 49 201.605 1), 根据相对分子质量推测亚基 HC 可能含有糖型为 G1F、G0F-Gn(G0F-GlcNAc N)和 G1F-Gn(G1F-GlcNAc N)。综上, 双特异性抗体 M808 HC、SC、LC 的相对分子质量与理论相对分子质量一致, HC 和 SC 均存在 *N*-糖基化修饰位点, LC 不存在 *N*-糖基化修饰。

2.3 肽图分析

样品变性烷基化处理: 取 M808 抗体溶液 400 μ L (2.6 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 加入盐酸胍溶液 (8 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 400 μ L、二硫苏糖醇 (DTT) 溶液 (0.5 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 8 μ L, 56 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴 0.5 h 变性还原, 加碘乙酰胺溶液 (0.5 $\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) 24 μ L, 室温避光放置 0.5 h, 将上述处理的样品全部加入 2 mL 10 kDa 超滤管中, 离心 (13 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min), 离心后弃去下层滤液, 向上层管加入酶切缓冲溶液 (Trypsin Resuspension Buffer) 400 μ L, 再次离心 (7 500 $\times g$, 10 min), 再重复上步操作 2 次离心后, 将上层管中的浓缩液转移至 EP 管中, 加超纯水稀释至 400 μ L, 作为变性脱盐样品。

胰蛋白酶酶切: 取 1 支 Sequencing Grade

Modified Trypsin, 加 Trypsin Resuspension Buffer 20 μ L 溶解制备为 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶溶液。取变性脱盐样品 50 μ L, 加 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 胰蛋白酶溶液 5 μ L, 涡旋混匀, 分别于 37 $^{\circ}\text{C}$ 金属浴孵化 4, 16, 28 h 后, 加入甲酸 1 μ L 中止反应。离心 (700 $\times g$, 2 min), 取上清液, 加入到内插管进样。

色谱条件: 采用 ACQUITY UPLC Peptide BEH C_{18} 色谱柱 (2.1 $\text{mm}\times 150$ mm, 1.7 μm), 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈溶液, 流速为 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 梯度洗脱 (0~10 min, 1%B; 10~88 min, 1% $\rightarrow$ 40%B; 88~90 min, 40% $\rightarrow$ 90%B; 90~100 min, 90%B; 100~102 min, 90% $\rightarrow$ 1%B; 102~112 min, 1%B), 柱温 80 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 10 μ L。

质谱条件: 正离子模式, 脱溶剂气体温度 400 $^{\circ}\text{C}$, 源温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速 600 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, 毛细管电压 3 kV, 锥孔电压 40 V, 数据采集范围: 500~4 000 Da。通过在碰撞池内等频率交替进行低碰撞能量 (6 eV) 和高碰撞能量 (20~30 eV) 切换, 分别获得各个肽段母离子一级质谱数据 (MS) 及其二级碎片数据 (MS^E)。用嵌入式辅助泵持续注射 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 亮氨酸脑啡肽溶液 (溶于 50% 乙腈水溶液, 添加 0.1% 甲酸), 流速 0.02 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 对所测得的质量数进行实时校准。控制仪器和采集数据的是 MassLynx 4.1 软件, 处理数据的是 UNIFI 1.8 软件。

经 UNIFI 1.8 软件分析胰蛋白酶不同酶解时间的样品, SC、HC 和 LC 分别含有 485, 450, 214 个氨基酸, 其中 4, 28 h 酶切时间的样品未达到最大覆盖率, 酶切时间为 16 h 时氨基酸覆盖率最高, 分别为 98%, 99%, 100%, 总覆盖率 > 99% (图 6), 各链分子互补决定区覆盖率为 100%。其中存在酶解后的 < 5 个氨基酸肽段未覆盖, 推测是因为其相对分子质量小, 亲水性强, 在色谱柱上未保留所

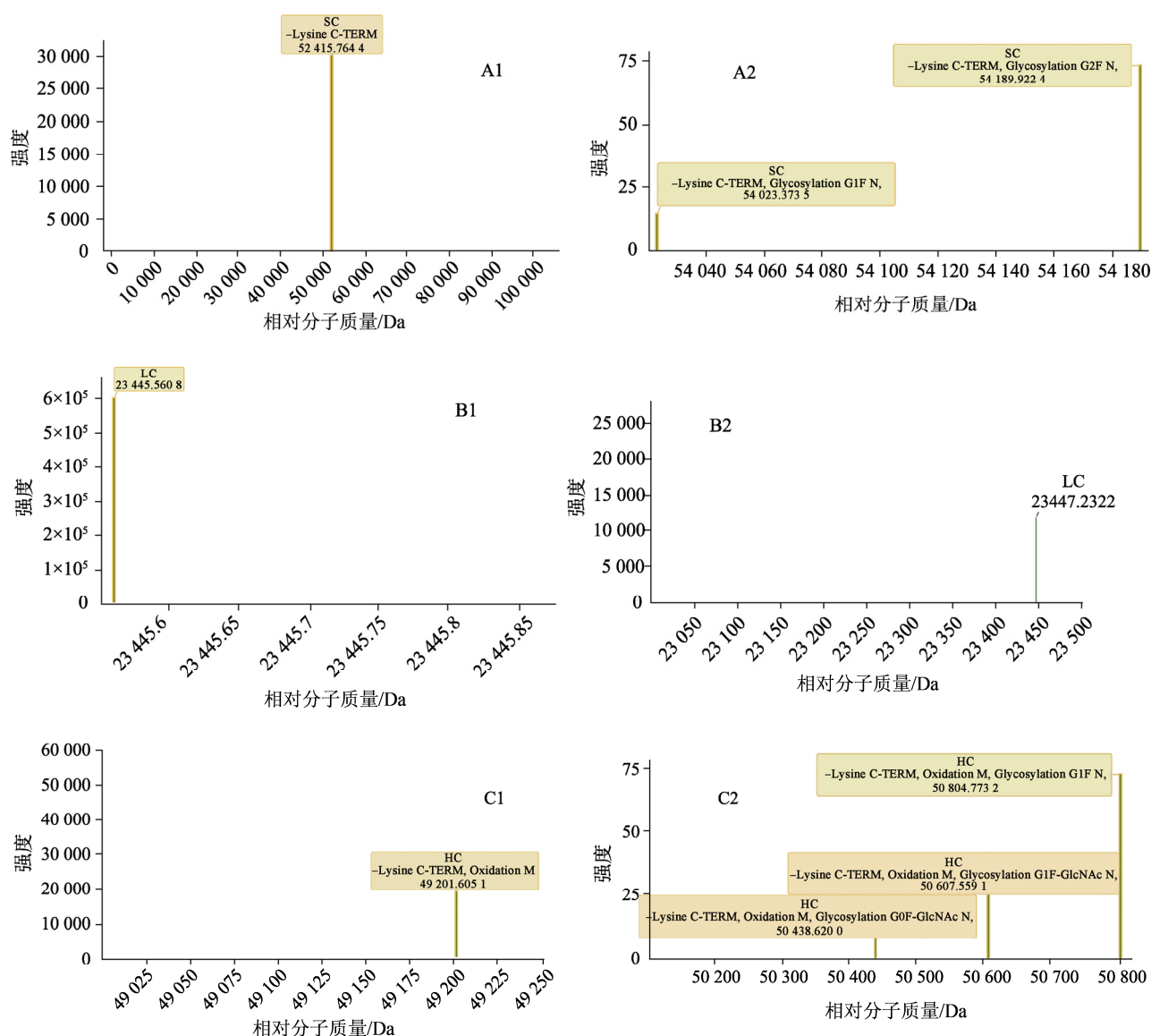


图5 M808 双特异性抗体亚基相对分子质量分析质谱图

A1—去糖抗体 SC 解卷积图；A2—完整抗体 SC 解卷积图；B1—去糖抗体 LC 解卷积图；B2—完整抗体 LC 解卷积图；C1—去糖抗体 HC 解卷积图；C2—完整抗体 HC 解卷积图。

Fig. 5 MS chromatogram for relative molecular mass of subunits of bispecific antibody M808

A1—deconvolution map for SC of deglycosylated intact antibody; A2—deconvolution map for SC of intact antibody; B1—deconvolution map for LC of deglycosylated intact antibody; B2—deconvolution map for LC of intact antibody; C1—deconvolution map for HC of deglycosylated intact antibody; C2—deconvolution map for HC of intact antibody.

致。图 7 为 *N*-糖基化修饰的肽图片段，推测该双抗的 *N*-聚糖修饰发生在 SC 的第 24 个酶切肽段，可能含有糖型有 G2F 和 G1F；*N*-聚糖修饰发生在 HC 的第 27 个酶切肽段，可能含有糖型有 G1F、G0F-Gn(G0F-GlcNAc N)和 G1F-Gn(G1F-GlcNAc N)。由以上结果可得，M808 抗体的氨基酸序列与理论序列基本一致。

3 讨论

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 及 UNIFI 1.8 软件对双特异性抗体类药物 M808 的完整蛋白及

LC、HC 和 SC 3 条链的相对分子质量、糖基化、肽图等一级结构进行详细表征。样品完整抗体经 PNGase F 去糖基化处理前后的相对分子质量实测值与理论值偏差在 ± 2 Da 之内，抗体还原后 3 条亚基经 PNGase F 去糖基化处理前后的相对分子质量实测值与理论值偏差在 ± 5 Da 之内，均在限度范围内。M808 样品经胰蛋白酶酶切后检测，肽图覆盖率 $>99\%$ ，各链分子互补决定区覆盖率为 100% ，抗体一级序列基本全部得到识别。说明 UPLC-Q-TOF-MS 技术可以有效表征双抗分子的一级结构^[14-16]。

- trastuzumab by LC/MS and LC/MS^E[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2014, 23(4): 418-426, 431.
- [10] TAO L, RAO C M, GAO K, et al. Structure verification of a recombinant chimeric anti-CD20 IgG1 monoclonal antibody[J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2010, 45(6): 752-755.
- [11] LIU H C, 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.
- [12] RAJU T S, JORDAN R E. Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies[J]. mAbs, 2012, 4(3): 385-391.
- [13] PACE A L, WONG R L, ZHANG Y T, et al. Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature[J]. J Pharm Sci, 2013, 102(6): 1712-1723.
- [14] BECK A, WAGNER-ROUSSET E, AYOUB D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products[J]. Anal Chem, 2013, 85(2): 715-736.
- [15] HUANG L H, BIOLSI S, BALES K R, et al. Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: An LC/MS characterization[J]. Anal Biochem, 2006, 349(2): 197-207.
- [16] GATLIN C L, ENG J K, CROSS S T, et al. Automated identification of amino acid sequence variations in proteins by HPLC/microspray tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2000, 72(4): 757-763.
- [17] 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.
- [18] LIU L M. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins[J]. J Pharm Sci, 2015, 104(6): 1866-1884.
- 收稿日期: 2021-11-29
(本文责编: 沈倩)