LC-MS/MS 在线部分还原法快速表征雷珠单抗一级结构

李佳婧，温学美，刘　菊，潘红娟*
（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院，创新药物与制药工艺国家重点实验室，上海 201203）

摘要：首次建立了在线部分三（2-羧乙基）膦还原法，通过 LC-MS/MS 一次进样采集分析，同时对雷珠单抗（1 批参比制剂和 2 批样品）的肽图和二硫键进行表征。结果表明，肽图序列覆盖度均可达 100%，鉴定到的翻译后修饰主要为氧化、脱酰胺化和焦谷氨酸环化；除确认与理论连接一致的 5 对二硫键外，该方法能够鉴定到游离半胱氨酸和 3 对错配二硫键；烷基化试剂的加入能有效降低样品前处理过程中产生的错配概率。该研究采用在线处理方法，缩短了处理和分析时间，减少了人为引入的不可控因素，为高通量抗体结构的表征提供了参考。

关键词：雷珠单抗；质谱；二硫键；肽图
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)11-1624-12
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.11.012

Rapid Characterization of Primary Structure of Ranibizumab by LC-MS/MS On-line Partial Reduction Method

LI Jiajing, WEN Xuemei, LIU Ju, PAN Hongjuan*
(*State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: The peptide mapping and disulfide linkages of ranibizumab (including one batch of reference preparation and two batches of samples) were simultaneously characterized by the online partial reduction of *tris*-(2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) after a single injection by LC-MS/MS for the first time. The results showed that the sequence coverage of peptide mapping could reach 100%, and the identified post translational modifications were mainly oxidation, deamidation and pyroglutamic acid cyclization. The five pairs of disulfide bonds were confirmed to be consistent with the theoretical connection. In addition, free cysteine and three pairs of scrambled disulfide bonds were identified by this method, and the probability of artifacts could be effectively reduced by adding a certain amount of alkylation reagents. This online method shortened the processing and analysis time, reduced the uncontrollable factors introduced by humans, and provided references for high-throughput antibody structure characterization.

Key Words: ranibizumab; mass spectrometry; disulfide bond; peptide mapping

氨基酸序列及相关翻译后修饰（post-translational modification，PTMs）决定了抗体药物的基本骨架，也决定了蛋白质的高级结构并会影响其生物学功能，因此成为结构表征中的必要项目[1]。其中，蛋白质在细胞内的生物合成过程中，2 个半胱氨酸（Cys）片段的硫原子之间会形成二硫键（S-S），该结构对蛋白质一级 / 高级结构、稳定性和生物学功能至关重要[2]。抗体药物是二硫键高度结合的重组蛋白，每个亚型都有明确的二硫键结构。近年来的文献[3—8]指出，抗体药物在培养、分离纯化及贮存过程中接触碱性环境、硫化氢、游离半胱氨酸和谷胱甘肽等，均可能产生游离的半胱氨酸残基、硫醚、三硫键和二硫键错配等异质性结构，非

收稿日期：2023-04-06
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

天然的二硫键配对会影响药物的稳定性、潜在效力或生物学功能，因此对二硫键连接和半胱氨酸相关变异体的研究受到广泛关注，也成为抗体药物质量监控的关键表征项。ICH Q6B《Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products》[9] 和国家药品监督管理局药品审评中心（CDE）发布的《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》都明确要求对二硫键和巯基的数量及位置进行表征。

雷珠单抗（ranibizumab，**1**）是重组的血管内皮生长因子 -A（VEGF-A）人源化 IgG1 的 Fab 片段，用于治疗湿性 / 血管性年龄相关性黄斑变性（AMD）[10]，共含有 445 个氨基酸，相对分子质量约 48 000，是由一条 κ 轻链（LC）与一条 Fd 链［包括 VH 和 CH1 区，以下简称重链（HC）］通过一对链间二硫键连接起来的异二聚体，且含 4 对链内二硫键，共 5 对二硫键 [11]。

基于质谱（MS）的结构表征技术已经成为加速药物质量分析的先进策略 [12]。随着各种离子化方式和生物信息数据库的不断开发，高分辨 MS 在生物大分子药物复杂的质量属性表征中表现出明显的优势，成为抗体药物结构特异性表征分析的有利工具。

目前，表征肽图和二硫键的常规方法是分别进行系列前处理后得到还原和未还原的不同肽段产物，再注入 LC-MS/MS 中采集分析。本研究首次采用 LC-MS/MS 在线部分还原法对 **1** 的肽图和二硫键同时进行特异性表征，包括错配和未配对的半胱氨酸及其他 PTMs。经变性、烷基化、置换缓冲溶液、酶解等前处理后，采用三（2- 羧乙基）膦（TCEP）柱前在线部分还原存在二硫键的酶解肽段，不完全反应的还原产物在一次进样后，可同时表征还原后的二硫键游离肽段和未还原的二硫键连接肽段，从而提供氨基酸序列、二硫键定位等多重结构信息。与常规方法相比，本研究所建立的 LC-MS/MS 在线部分还原法，减少了前处理和进样分析过程，实现了高通量在线自动反应，期望能为抗体药物的质量控制提供参考。

1 仪器与试药

Ultimate 3000 型液相色谱仪和 Orbitrap HF-X 型高分辨质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；XS205 型十万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 参比制剂（瑞士 Novartis 公司，规格 10 mg/mL，批号 21J13G）；**1**（上海多米瑞生物技术有限公司 [13]，规格 10 mg/mL，批号 20211112；规格 3.4 mg/mL，批号 20211216）；碳酸氢铵（含量 99.5%）、TCEP（含量 98%）、V8 蛋白酶（Glu-C，测序级，批号 11420399001）和碘乙酰胺（IAM，含量≥ 99%）均购于美国 Sigma 公司；胰蛋白酶（美国 Promega 公司，测序级，批号 0000517254）；尿素（美国 Aladdin 公司，含量 99.5%，批号 L2114239）；胰凝乳蛋白酶（北京华威锐科化工有限公司，USP 级，批号 HW18K0906-2）；乙腈和甲酸均为色谱纯，水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

色谱条件：色谱柱 Acclaim 120 C_{18} 柱（2.1 mm×150 mm，3 μm）；流动相 A 为 0.1% 甲酸溶液，B 为 0.1% 甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0—3 min，A 98%；3—100 min，A 98%—62%；100—105 min，A 62%—10%；105—110 min，A 10%；110—111 min，A 10%—98%）；检测波长 214 nm；流速 0.25 mL/min；柱温 50 ℃；进样量 10 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离源（ESI），正离子模式；喷雾电压 3.8 kV；传输管温度 320 ℃；辅气加热温度 350 ℃；扫描范围 *m/z* 150 ～ *m/z* 2 000。

2.2 样品制备

2.2.1 变性与烷基化反应液

取 **1** 10 μL 于 EP 管中，加入 8 mol/L 尿素溶液 75 μL 和 0.5 mol/L IAM 溶液 5 μL，加水至 100 μL，涡旋振荡混匀，得 **1** 质量浓度约为 1 μg/μL 的变性与烷基化反应液；于 36 ℃振摇 2 h，待用。

2.2.2 置换缓冲溶液

向超滤管（截留分子量 10 000）中加入去离子水 400 μL，离心（14 000×*g*）10 min，重复 1 次。将变性与烷基化反应液全部加入超滤管，加入 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液（pH 6.7）300 μL，离心

(14 000×*g*)10 min，重复 1 次；再离心 (14 000×*g*) 5 min 浓缩，倒置离心 (1 000×*g*)2 min，加入 50 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (pH 6.7) 至总体积约 100 μL，得置换缓冲溶液。

2.2.3 酶解溶液

向置换缓冲溶液中加入胰蛋白酶 [*m*(酶)∶*m*(底物)=1∶50]，于 37 ℃振摇 4 h；向所得酶解液中分别加入 V8 蛋白酶和胰凝乳蛋白酶 [*m*(酶)∶*m*(底物)=1∶20]，于 37 ℃振摇过夜，随后均加入 1% 甲酸溶液 10 μL 淬灭，分别作为酶解方式①和②，得到相应的酶解溶液①和②。

2.3 部分还原程序

取“**2.2.3**”项下的酶解溶液作为试剂 A，100 mmol/L 的 TCEP 作为试剂 B，分别通过离线和在线 2 种混合方式对酶解后的肽链进行部分还原，使反应终产物中既存在以二硫键连接的肽链，又存在二硫键还原后打开的游离肽链。具体操作如下。

2.3.1 离线部分还原

在试剂 A 中加入试剂 B 至 TCEP 终浓度为 20 mmol/L，涡旋振荡混匀后，于室温反应 5 min 后进样，具体如图 1A 所示。

2.3.2 在线部分还原

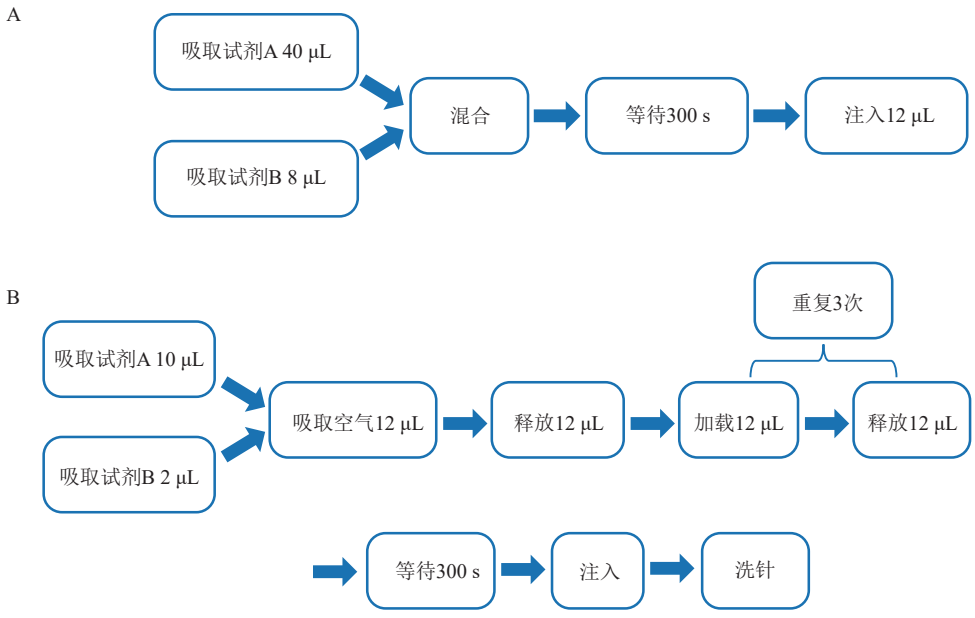
照图 1B 所示的在线衍生程序进行二硫键的部分还原反应。用自动进样器吸取试剂 A 10 μL，试剂 B 2 μL，再吸取与试剂总体积相等的空气后进行空气加载和释放，在样品环中多次混匀后静置 5 min，即可进样分析。

2.4 N-/C- 末端氨基酸序列的确证

氨基酸序列是蛋白质一级结构的基础，而 N-/C- 末端氨基酸序列是较易发生突变、修饰和缺失的高风险区域。《中华人民共和国药典》2020 年版 (ChP 2020) 也要求检定单抗 N- 末端氨基酸序列以确保结构的完整性和正确性，因此有必要对其进行确认。

在经酶解方式①酶切后的肽段水平上，按“**2.3**”项下方法进行在线部分还原，并按“**2.1**”项下色谱质谱条件，确证 **1** 的 N-/C- 末端氨基酸序列。

结果如表 1 所示，2 批 **1** 样品与参比制剂的 N-/C- 末端肽段氨基酸序列和相对分子质量测定结果均一致，且相对分子质量偏差均在 4×10^{-6} 内，与理论氨基酸序列和相对分子质量相符。



A—离线还原；B—在线还原。

图 1　部分还原工作的流程

Fig.1　Partial Reduction Workflow Diagrams

2.5 肽图分析

肽图可以提供肽段序列覆盖度分析以及特异性位点的修饰信息，本研究根据一级相对分子质量、二级碎片信息以及保留时间对肽指纹图谱进行匹配。

对变性、烷基化、经酶解方式①处理后的**1**，按“**2.3**”项下方法进行在线部分还原，并按“**2.1**”项下色谱质谱条件对肽段进行分离和检测，肽图用BioPharma Finder 5.0软件进行分析匹配，结果显示肽段相对分子质量偏差均在5×10^{-6}内。试验表明，1批参比制剂和2批**1**的LC/HC序列覆盖率均达到100%，实测氨基酸序列与理论氨基酸序列一致，图2为**1**的代表性肽段匹配图。但经过相同的处理和分析过程，酶解方式②所作肽图LC的覆盖率为90.2%，丢失4条短肽链；HC的覆盖率为97.8%，丢失2条短肽链。

PTMs包括糖基化、氧化、脱酰胺化等，会对抗体药物的结构和功能产生影响。经酶解方式①部分还原后的肽图检测到**1**中的PTMs主要包括氧化、焦谷氨酸环化以及脱酰胺化。**1**的PTMs种类和相对含量的汇总结果如表2所示。参比制剂鉴定到HC上W47、W50、M83、W108的氧化修饰，W108修饰率最高，为1.10%。与之相比，**1**（批号20211112）同样鉴定到以上位点的氧化修饰，但氧化含量均高于参比制剂，W108氧化修饰占2.27%。W108位于互补决定区3（CDR3）所在肽段区域，推测在**1**的空间结构上，W108位点更多地暴露于空气或溶液中，故其被修饰的比例相对较高，而CDR区域的氧化修饰会影响mAb的生物学活性[14]。此外，**1**（批号20211112）还存在其他种类的PTMs：鉴定到0.10%的脱酰胺修饰，脱酰胺反应发生在天冬酰胺和谷氨酰胺残基上，会引入负电荷，继而改变蛋白质的构象和稳定性[15]；还鉴定到0.63%的N-端焦谷氨酸环化修饰，但目前未有研究表明焦谷氨酸环化会对单抗的效应功能产生影响。在相同的前处理条件下，参比制剂与样品的PTMs种类和含量之间出现了一些差异，推测是2种来源产品的纯化、制剂工艺或贮存条件不同，产生的质量差异所致。

表2 参比制剂与样品中PTMs的种类与相对含量

Tab.2 Types and Relative Contents of PTMs in the Reference Preparation and the Sample

PTMs种类	PTMs相对含量/%	
	参比制剂	**1**（批号20211112）
HC：W47+氧化	0.08	0.11
HC：W50+氧化	0.22	0.43
HC：M83+氧化	1.03	1.41
HC：W108+氧化	1.10	2.27
HC：N84+脱酰胺化	未检出	0.10
HC：E1+焦谷氨酸环化	未检出	0.63

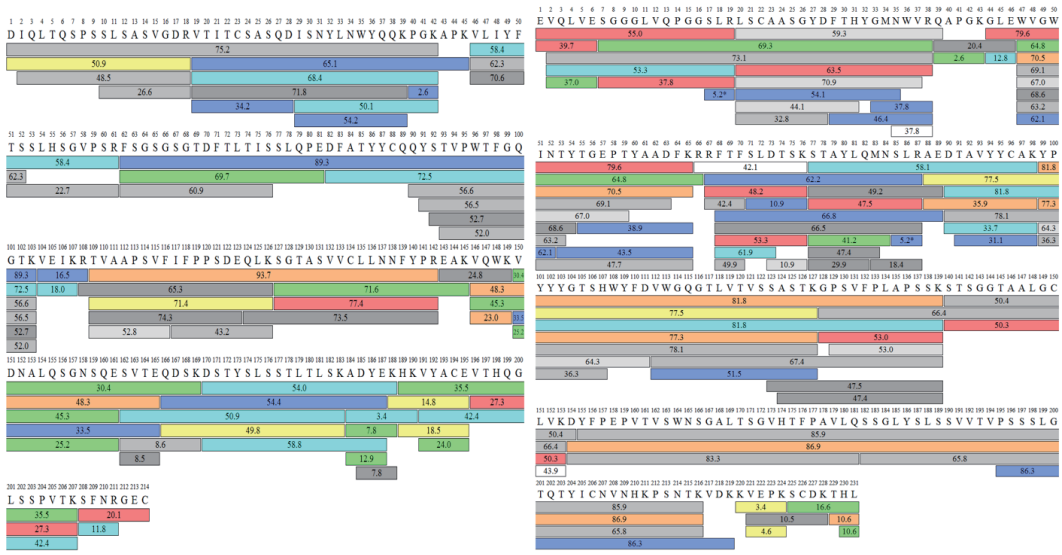
2.6 二硫键的鉴定

取参比制剂和2批**1**样品，经酶解方式①酶解后，按“**2.3**”项下方法进行在线部分还原。结

表1 3批样品的N-/C-端匹配结果

Tab.1 Matching Results of N-/C-Terminal of Three Batches of Samples

肽段	氨基酸序列	样品	实测相对分子质量	理论相对分子质量	质量偏差/$\times10^{-6}$	保留时间/min
LC N-端	DIQLTQSPSSLSASVGDR	参比制剂	1 859.926 8	1 859.922 5	2.30	49.06
		1（批号20211112）	1 859.921 4		−0.59	49.10
		1（批号20211216）	1 859.922 4		−0.07	49.10
LC C-端	SFNRGEC	参比制剂	811.328 3	811.328 3	0.03	16.84
		1（批号20211112）	811.328 3		0.03	16.86
		1（批号20211216）	811.327 0		−1.63	16.81
HC N-端	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	参比制剂	1 881.001 6	1 880.995 6	3.19	53.27
		1（批号20211112）	1 880.994 6		−0.51	53.37
		1（批号20211216）	1 880.995 0		−0.32	53.34
HC C-端	SCDKTHL	参比制剂	802.364 6	802.364 3	0.37	12.33
		1（批号20211112）	802.364 1		−0.25	12.34
		1（批号20211216）	802.362 9		−1.77	12.26



A　　B

A—LC；B—HC。

不同颜色表示的覆盖率结果(下图同)

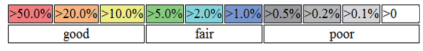


图 2　胰蛋白酶和 V8 蛋白酶酶解后的序列匹配结果

Fig.2　The Sequence Matching Results with Proteolysis by Trypsin and Glu-C

果显示，均成功鉴定到 5 对二硫键，其中 1:V19-K42/1:D82-K103、1:S127-R142/1:H189-E195 为 LC 链内二硫键，二硫键连接位置为 1:C23/1:C88、1:C134/1:C194；2:L20-R38/2:A88-K98、2:S140-K153/2:D154-K216 为 HC 链内二硫键，二硫键连接位置为 2:C22/2:C96、2:C150/2:C206；1:S208-C214/2:S225-K228 为链间二硫键，二硫键连接位置为 1:C214/2:C226。5 对二硫键的连接方式均与理论二硫键连接方式一致，具体如表 3 和图 3 所示。

以二硫键 1:C134/1:C194 为例，一级图谱（图 4）经解卷积处理后得到样品的相对分子质量为 2 586.239 0，与理论值（2 586.235 9）相比误差为 1.20×10^{-6}。二级质谱图（图 5）显示，a 链的 8 个碎片信号（即 b_8: 1 551.719 7$[M+H]^+$、b_{12}: 2 005.956 3$[M+H]^+$、y_9: 993.973 3$[M+2H]^{2+}$、y_{10}: 1 043.006 2$[M+2H]^{2+}$、y_{11}: 1 092.529 4$[M+2H]^{2+}$、y_{12}: 1 136.565 8$[M+2H]^{2+}$、y_{13}: 1 171.564 5$[M+2H]^{2+}$、y_{14}: 815.386 5$[M+3H]^{3+}$）的相对分子质量数与游离单链的碎

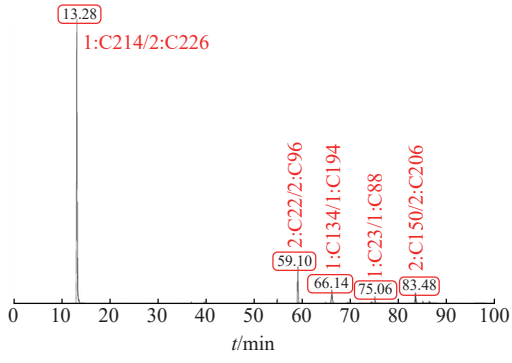


图 3　胰蛋白酶和 V8 蛋白酶酶解后 5 对二硫键的提取离子流图

Fig.3　Select Ion Chromatogram of Five Pairs of Disulfide Bonds with Proteolysis of Trypsin and Endoproteinase Glu-C

片信号相比，增加了 b 链肽段的相对分子质量数（847.377 2），证明 a 链通过 1:C134 与 b 链所在半胱氨酸相连；b 链也有丰富的 b、y 离子证明该链 1:C194 与 a 链相连，a、b 两条链信息互补佐证，进

一步确证了二硫键的连接位点。

酶解方式②的结果如表 4 所示，由于胰凝乳蛋白酶是非特异性酶，酶切位点增加，二硫键所连接的肽链氨基酸组成数目更少，与酶解方式①相比，肽链质量数降低，特别是第 1 对和第 4 对二硫键的表征，质量偏差也相对降低。

3 讨论

3.1 基于 LC-MS/MS 在线部分还原表征方法的建立

肽图法是目前基于 MS 抗体序列表征的主流方法，样品一般需要经变性、还原、烷基化、置换缓冲溶液后酶解，最终淬灭后进行 LC-MS 分析，与二硫键分析流程的主要差异是还原步骤。通常将肽图和二硫键的表征样品分别进行前处理后再单独进样，从而得到序列信息、相关 PTMs 和二硫键的连接方式，需进行多次前处理和至少 2 次（还原前、后）的对比进样。

本研究在高能碰撞裂解（HCD）的二级质谱碎裂模式基础上，采用柱前部分还原法实现单次进样后同时进行肽图和二硫键分析。为证明方法的可行性，通过镜像图（图 6）对比部分还原后与未还原的图谱差异。结果显示，主要存在两方面的明显差异：一方面，部分还原后，二硫键连接的肽段含量会降低，在总离子流图（TIC）上表现为二硫键肽段峰面积小于未还原的二硫键肽段峰面积；另一方面，

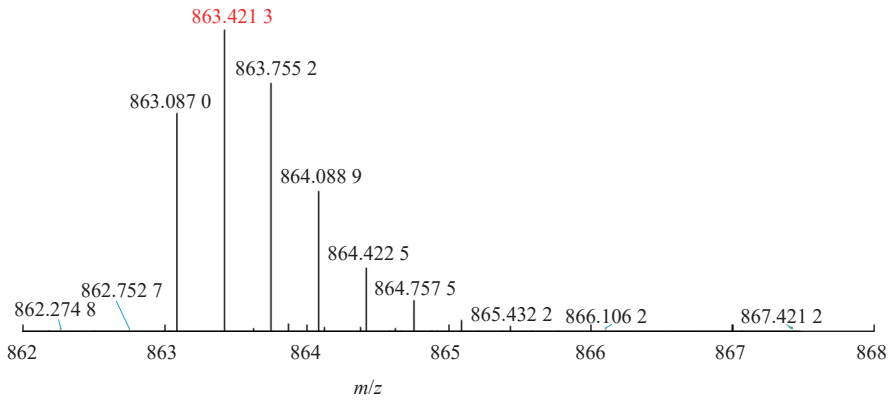


图 4 1:C134/1:C194 的一级质谱图

Fig.4 Primary Profile of Intra-chain 1:Cys134/1:Cys194

表 3 胰蛋白酶和 V8 蛋白酶酶解后二硫键匹配结果

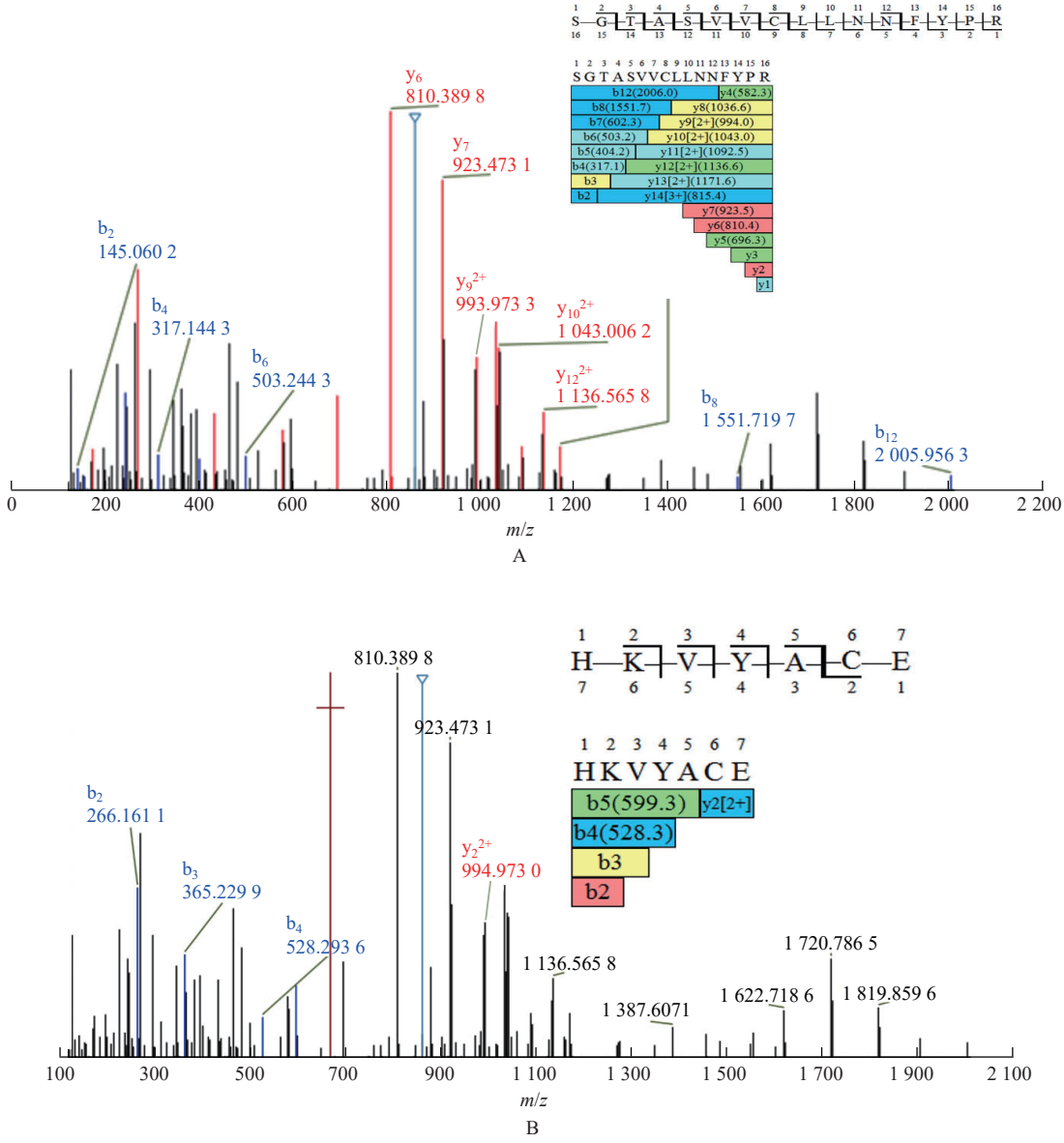
Tab.3 Matching Results of Disulfide Bonds with Proteolysis by Trypsin and Endoproteinase Glu-C

半胱氨酸位置	匹配肽段	保留时间/min	质荷比(*m/z*)	电荷数	理论相对分子质量	相对误差/×10⁻⁶
1:C23/1:C88	1:V19-K42/1:D82-K103	75.08	1 067.300 3	5	5 331.459 4	1.02
1:C134/1:C194	1:S127-R142/1:H189-E195	66.15	863.087 0	3	2 586.235 9	1.20
2:C22/2:C96	2:L20-R38/2:A88-K98	59.09	1 136.829 7	3	3 407.468 6	-0.66
2:C150/2:C206	2:S140-D153/2:Y154-K216	83.46	1 320.501 0	6	7 916.919 3	5.38
1:C214/2:C226	1:S208-C214/2:S225-K228	13.27	631.250 4	2	1 260.486 3	-0.19

表 4 经胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶酶解后的二硫键匹配结果

Tab.4 Disulfide Bond Matching Results after Enzymatic Hydrolysis with Trypsin and Chymotrypsin

半胱氨酸位置	匹配肽段	保留时间/min	质荷比(*m/z*)	电荷数	理论相对分子质量	相对误差/×10⁻⁶
1:C23/1:C88	1:V19-Y32/1:C88-Y91	44.48	1 020.437 8	2	2 038.861 2	-0.06
1:C134/1:C194	1:S127-L136/1:V191-L201	63.63	722.690 2	3	2 165.049 7	-0.39
2:C22/2:C96	2:L20-Y27/2:C96-K98	19.36	545.238 9	2	1 088.463 1	0.18
2:C150/2:C206	2:S140-K153/2:I205-K216	35.38	872.778 1	3	2 615.316 0	-1.32
1:C214/2:C226	1:S208-C214/2:S225-K228	13.11	631.250 2	2	1 260.486 3	-0.19



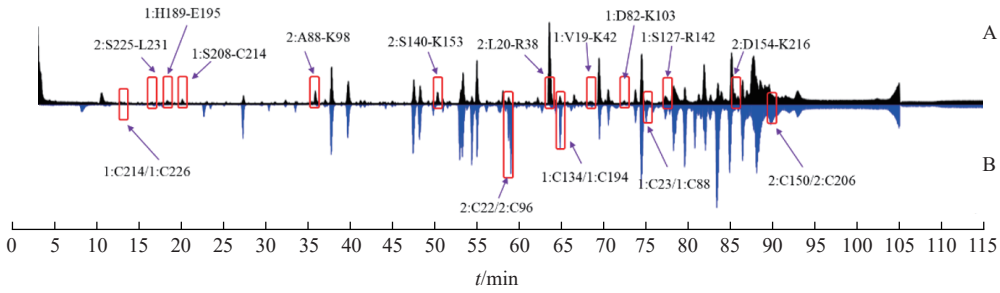
A—1:C134 所在肽段；B—1:C194 所在肽段。

图 5　1:C134/1:C194 的二级质谱图

Fig.5　Secondary Profiles of Intra-chain 1:Cys134/1:Cys194

经部分还原后，会打开二硫键，产生游离肽段，在 TIC 上表现为产生游离肽段的新峰。5 对二硫键还原后产生的 10 条肽段均被成功鉴定，证明在线部分还原法可同时表征二硫键和氨基酸序列。

此外，进一步考察了离线与在线 2 种还原方式结果的一致性。结果显示，2 种方式的指纹图谱基本拟合，序列匹配度和二硫键鉴定的结果也无明显差异；但 2 种方式所得 TIC 中的肽段峰个数和强度存在差异，离线模式 LC 和 HC 检测到肽段数为 93 和 177，较在线还原模式多（肽段数分别为 66 和 129），推测为 2 种模式的混合方式不同导致反应程度不一致。对比 2 种模式，在线部分还原具有明显的优势：其一，在线方法优化和样品测定操作简便，将还原所需的条件编写进程序即可实现自动取样和衍生化，适用于高通量样品检测；其二，重复性试验结果（表 5）显示，在线程序的重复性明显优于



A—部分还原后；B—部分还原前。

图 6 胰蛋白酶和 V8 蛋白酶酶解后样品的 TIC 对比图

Fig.6 Comparison of Total Ion Chromatograms of Samples Treated with Proteolysis by Trypsin and Endoproteinase Glu-C

离线还原方法。除此之外，抗体药物往往样品量少、价格昂贵，在线还原程序还能在一定程度减少样品用量。

表 5 离线和在线 3 次反应后的二硫键肽段峰面积重复性考察

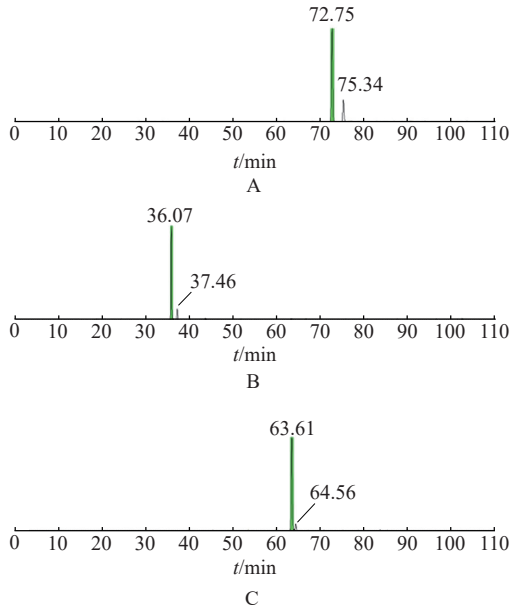
Tab.5 Repeatability of the Peak Area of Disulfide Peptide Fragment after Three Times of Off-line and On-line Reactions

半胱氨酸位置	离线RSD/%	在线RSD/%
1:C23/1:C88	12.67	7.50
1:C134/1:C194	7.95	3.97
2:C22/2:C96	13.20	1.10
2:C150/2:C206	9.06	5.79
1:C214/2:C226	17.42	11.7

3.2 烷基化试剂的影响

1（批号 20211112）在未加入烷基化试剂的变性条件下，发现 3 对错配二硫键，分别为：1:C134/1:C214、1:C194/1:C214、1:C194/2:C226，在选择离子色谱（SIC）图（图 7）中保留时间分别为 72.75、36.07、63.61 min，相对分子质量分别为 2 044.934 8、2 122.966 3、3 592.622 7（图 8）；与二级质谱信号产生的 b 和 y 离子碎片结果结合（图 9），可基本确证该错配二硫键的存在及连接关系，初步推测产生错配原因为样品中存在游离半胱氨酸。

游离半胱氨酸在避光条件下与 IAM 反应后会对巯基进行封端，其所在肽段质量数增加 n×57.02（n 为发生烷基化位点的数量），原理如图

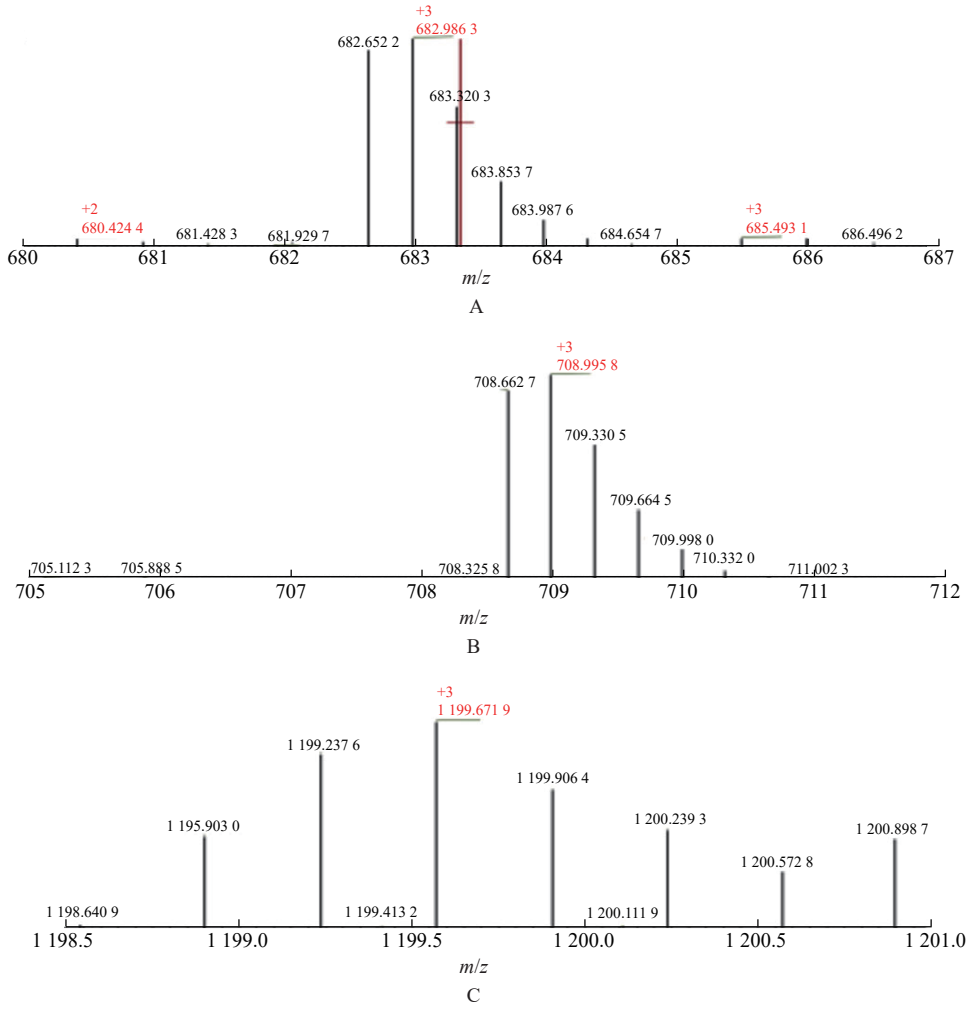


A—1:C134/1:C214；B—1:C194/1:C214；C—1:C194/2:C226。

图 7 3 对错配二硫键的选择离子色谱图

Fig.7 Selective Ion Chromatograms of Scrambled Disulfide Bond

10 所示。本研究对比了变性过程中加入 IAM 所产生的错配二硫键的位置和含量差异，结果（表 6）显示，**1**（批号 20211112）中 3 对错配二硫键的峰面积在加入烷基化试剂后明显降低，且 3 对错配二硫键减少为 2 对，表明对游离巯基进行烷基化封端能减小样品前处理过程中引入错配二硫键的概率[16]。另外，还鉴定到 C134 和 C194 所在的肽段，进一步



A—1:C134/1:C214；B—1:C194/1:C214；C—1:C194/2:C226。

图 8　3 对错配二硫键的一级质谱图

Fig.8　Primary Profile of Scrambled Disulfide Bond

表 6　烷基化试剂对错配二硫键的影响

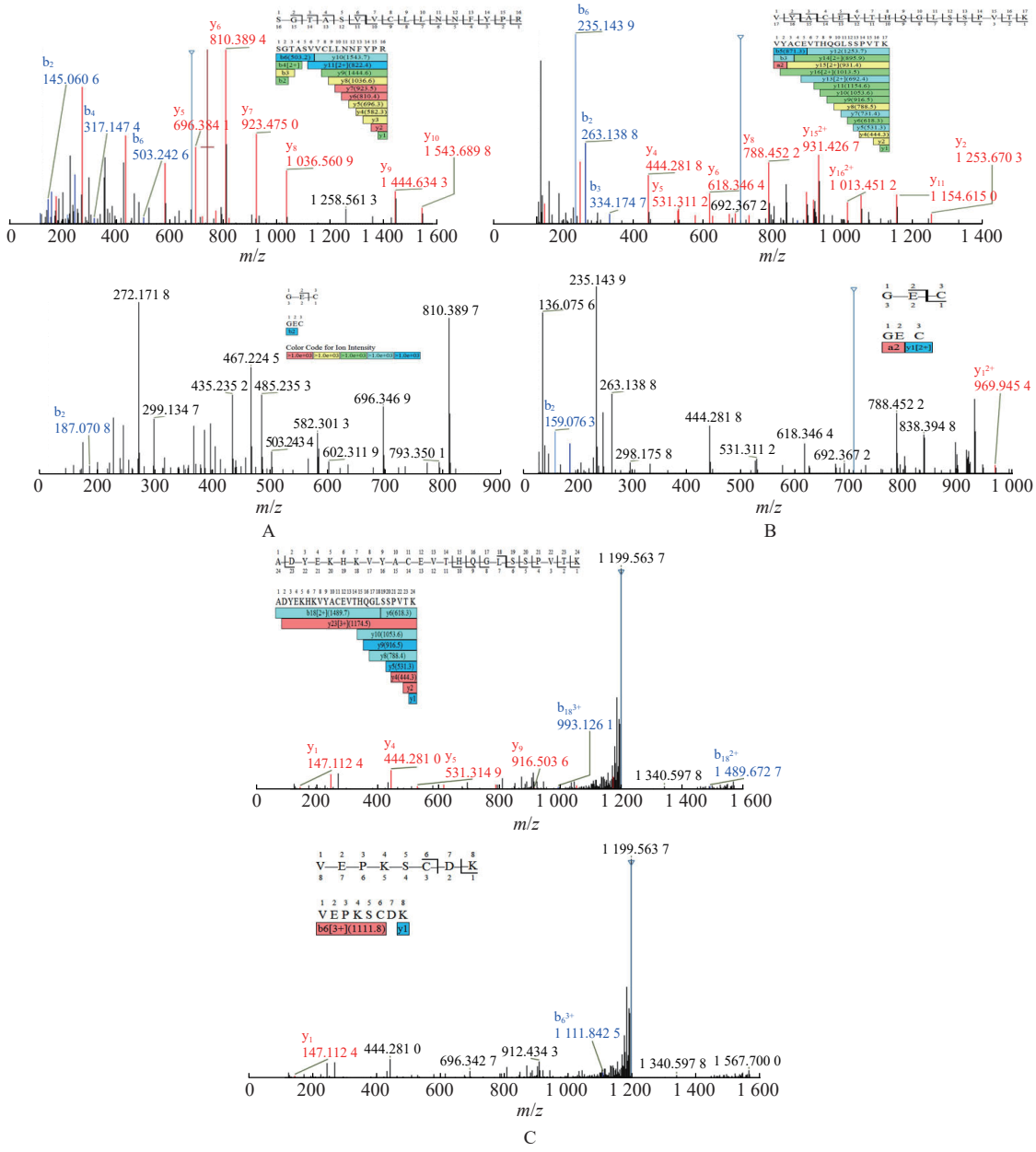
Tab.6　Influence of Alkylation on the Bonding of Scrambled Disulfide Bonds

项目	未加烷基化试剂	加入烷基化试剂
二硫键错配位置	1:C134/1:C214 1:C194/1:C214 1:C194/2:C226	1:C134/1:C214 1:C194/1:C214
错配二硫键峰面积	8.09×10^{6}	4.06×10^{5}
包含二硫键肽段的总峰面积	6.73×10^{8}	4.13×10^{8}
错配比例/%	1.2	0.098

证实 **1**（批号 20211112）中存在低丰度的游离 C134 和 C194。而在无还原试剂存在的变性、烷基化过程中，链内二硫键一般都难以打开，指示样品中可能存在抗体片段，后期试验中将进一步确证。

3.3　酶种类的选择

前处理中酶的种类是影响序列匹配和二硫键定位结果较为关键的因素，若采用胰蛋白酶单一酶解，虽能成功鉴定到氨基酸的序列信息，但二硫键鉴定时未经还原的肽段会加大酶解难度，增加漏切位点，使酶切后产生的部分肽段更长，导致获得的肽段 MS^2 碎片信息有限，鉴定结果的可信度降低。因此，通过采用多酶酶解进一步优化酶切方式，可增加酶解位点、缩短肽链长度，从而获得相关肽段丰富的二级碎片进行表征。根据 **1** 的理论序列，本研究设



A—1:C134/1:C214；B—1:C194-1:C214；C—1:C194/2:C226。

图 9　3 对错配二硫键的二级质谱图以及 b、y 离子匹配结果

Fig.9　Secondary Profiles of Three Pairs of Scrambled Disulfide Bonds and Matching Results for b and y Ions



图 10　烷基化试剂 IAM 与巯基反应原理

Fig.10　Principle of Reaction between Alkylating Agent IAM and Sulfhydryl Groups

计了 2 种酶组合方式进行双酶酶切（胰蛋白酶 +V8 蛋白酶双酶、胰蛋白酶 + 胰凝乳蛋白酶）。结果表明，采用胰蛋白酶 + 胰凝乳蛋白酶双酶处理后的样品肽段 MS^2 碎片丰富，利于二硫键的表征鉴定，但引入非特异性酶（胰凝乳蛋白酶）酶切后产生了较

多亲水性氨基酸短肽，此类肽段在色谱柱上保留弱，降低了肽段覆盖度。为实现良好的肽段序列覆盖度，同时又能进行二硫键定位分析，最终选择采用胰蛋白酶 +V8 蛋白酶双酶酶切，能够产生比单酶酶切更充足的酶解肽段，且酶切产生的肽段长度适中，无丢失片段。

3.4　反应浓度和时间的考察

部分还原试验的关键是二硫键相关的还原 / 未还原酶切肽段都有良好的质谱响应且在同一份样品中能够同时被检测到，这就要求寻找合适的反应条件，以达到理想的反应程度。本试验主要优化了浓度和时间 2 个反应变量。

以 **1** 中一条 1:C134/1:C194 连接的肽段 1:S127-R142/1:H189-E195 为例。以 TCEP 反应浓度为单一变量因素，考察了 TCEP 终浓度为 0、2.5、5、10、20、40 mmol/L 时的反应情况，通过计算还原率［还原率 =（初始未还原二硫键肽段峰面积 - 部分还原后二硫键肽段峰面积）/ 初始未还原二硫键肽段峰面积 ×100%］，拟合出 TCEP 浓度与还原率的关系曲线，结果如图 11 所示。随着 TCEP 浓度的增加，二硫键连接的完整肽链对应的峰面积呈下降趋势，而游离肽链峰面积整体呈上升趋势，与预期结果一致。考虑到还原率应达到 50%左右，最终选择 20 mmol/L 的 TCEP 作为反应浓度。

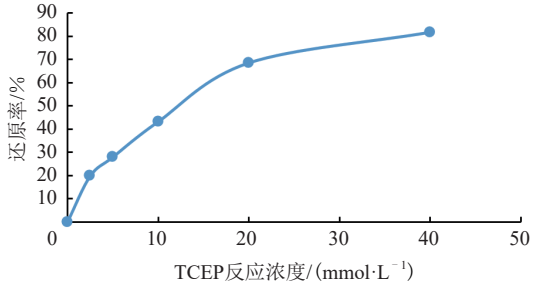


图 11　不同反应浓度下的还原率

Fig.11　Reduction Ratios at Different Reaction Concentrations

以 TCEP 反应时间为单一变量因素，考察了在不同反应时间（0、3、5、8 min）下的还原情况，结果如图 12 所示。随着反应时间的增长，还原率逐渐增加，当反应时间超过 3 min 后，逐渐平缓，结合方法耐用性和高效性，最终选择反应时间为 5 min，既可实现较快速的在线衍生，又能得到较强的信号响应值（各信号峰面积均大于 1×10^7）。

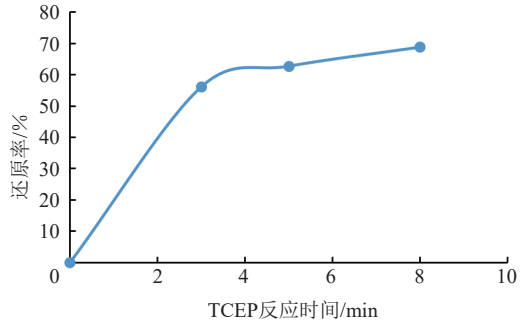


图 12　不同反应时间下的还原率

Fig.12　Reduction Ratios at Different Reaction Time Pionts

4　结论

本研究设计在线部分还原法，采用 LC-MS/MS 对 **1** 的肽图和二硫键进样分析，并采用 BioPharma Finder 5.0 软件对相关数据进行去卷积解析处理。该法较大程度缩减了前处理和进样过程，高效的还原试剂 TCEP 可实现半自动化还原处理，操作简单，可缩短处理和采集的时间以及减少样品的用量；同时保证测定批次间的重复性，一定程度地降低偶然误差，提高方法和结果的可重现性。**1** 的结构是 IgG 的 Fab 片段，与完整抗体相比，相对分子质量较小，二硫键相对较少，同时未连接糖型，后期将进一步考察该方法的通用性，为抗体药物的高通量结构表征提供新途径。

利用 LC-MS/MS 获得 TIC、一级图谱和二级图谱，通过对数据进行分析与筛选，初步建立了多属性分析方法表征抗体药物关键质量属性。结果显示，参比制剂和 2 批样品的序列覆盖率均能达到 100%，均鉴定到氧化修饰，但 **1** 中 PTMs 的含量更高、种类更多；确认 **1** 二硫键连接为 1:C23/1:C88、1:C134/1:C194、2:C22/2:C96、2:C150/2:C206、1:C214/2:C226，其中，1:C214/2:C226 为链间二硫键，其他为链内二硫键，与理论一致。

除此之外，该方法能够鉴定到低丰度的游离半

胱氨酸和错配二硫键，试验证明在前处理中加入一定量的烷基化试剂封闭裸露的巯基可有效降低人为引入的错配概率，后期将进一步确证该游离半胱氨酸的来源，为产品工艺和储存的质控提供相应指导。

致谢：中国医药工业研究总院创新基金项目（YJS2021008）给予支持。上海多米瑞生物技术有限公司冯军老师、李乐乐师兄给予指导与帮助。

参考文献：

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

[2] WOYCECHOWSKY K J, RAINES R T. Native disulfide bond formation in proteins [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2000, **4**(5): 533-539.

[3] 王 辉, 魏敬双. 抗体分子内不配对半胱氨酸的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2015, **28**(8): 880-882.

[4] 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.

[5] CHANDRASEKHAR S, EPLING D E, SOPHOCLEOUS A M, *et al*. Thiol-disulfide exchange in peptides derived from human growth hormone [J]. *J Pharm Sci*, 2014, **103**(4): 1032-1042.

[6] 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.

[7] 程立均, 魏敬双. 抗体分子内的自由巯基和三硫键修饰[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, **24**(10): 1236-1238.

[8] KLEINBERG A, JOSEPH R, MAO Y, *et al*. Ultrasensitive disulfide scrambling analysis of mAbs by LC-MS with post-column reduction and glycine signal enhancement [J]. *Anal Biochem*, 2022, **653**: 114773.

[9] ICH. ICH Q6B Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products [EB/OL]. https://admin. ich. org/sites/default/files/inline-files/SESSION_III_ICHQ6B_Specifications]. pdf.

[10] FERRARA N, DAMICO L, SHAMS N, *et al*. Development of ranibizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antigen binding fragment, as therapy for neovascular age-related macular degeneration [J]. *Retina*, 2006, **26**(8): 859-870.

[11] CHEN Y, WIESMANN C, FUH G, *et al*. Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen [J]. *J Mol Biol*, 1999, **293**(4): 865-881.

[12] 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.

[13] 李乐乐, 吴 勇, 黄宗庆, 等. 雷珠单抗5 L高密度发酵关键参数的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2020, **51**(11): 1387-1393.

[14] WANG W R, VLASAK J, LI Y S, *et al*. Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to FcRn and Fcγ receptors [J]. *Mol Immunol*, 2009, **48**(6/7): 860-866.

[15] DUNKELBERGER E B, BUCHANAN L E, MAREK P, *et al*. Deamidation accelerates amyloid formation and alters amylin fiber structure [J]. *J Am Chem Soc*, 2012, **134**(30): 12658-12667.

[16] SECHI S, CHAIT B T. Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification [J]. *Anal Chem*, 1998, **70**(24): 5150-5158.