·论著·一次研究·

F61 单克隆抗体的结构与理化性质表征

徐小玲[1]，史梦婷[2]，徐巾晶[2]，吕晓君[2]，周　影[3]，夏　敏[3]，宋兰坤[3]，何开勇[1]

1. 湖北省药品监督管理局药品审评检查中心（武汉 430070）
2. 湖北省药品监督检验研究院（武汉 430064）
3. 安捷伦科技有限公司（上海 200082）

【摘要】目的 采用液相色谱–质谱联用（LC–MS）及多种色谱技术对 F61 单克隆抗体（以下简称“单抗”）的结构与理化性质进行深入表征，为其质量控制提供依据。**方法** 采用分子排阻色谱法分析大小变异体；阳离子交换色谱法分析电荷变异体；LC–MS 法测定完整蛋白及亚基分子量；液相色谱串联质谱法进行 N/C 末端序列测定、肽图分析（序列覆盖率、翻译后修饰、二硫键）；亲水相互作用超高效液相色谱–荧光检测–Q–TOF 质谱分析 *N*–糖谱，并通过完整蛋白水平、亚基、糖肽及游离 *N*–糖水平进行糖型分布的正交分析。**结果** F61 单抗单体纯度为 98.74%，聚体 0.94%，片段 0.32%；电荷异质性显示主峰（碱性峰）占 70.99%，酸性峰 21.64%，碱性峰 7.37%。完整蛋白水平脱糖后实测分子量 144 250.46 Da，与理论值（重链 C 端赖氨酸缺失）一致未脱糖样品中丰度最高糖型为 G0F + G0F。亚基水平轻、重链分子量分别为 23 192.03 Da 和 48 936.54 Da，与理论值误差<1 Da。氨基酸序列覆盖率达 100%，重链 N 端存在 3.13% 焦谷氨酸环化，C 端赖氨酸缺失 100%；轻链 N 端焦谷氨酸环化 99.53%。鉴定 16 对二硫键，配对正确。*N*–糖基化位点为重链 N301，主要糖型 G0F、G1F、G0、G2F，4 种正交方法糖型分布基本一致。**结论** 建立了 F61 单抗结构与理化性质系统表征方法，明确了关键质量属性，为抗体药物研发及质量控制提供了科学依据。

【关键词】F61 单克隆抗体；液相色谱质谱联用；结构表征；糖基化；电荷变异体；二硫键

【中图分类号】R917　　**【文献标识码】**A

Structural and physicochemical characterization of F61 monoclonal antibody

XU Xiaoling[1], SHI Mengting[2], XU Jinjing[2], LYU Xiaojun[2], ZHOU Ying[3], XIA Min[3], SONG Lankun[3], HE Kaiyong[1]

1. Drug Evaluation and Inspection Center, Hubei Medical Products Administration, Wuhan 430070, China
2. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430064, China
3. Agilent Technologies Co., Ltd., Shanghai 200082, China
Corresponding author: HE Kaiyong, Email: 511566966@qq.com

【Abstract】Objective To comprehensively characterize the structure and physicochemical properties of F61 monoclonal antibody (mAb) using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and multiple chromatographic techniques, and to provide a basis for its quality control. **Methods** Size-exclusion chromatography (SEC) was employed to analyze size variants;

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202608014
基金项目：湖北省技术创新计划项目（2023BCB097）
通信作者：何开勇，硕士，主任药师，Email：511566966@qq.com

cation-exchange chromatography (IEC) was used to assess charge variants. Intact protein and subunit molecular masses were determined by LC-MS. N-/C-terminal sequencing and peptide mapping (including sequence coverage, post-translational modifications, and disulfide bond assignment) were performed by LC-MS/MS. *N*-glycan profiling was carried out by hydrophilic interaction ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection and quadrupole time-of-flight mass spectrometry (HILIC-UHPLC-FLD-Q-TOF MS), and the glycoform distribution was orthogonally verified at the intact protein, subunit, glycopeptide, and released *N*-glycan levels. **Results** The monomer purity of F61 mAb was 98.74%, with aggregates of 0.94% and fragments of 0.32%. Charge heterogeneity analysis revealed a main peak (basic species) of 70.99%, acidic species of 21.64%, and basic species of 7.37%. At the intact protein level, the observed molecular mass after deglycosylation was 144,250.46 Da, consistent with the theoretical value (heavy chain with C-terminal lysine truncation); the most abundant glycoform in the non-deglycosylated sample was G0F+G0F. At the subunit level, the measured molecular masses of light and heavy chains were 23,192.03 Da and 48,936.54 Da, respectively, with deviations of <1 Da from the theoretical values. The amino acid sequence coverage reached 100%. The heavy chain exhibited 3.13% *N*-terminal pyroglutamate cyclization and 100% C-terminal lysine truncation; the light chain displayed 99.53% *N*-terminal pyroglutamate cyclization. Sixteen disulfide bonds were identified with correct pairing. The *N*-glycosylation site was identified as Asn-301 on the heavy chain, with G0F, G1F, G0, and G2F as the major glycoforms. The glycoform distributions obtained from the four orthogonal methods were consistent. **Conclusion** A systematic characterization approach for the structural and physicochemical properties of F61 mAb has been established, and the critical quality attributes have been elucidated. This work provides a scientific foundation for antibody drug development and quality control.

【Keywords】 F61 monoclonal antibody; Liquid chromatography-mass spectrometry; Structural characterization; Glycosylation; Charge variants; Disulfide bonds

单克隆抗体（以下简称“单抗”）因其高特异性、低毒性和良好疗效，已成为生物制药领域增长最快的一类药物，广泛用于肿瘤、自身免疫性疾病及感染性疾病的治疗[1-2]。抗体的结构复杂性直接影响其生物学功能、稳定性及免疫原性，因此，对其理化性质（如大小变异体、电荷变异体、分子量、氨基酸序列、翻译后修饰及糖基化等）进行全面表征，是抗体药物研发和质量控制的关键环节[3-4]。

近年来，液相色谱-质谱联用（liquid chromatography-mass spectrometry，LC-MS）技术凭借高灵敏度、高分辨率及强大的结构解析能力，成为单抗结构表征的核心工具[5]。通过完整蛋白水平、亚基水平及肽段水平的逐级解析，可获得精确分子量、氨基酸序列覆盖率、翻译后修饰位点及比例、二硫键连接方式等信息。同时，分子排阻色谱（size exclusion chromatography，SEC）和离子交换色谱（ion exchange chromatography，IEC）分别用于评估抗体的大小变异体和电荷异质性等关键质量属性[6]。此外，糖基化修饰对单抗的效应功能、药动学及免疫原性具有重要影响，可通过游离*N*-糖分析及多方法正交验证进行深入研究[7]。

全人源抗新型冠状病毒（SARS-CoV-2）中和性单抗，是利用噬菌体抗体库技术获得的一株特异性针对SARS-CoV-2表面抗原的人源中和性抗体，克隆号为F61（以下简称“F61单抗”）。目前尚无其结构和理化性质系统表征的报道，基于此，本研究参照《中国药典》2025年版通则3405、3127、3129、3130等相关指导原则[8]，综合运用SEC、IEC、LC-MS及LC-MS/MS等分析技术，对F61单抗的大小变异体、电荷变异体、分子量、氨基酸序列、翻译后修饰、二硫键及糖基化修饰进行了深度表征，旨在为该抗体的质量控制、工艺优化等提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器与软件

Agilent Infinity Ⅲ 1290系列高效液相色谱系统（Bio版）、6545XT Q-TOF质谱仪、Agilent

BioConfirm 12.1 软件均购自美国安捷伦科技公司；AUW120D 型十万分之一电子分析天平（日本岛津公司）；XK96-3 型微量振荡器（江苏新康医疗器械有限公司）；KQ3200 型超声波清洗机（杭州微米源科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

F61 单抗样品（武汉生物制品研究所有限公司，批号：20240501）；PNGase F 酶（美国新英格兰生物技术公司，批号：GKE-5006B）；二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT，美国西格玛奥德里奇公司，批号：102633717）；测序级胰蛋白酶（批号：0000677493）和糜蛋白酶（批号：0000623324）购自美国普洛麦格公司；碘乙酰胺（批号：SLBJ8178V）、甲酸铵（批号：MKCH9992）、碳酸氢铵（批号：BCBJ0213V）、三氟乙酸（批号：DA09081）均为分析纯，购自美国西格玛奥德里奇公司；乙腈（上海安谱实验科技股份有限公司，批号：567689）和甲酸［赛默飞世尔科技（中国）有限公司，批号：A117-50］为质谱级；InstantPC 标记 Gly-X *N*-糖前处理试剂盒（美国安捷伦科技公司，批号：681-507）。

2 方法与结果

2.1 SEC 法测定大小变异体

采用 SEC 法分析 F61 单抗的聚集体及片段[8]，色谱柱：AdvanceBio SEC 200A（150 mm × 4.6 mm，1.9 μm）；流动相：含 50 mmol/L 磷酸钾和 250 mmol/L 氯化钾的磷酸盐缓冲液（pH 6.2）；流速：0.3 mL/min；柱温：25 ℃；检测波长：280 nm；进样量：20 μL；样品浓度：10 mg/mL。

SEC 分析显示，F61 单抗主峰保留时间为 3.813 min，峰面积占比 98.74%，为单体峰；保留时间为 3.300 min 的色谱峰为聚集体，峰面积占比 0.94%，聚集体与主峰分离度 2.16（> 2.0）；保留时间为 4.835 ~ 7.038 min 的色谱峰为片段，峰面积占比之和 0.32%（图 1）。结果表明 F61 单抗单体纯度高，聚集体及片段含量低。

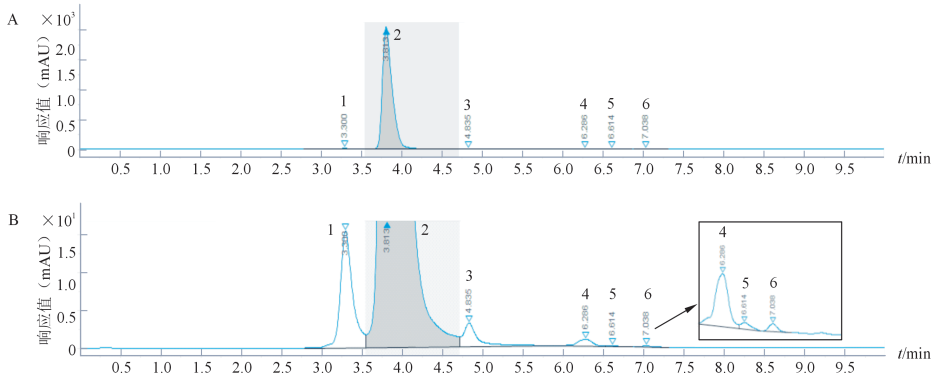

图 1 SEC 聚集体分析可变波长检测器信号图

Figure 1. Variable wavelength detector signal diagram of SEC aggregation analysis

注：A. 单抗样品处理后的信号图；B. 单抗样品处理后的信号放大图；1. 聚集体；2. 单体；3~6. 片段。

2.2 IEC 法分析电荷变异体

采用 IEC 法分析 F61 单抗的电荷异构体[8]，色谱柱：Agilent Bio SCX NP5（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相 A：20 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.0），流动相 B：200 mmol/L 氯化钠溶液 + 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.0），梯度洗脱（0 ~ 2 min，80% A；2 ~ 32 min，80% → 50% A；32 ~ 33 min，50% → 25% A；33 ~ 38 min，25% A；38 ~ 39 min，25% → 80% A；39 ~ 55 min，80% A）；流速：0.6 mL/min；柱温：30 ℃；检测波长：280 nm；进样量：10 μL；样品浓度：1.0 mg/mL。

IEC 分析显示，F61 单抗主峰（碱性峰）保留时间为 17.360 min，峰面积占比 70.99%；保留时间早于主峰的酸性峰（12.335 ~ 16.127 min）占比之和 21.64%；保留时间晚于主峰的碱性峰（19.193 ~ 20.791 min）占比之和 7.37%（图 2）。

2.3 LC-MS 法测定分子量

2.3.1 完整蛋白水平

取供试品适量，用去离子水稀释至 1.0 mg/mL，分为未脱糖样品和脱糖样品（加入 PNGase F 酶，37 ℃孵育 1 h）[8]。色谱条件如下：色谱柱：PLRP-S 1000Å（150 mm × 2.1 mm，8 μm）；流动相 A：0.1% 甲酸水溶液，流动相 B：0.1% 甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（0 ~ 1 min，90% A；1 ~ 5 min，

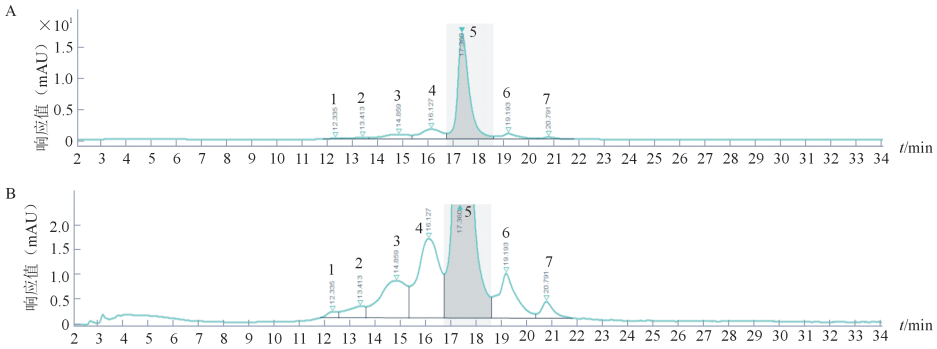

图2 IEC电荷异质体分析可变波长检测器信号图谱

Figure 2. Variable wavelength detector signal diagram of IEC charge variant analysis

注：A.单抗样品处理后的IEC电荷异质体分析VWD信号图；B.单抗样品处理后的IEC电荷异质体分析VWD信号图（放大图）；1~4.酸性峰；5.单抗主峰（碱性峰）；6和7.其他碱性峰。

90% → 10% A；5 ~ 7 min，10% A；7 ~ 11 min，10% → 90% A）；流速：0.3 mL/min；柱温：70 ℃；进样量：2 μL。质谱条件如下：电喷雾电离（electrospray ionization，ESI）正离子检测模式 ESI^+，干燥气温度：320 ℃，流速：10 L/min；鞘气温度：11 L/min；质量数范围：500 ~ 5 000；采集速率：1 spectra/s。使用BioConfirm软件进行去卷积处理。

脱糖F61单抗解卷积后实测分子量144 250.46 Da（图3），与2条重链C端赖氨酸缺失的理论分子量（144 248.87 Da）相差1.59 Da。未脱糖样品中检测到多种糖型（图4），包括G0 + G0、G0 + G0F、G0F + G0F、G0F + G1F、G1F + G1F、G1F + G2F，其中G0F + G0F丰度最高。各糖型实测分子量与理论值误差 < 2.5 Da（表1）。

2.3.2 亚基水平

取供试品适量，用去离子水稀释至0.2 mg/mL，分为还原样品（加入DTT至5 mmol/L，37 ℃孵育1 h）和还原脱糖样品（脱糖后加入DTT）。色谱柱、流动相及质谱参数同“2.3.1”项，梯度洗脱（0 ~ 1 min，90% A；1 ~ 10 min，90% → 30% A；10 ~ 13 min，30% → 10% A；13 ~ 17 min，

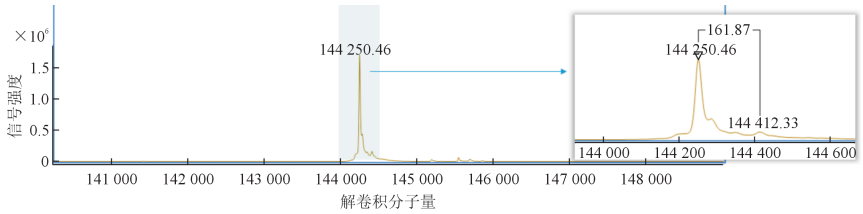

图3 脱糖F61单抗解卷积结果

Figure 3. Deconvolved mass spectrum of deglycosylated F61 monoclonal antibody

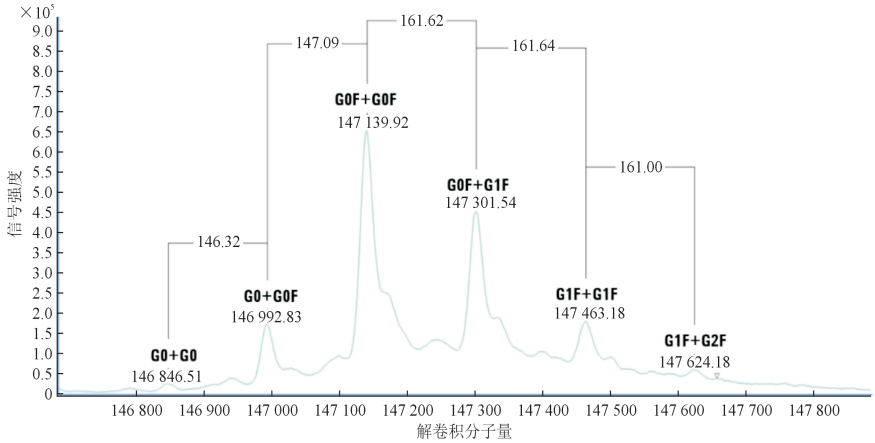

图4 未脱糖F61单抗解卷积结果

Figure 4. Deconvolved mass spectrum of non-deglycosylated F61 monoclonal antibody

10% → 90% A）。进样量：2 μL。

还原脱糖后，轻链实测分子量23 192.03 Da，重链 48 936.54 Da（图 5），与理论值（轻链 23 191.85 Da，重链 48 935.70 Da）误差 < 1 Da。未脱糖还原样品中，轻链分子量与理论值一致，重链上检测到 G0、G0F、G1F、G2F 4 种糖型（图6），其中G0F丰度最高。各糖型实测分子量与理论值误差 < 1 Da（表2）。

表1 完整蛋白水平分子量计算结果

Table 1. Molecular mass results at the intact protein level

样品信息	修饰类型	理论分子量（Da）	测得分子量（Da）	误差（Da）
脱糖F61单抗	2条重链C端的K缺失	144 248.87	144 250.46	1.59
未脱糖F61单抗	G0 + G0	146 845.32	146 846.51	1.18
	G0 + G0F	146 991.47	146 992.83	1.36
	G0F + G0F	147 137.61	147 139.92	2.31
	G0F + G1F	147 299.76	147 301.54	1.78
	G1F + G1F	147 461.90	147 463.18	1.28
	G1F + G2F	147 624.04	147 624.18	0.14

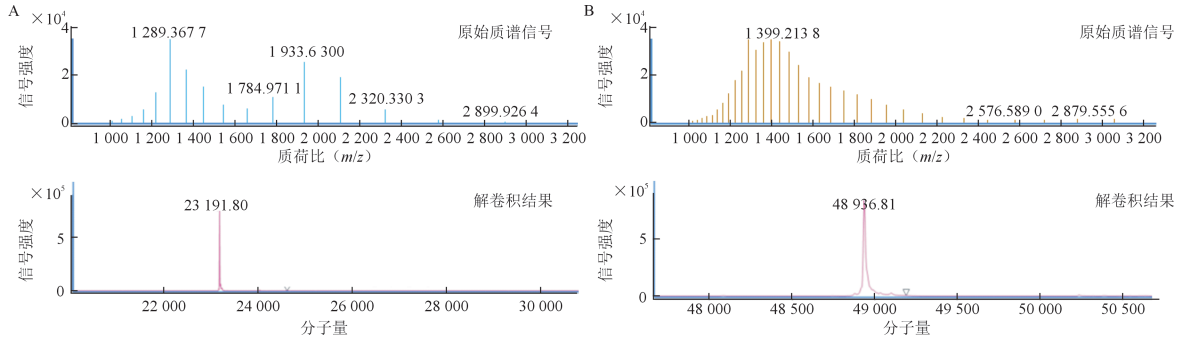

图5 还原条件下脱糖F61单抗质量数分析结果

Figure 5. Mass analysis of deglycosylated F61 monoclonal antibody under reducing conditions

注：A. 轻链；B. 重链。

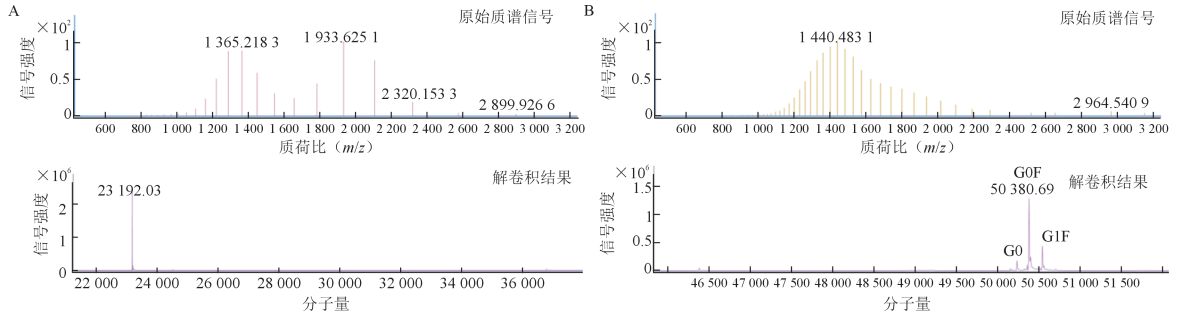

图6 还原条件下未脱糖F61单抗质量数分析结果

Figure 6. Mass analysis of non-deglycosylated F61 monoclonal antibody under reducing conditions

注：A. 轻链；B. 重链。

表2 亚基水平分子量计算结果

Table 2. Molecular mass results at the subunit level

样品信息	修饰类型	理论分子量（Da）	测得分子量（Da）	误差（Da）
脱糖F61单抗	轻链	23 191.85	23 192.03	0.18
	重链	48 935.70	48 936.54	0.84
未脱糖F61单抗	轻链	23 191.85	23 192.03	0.18
	重链（G0）	50 234.91	50 235.31	0.40
	重链（G0F）	50 381.06	50 380.72	0.34
	重链（G1F）	50 543.20	50 543.09	0.11
	重链（G2F）	50 705.34	50 704.66	0.68

2.4 N末端及C末端序列

取供试品适量，经变性、还原、烷基化处理后，分别用胰蛋白酶和谷氨酸蛋白内切酶（Glu-C）进行酶切（酶：底物 = 1：50，37 ℃孵育4 h）[8]。色谱条件如下：色谱柱：Agilent AdvanceBio肽谱分析柱（150 mm × 2.1 mm，2.7 μm）；流动相A：0.1%甲酸水溶液；流动相B：0.1%甲酸乙腈溶液，梯度洗脱（1 ~ 90 min，98% → 60% A）；流速：0.2 mL/min；柱温：60 ℃。质谱采用Auto MS/MS模式采集数据，使用BioConfirm软件分析，根据二级碎片离子确定序列及修饰占比。

结果显示，重链N端序列为EVQLVESGGGLVQPGGSLR（氨基酸1 ~ 19），实测分子量1 880.995 9 Da，存在焦谷氨酸环化修饰（pyroGlu-E）的肽段分子量1 862.985 6 Da，修饰占比3.13%；重链C端序列为SLSLSPGK（氨基酸440 ~ 447），未检出未修饰肽段，赖氨酸缺失（Lys-loss）肽段分子量659.3493 Da，修饰占比100%。轻链N端序列为QSVLTQPPSVSAAPGQK（氨基酸1 ~ 17），未修饰肽段占比0.47%，焦谷氨酸环化修饰（pyroGlu-Q）肽段分子量1 676.873 5 Da，占比99.53%；轻链C端序列为SFNRGEC（氨基酸211 ~ 217），实测分子量868.349 9 Da，与理论值一致（表3）。

表3 氨基酸序列确证结果

Table 3. Confirmation of amino acid sequences

类型	序列编号	氨基酸序列	修饰类型	修饰占比（%）	保留时间（min）	理论分子量（Da）	实测分子量（Da）	误差（Da）
重链	N端A（1~19）	EVQLVESGGGLVQPGGSLR	—	96.87	50.792	1 880.995 6	1 880.995 9	0.000 3
			pyroGlu（E）	3.13	50.793	1 862.985 0	1 862.985 6	0.000 6
	C端A（440~447）	SLSLSPGK	—	0	—	—	—	—
			Lys-loss	100.00	35.640	659.349 0	659.349 3	0.000 3
轻链	N端B（1~17）	QSVLTQPPSVSAAPGQK	—	0.47	39.090	1 693.899 9	1 693.901 0	0.001 1
			pyroGlu（Q）	99.53	45.435	1 676.873 4	1 676.873 5	0.000 1
	C端B（211~217）	SFNRGEC	—	100.00	12.846	868.349 8	868.349 9	0.000 1

注：— 表示未发生修饰。

2.5 肽图分析

2.5.1 氨基酸序列覆盖率

样品经变性、还原、烷基化后，用50 mmol/L碳酸氢铵缓冲液稀释，分别使用胰蛋白酶和糜蛋白酶进行酶解，行LC-MS/MS分析（条件同“2.4”项）。检索参数：固定修饰为烷基化（Cys，+57.02 Da）；可变修饰包括脱酰胺（N，+0.98 Da）、氧化（M，+15.99 Da）、N端焦谷氨酸环化（Q或E，-17.03 Da）；母离子质量误差10 ppm，子离子质量误差20 ppm，允许最多1个漏切位点。胰蛋白酶和糜蛋白酶酶解联合分析，氨基酸序列覆盖率达到100%（图7），与理论序列完全一致[8]。

2.5.2 二硫键确认

样品经变性、烷基化处理后，采用胰蛋白酶非还原酶解（不加DTT），LC-MS/MS分析[9]。使用BioConfirm软件进行二硫键连接肽段的鉴定，要求至少3个碎片离子匹配。非还原酶解后，共鉴定出8种二硫键连接肽段（表4），对应16对二硫键，所有连接肽段均经二级碎片离子确认（图8），二硫键连接方式与理论一致。

2.6 糖结构分析

2.6.1 糖基化位点鉴定

根据肽图分析数据，提取糖基化特征离子（*m/z* 126、204、366），鉴定糖基化修饰肽段及其糖型。通过糖肽特征离子（*m/z* 126、204、366）鉴定，确认糖基化位点位于重链301位天冬酰胺（HC：N301），共鉴定到5种不同糖型的糖基化修饰肽段（表5）。

2.6.2 *N*-糖含量测定及鉴定

采用InstantPC标记Gly-X *N*-糖前处理试剂盒制备样品：取供试品适量，加入Gly-X变性剂，90 ℃孵育3 min；冷却后加入PNGase F酶，50 ℃孵育5 min；加入InstantPC染料，50 ℃孵育1 min；经净化板纯化[8]。色谱条件如下：色谱柱：ACQUITY UPLC BEH Glycan Amide（150 mm × 2.1 mm，1.7 μm）；流动相A：100 mmol/L甲酸铵（pH 4.5），流动相B：乙腈，梯度洗脱（1 ~ 45 min，28% → 38% A）；流速：0.4 mL/min；柱温：40 ℃；荧光检测：激发波长285 nm，发射波长345 nm；质谱ESI⁺模式，质量数范围700 ~ 2 000。使用面



图7 分别使用胰蛋白酶和糜蛋白酶酶解液测试的肽段覆盖率

Figure 7. Peptide sequence coverage using trypsin and chymotrypsin digests

注：A. 重链；B. 轻链；蓝色为胰蛋白酶；紫色为糜蛋白酶。

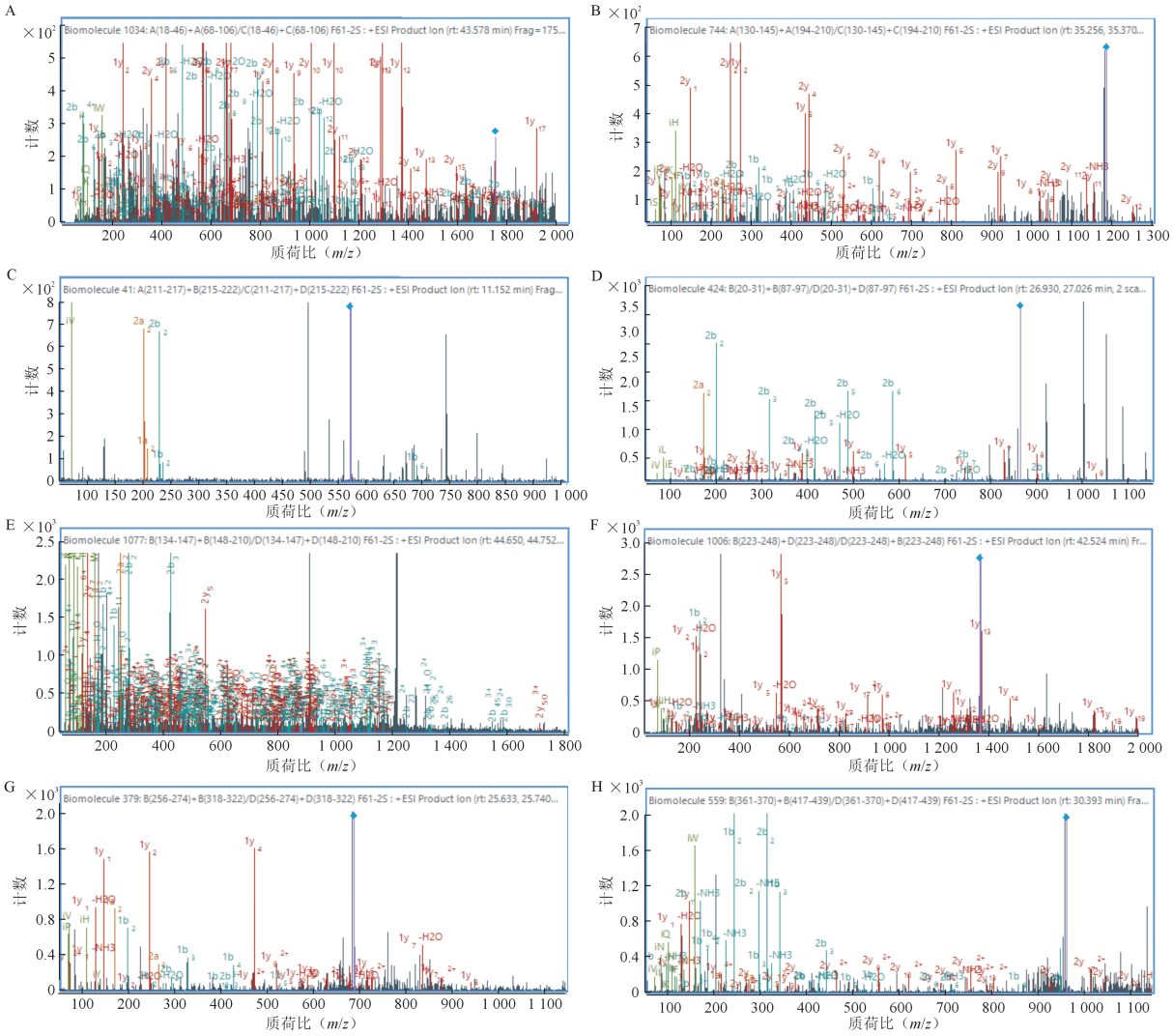

图8 二硫键连接的肽段二级碎片信息汇总

Figure 8. Summary of MS/MS fragmentation information for disulfide-linked peptides

注：A. 肽段1（m/z 1 403.849 7）；B. 肽段2（m/z 712.157）；C. 肽段3（m/z 429.444 4）；D. 肽段4（m/z 648.807 7）；E. 肽段5（m/z 1 131.994 2）；F. 肽段6（m/z 780.263 9）；G. 肽段7（m/z 550.668）；H. 肽段8（m/z 641.812 6）。

表4 二硫键连接的肽段信息汇总表

Table 4. Summary of disulfide-linked peptides

序号	质荷比（*m/z*）	质量	保留时间（min）	峰高	电荷数	碎片离子数	序列名称	序列位置	序列	目标序列质量	质量偏差（ppm）
1	1 403.849 8	7 014.215 9	43.553	232 639	5	81	F61-2S	A（18-46）+A（68-106）/ C（18-46）+C（68-106）	VTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPK+SGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAAWVF	7 014.218 9	-0.43
2	712.157	3 555.748 6	35.349	873 940	5	109	F61-2S	A（130-145）+A（194-210）/ C（130-145）+C（194-210）	SGTASVVCLNNFYPR+VYACEVTHQGLSSPVTK	3 555.749	-0.14
3	429.444 4	1 713.747 1	11.166	7 027	3	11	F61-2S	A（211-217）+B（215-222）/ C（211-217）+D（215-222）	SFNRGEC+VEPKSCDK	1 713.745 1	1.19
4	648.807 7	2 591.200 2	26.975	1 293 493	4	42	F61-2S	B（20-31）+B（87-97）/ D（20-31）+D（87-97）	LSCEASEIIVNR+AEDTAVYYCAR	2 591.199 6	0.24
5	1131.994 2	7 916.923 5	44.658	652 717	8	213	F61-2S	B（134-147）+B（148-210）/ D（134-147）+D（148-210）	STSGGTAALGCLVK+DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY	7 916.919 4	0.52
6	780.263 9	5454.789	42.566	477 320	8	157	F61-2S	B（223-248）+D（223-248）/ D（223-248）+B（223-248）	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK+THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK	5 454.783 4	1.03
7	550.668	2 748.301 1	25.679	443 022	5	60	F61-2S	B（256-274）+B（318-322）/ D（256-274）+D（318-322）	TPEVTCVVVDVSHEDPEVK+EYKCK	2 748.298 6	0.9
8	641.812 6	3 844.828 8	30.397	124 044	6	57	F61-2S	B（361-370）+B（417-439）/ D（361-370）+D（417-439）	NQVSLTCLVK+WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK	3 844.823 6	1.34

表5 不同糖型修饰肽段信号汇总表

Table 5. Summary of glycopeptide signals with different glycoforms

序号	质荷比（*m/z*）	质量	保留时间（min）	碎片离子数	MS/MS谱图数	峰容积	序列名称	序列位置	序列	可变修饰	目标序列质量	质量偏差（ppm）
1	932.704 8	2 795.091 2	17.999	45	6	1 840 864	ADM HC	A（297-305）	EEQYNSTYR	1×G1F	2 795.091 4	-0.1
2	1 317.527 4	2 633.041	18.121	16	6	5 660 460	ADM HC	A（297-305）	EEQYNSTYR	5×G0F（NGA2F）	2 633.038 6	0.89
3	986.721 5	2 957.143 2	17.963	10	—	117 709	ADM HC	A（297-305）	EEQYNSTYR	1×G2F（NA2F）	2 957.144 3	-0.36
4	830.000 8	2 486.980 2	17.852	10	1	71 720	ADM HC	A（297-305）	EEQYNSTYR	1×G0（NGA2）	2 486.980 7	-0.2
5	1 142.956 6	2 283.899 7	17.852	5	1	54 767	ADM HC	A（297-305）	EEQYNSTYR	1×G0-N	2 283.901 3	-0.71

注：— 表示未收集到MS/MS的碎片信号。

积归一化法计算各糖型相对含量，连续进样6次考察精密度。

结果显示，主要糖型包括G0、G0F、G1、G1F、G2F等（图9）。连续6次进样各糖型峰面积百分比的*RSD*均小于2.0%（表6），表明方法精密度良好。其中占比最高的糖型为G0F（平均值58.41%，*RSD* = 0.04%），其次为G1F（23.54%，*RSD* = 0.10%）、G0（7.46%，*RSD* = 0.10%）、G2F（2.24%，*RSD* = 0.20%）。

2.6.3 *N*-糖含量正交分析

比较完整蛋白水平、亚基水平、糖肽水平及游离*N*-糖水平4种方法测得的糖型分布，验证结果的准确性。4种正交方法（完整蛋白水平、亚基水平、糖肽水平、游离*N*-糖水平）测得的糖型分布结果基本可比（图10和表7）。G0F为占比最高的糖型，4种方法结果均在63% ~ 70%之间；G1F占比在18% ~ 27%之间；G0占比在7% ~ 9%之间；G2F占比在1.5% ~ 3%之间。

3 讨论

本研究综合运用SEC、IEC、LC-MS及LC-MS/MS等技术，对F61单抗的大小变异体、电荷变异体、分子量、氨基酸序列、翻译后修饰、二硫键及糖基化修饰进行了系统表征。结果表明F61单抗具有较高的结构均一性和正确的翻译后修饰模式。

SEC结果显示单体纯度达98.74%，聚集体含量（0.94%）和片段含量（0.32%）均低于一般警戒线，表明该抗体尺寸均一性良好，符合生物技术药物质量要求[10]。IEC分析显示主峰占比70.99%，酸性峰21.64%，碱性峰7.37%。电荷异质性通常源于脱酰胺、糖化、C端加工等修饰[11]，本研究后续肽图证实重链C端赖氨酸完全缺失（100%），与碱性峰的形成有一定关联。SEC法本身存在一定局限性，无法区分共价聚体与可逆聚体，后续需采用毛细管电泳-十二烷基

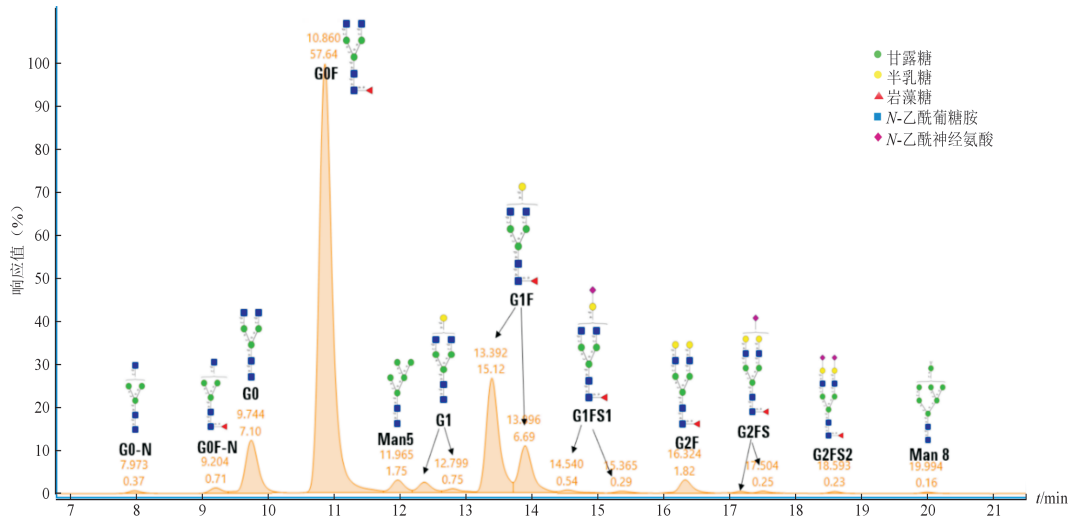

图9 基于LC-Q-TOF的F61单克隆抗体中游离*N*-糖的定性分析

Figure 9. Qualitative analysis of free *N*-glycans in F61 monoclonal antibody by LC-Q-TOF

表6 F61单抗游离*N*-糖精密度测试（%，n = 6）

Table 6. Precision test of released *N*-glycans of F61 monoclonal antibody (%, n = 6)

Area	G0-N	G0F-N	G0	G0F	Man5	G1	G1F	G1FS1	G2F	G2FS	G2FS2	Man8
1	0.38	0.72	7.46	58.43	1.93	2.79	23.51	1.31	2.24	0.70	0.31	0.22
2	0.38	0.72	7.45	58.39	1.93	2.80	23.55	1.31	2.24	0.70	0.32	0.23
3	0.38	0.72	7.47	58.42	1.94	2.80	23.52	1.31	2.23	0.69	0.31	0.22
4	0.38	0.72	7.47	58.44	1.93	2.80	23.53	1.30	2.23	0.69	0.31	0.22
5	0.38	0.72	7.46	58.40	1.93	2.80	23.53	1.31	2.24	0.70	0.31	0.22
6	0.38	0.72	7.45	58.39	1.93	2.79	23.56	1.30	2.24	0.70	0.31	0.22
平均值	0.38	0.72	7.46	58.41	1.93	2.80	23.54	1.31	2.24	0.70	0.31	0.22
RSD	0.90	0.10	0.10	0.04	0.20	0.10	0.10	0.20	0.20	0.80	1.10	1.40

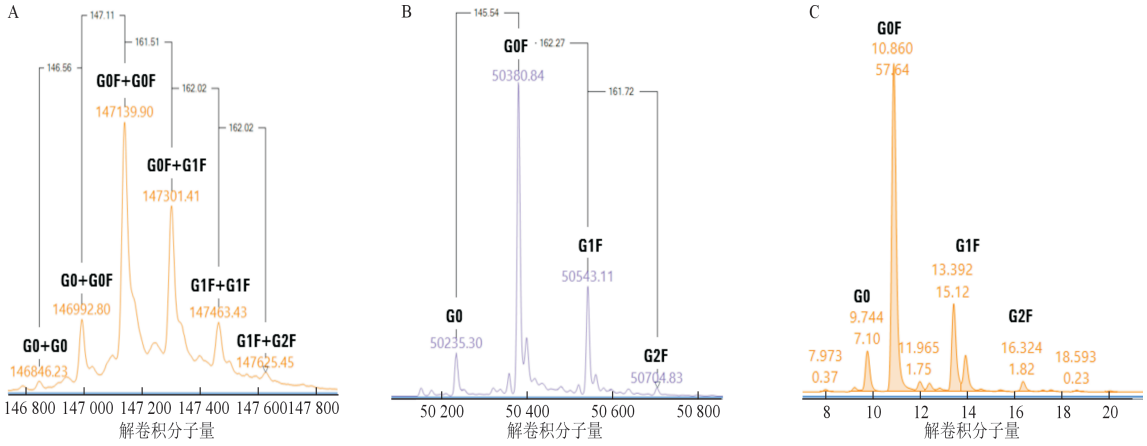

图10 正交方法检测F61单抗中的糖型丰度

Figure 10. Glycoform abundances of F61 monoclonal antibody determined by orthogonal methods

注：A.完整蛋白水平；B.亚基水平（重链）；C.游离N糖计算。

表7 不同正交条件下检测F61单抗的糖型对比（%）

Table 7. Comparison of glycoform distributions of F61 monoclonal antibody by different orthogonal methods (%)

糖型	完整蛋白水平	亚基水平	糖肽水平	游离*N*-糖水平
G0F	63.45	65.79	69.94	63.73
G1F	27.45	23.25	18.79	25.68
G0	7.53	9.20	8.42	8.14
G2F	1.58	1.76	2.85	2.44

硫酸钠等互补技术进行验证，以获得全面的大小变异体和电荷变异体信息。

分子量测定是抗体结构表征的基础[5]。完整蛋白水平脱糖后分子量与理论值基本一致，证实了重链C端赖氨酸缺失。亚基水平分子量误差<1 Da，进一步确认了轻、重链的精确质量。未脱糖样品中糖型分布以G0F为主，与已上市治疗性单抗（如曲妥珠单抗、阿达木单抗）的糖谱特征相似[8]。

N/C末端序列分析显示轻链N端焦谷氨酸环化比例高达99.53%，重链N端环化比例较低（3.13%），这与免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）类抗体常见的修饰特征一致[12]。焦谷氨酸环化可增强抗体稳定性，通常不影响生物学活性。重链C端赖氨酸缺失100%也是CHO细胞表达抗体的常见现象[13]。

肽图分析联合胰蛋白酶和糜蛋白酶实现了100%序列覆盖率，确保了一级结构的正确性。二硫键分析共鉴定16对二硫键，与IgG1亚型理论配对完全一致，表明F61单抗高级结构正确。

糖基化修饰是影响单抗效应功能的关键因素[14]。本研究通过游离*N*-糖分析确定了F61单抗的主要糖型为G0F（58.41%）、G1F（23.54%）、G0（7.46%）和G2F（2.24%）。为验证糖型定量的准确性，本文比较了4种正交方法（完整蛋白、亚基、糖肽、游离*N*-糖）的结果，发现各方法测得的糖型分布趋势基本一致，G0F均为最主要糖型。糖肽水平G1F占比与完整蛋白水平有一定差异，可能源于：糖肽电离效率低于完整蛋白，影响定量准确性；糖肽水平糖型覆盖率不足，低丰度糖型缺失导致比例偏移；不同方法的样品前处理和检测原理存在差异。因此，在报告糖型定量结果时建议综合考虑多种方法的数据。这种多方法正交验证策略为抗体药物糖基化一致性评价提供了可靠技术手段[15]。

综上所述，本研究建立了F61单抗结构与理化性质的系统表征方法，明确了其关键质量属性，为该抗体的质量控制、工艺优化及后续研发提供了科学依据，也为同类抗体药物的结构表征研究提供了参考。

参考文献

1 Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2018[J]. Nat Biotechnol, 2018, 36(12): 1136-1145. DOI: 10.1038/nbt.4305.

2 李梦林, 朱文文, 张金兰. 基于*N*-聚糖和完整糖肽的单克隆抗体药物糖基化修饰表征[J]. 药学学报, 2021, 56(9): 2360-2366. [Li ML, Zhu WW, Zhang JL. *N*-Glycans and intact glycopeptide-based characterization of *N*-glycosylation of monoclonal antibody drugs[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2021, 56(9): 2360-2366.] DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0639.

3 Alhazmi HA, Albratty M. Analytical techniques for the characterization and quantification of monoclonal antibodies[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(2): 291. DOI: 10.3390/ph16020291.

4 Limpikirati PK, Panichakul T, Vimolmangkang S, et al. Basic regulatory science behind drug substance and drug product specifications of monoclonal antibodies and other protein therapeutics[J]. J Pharm Anal, 2024, 14(6): 100916. DOI: 10.1016/j.jpha.2023.12.006.

5 Shion H, Chakraborty A, Yu YQ, 等 . 液质联用(LC/MS)技术在单克隆抗体(曲妥珠单抗)结构表征上的应用[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(4): 418-426. [Shion H, Chakraborty A, Yu YQ, et al. Structural characterization of the therapeutic monoclonal antibody trastuzumab by LC/MS[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2014, 23(4): 418-426.] https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract? v=6Lrx04q0FIztF4BuVodnNlO71lpfUJX4YRletTXpsIAcI3AVn9Z7QFogv-C4MdBNOfVfIrNl4X8galR5m4XD4r_X321rpHE-uf_E2EAt4OMYjTz0XUzygA4o84lCCNN6GU1m2lGWO_R3HtHBMR78qJqq1O3TYpzIbI6GTXUdrZTok1OiAPX2EQ==.

6 Yüce M, Sert F, Torabfam M, et al. Fractionated charge variants of biosimilars: a review of separation methods, structural and functional analysis[J]. Anal Chim Acta, 2021, 1152: 238189. DOI: 10.1016/j.aca.2020.12.064.

7 Evans AR, Mulholland J, Lewis MJ, et al. Targeted CQA analytical control strategy for commercial antibody products: replacing ion-exchange chromatography methods for charge heterogeneity with multi-attribute monitoring[J]. MAbs, 2024, 16(1): 2341641. DOI: 10.1080/19420862.2024.2341641.

8 中国药典 2025 年版 . 三部[S]. 2025: 388-396, 414-415.

9 Gu L, Hu TX. A simplified non-reduced peptide mapping method with faster and efficient enzymatic digestion for characterization of native disulfide bonds in monoclonal and bispecific antibodies[J]. J Pharm Biomed Anal, 2024, 250: 116400. DOI: 10.1016/j.jpba.2024.116400.

10 Beck A, Liu H. Macro- and micro-heterogeneity of natural and recombinant IgG antibodies[J]. Antibodies (Basel), 2019, 8(1): 18. DOI: 10.3390/antib8010018.

11 Zhang P, Woen S, Wang T, et al. Challenges of glycosylation analysis and control: an integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs[J]. Drug Discov Today, 2016, 21(5): 740-765. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.01.006.

12 Dick LW Jr, Kim C, Qiu D, et al. Determination of the origin of the *N*-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides[J]. Biotechnol Bioeng, 2007, 97(3): 544-553. DOI: 10.1002/bit.21260.

13 Harris RJ, Kabakoff B, Macchi FD, et al. Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 2001, 752(2): 233-245. DOI: 10.1016/S0378-4347(00)00548-X.

14 Nimmerjahn F, Vidarsson G, Cragg MS. Effect of posttranslational modifications and subclass on IgG activity: from immunity to immunotherapy[J]. Nat Immunol, 2023, 24(8): 1244-1255. DOI: 10.1038/s41590-023-01544-8.

15 Shipman J, Karfunkle M, Zhu H, et al. Assessment of monoclonal antibody glycosylation: a comparative study using HRMS, NMR, and HILIC-FLD[J]. Anal Bioanal Chem, 2024, 416(13): 3127-3137. DOI: 10.1007/s00216-024-05261-5.

收稿日期：2026 年 08 月 04 日 修回日期：2026 年 09 月 17 日
本文编辑：周璐敏 冼静怡