

## 英夫利西单抗活性候选国家标准品的一级结构表征<sup>\*</sup>

李玮玉, 张佳龄, 李萌, 俞小娟, 武刚, 于传飞<sup>\*\*</sup>, 王兰<sup>\*\*</sup>

(中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

**摘要 目的:** 对英夫利西单抗活性候选国家标准品进行一级结构表征, 为该单抗的后续研究提供技术依据。**方法:** 基于超高效液相色谱-串联质谱 (ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS) 对英夫利西单抗活性候选国家标准品的完整相对分子质量、轻重链亚基相对分子质量进行检测; 使用 UPLC-MS/MS 对英夫利西单抗活性候选国家标准品的序列覆盖率、糖基化位点及二硫键进行分析。**结果:** 英夫利西单抗活性候选国家标准品的完整相对分子质量为 148 515; 轻链相对分子质量 23 435、重链相对分子质量 50 827; 英夫利西单抗活性候选国家标准品轻链序列覆盖率 100%、重链序列覆盖率 100%; 该单抗活性候选标准品糖基化位点位于重链 N<sub>300</sub>; 共有 16 对二硫键, 2 条重链链内各 4 对, 链间 2 对, 2 条轻链链内各 2 对, 2 组轻重链间各 1 对。**结论:** 对英夫利西单抗活性候选国家标准品进行一级结构确证, 为后续该单抗标准物质的建立和分析方法的标准化及产品质量控制提供技术保障。**关键词:** 英夫利西; 国家标准品; 一级结构; 高效液相色谱串联质谱; 表征

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2025) 03-0460-15

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-1266

## Primary structure characterization of the active national standard candidate of infliximab<sup>\*</sup>

LI Wei-yu, ZHANG Jia-ling, LI Meng, YU Xiao-juan, WU Gang,  
YU Chuan-Fei<sup>\*\*</sup>, WANG Lan<sup>\*\*</sup>

(National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

**Abstract Objective:** To characterize the primary structure of the active national standard candidate of infliximab to provide a technical basis for this monoclonal antibody. **Methods:** The complete relative molecular mass and the relative molecular masses of the light and heavy chain subunits of the active national standard candidate of infliximab were detected based on ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS). The relative molecular masses of the light and heavy chain subunits of the active national standard candidate

\* 国家药品标准制修订研究课题“注射用英夫利西单抗国家标准建立”(2023S004); 中检院关键技术研究基金(课题编号: GJJS-2022-5-3)

\*\* 通信作者 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

于传飞 Tel: (010) 53852171; E-mail: yuef@nifdc.org.cn

第一作者 TEL: (010) 53852199; E-mail: liweiyu1219@163.com

of infliximab were analyzed by UPLC-MS/MS. UPLC-MS/MS was used to analyze the sequence coverage, glycosylation sites and disulfide bond localization of infliximab activity candidate national standard products.

**Results:** The complete relative molecular mass of infliximab was 148 515. The relative masses of its light and heavy chain subunits were 23 435 and 50 827 respectively. The sequence coverage of infliximab was 100% for light chain and 100% for heavy chain. The glycosylation sites of infliximab were analyzed by UPLC-MS/MS; and the disulfide bonds were localized. The glycosylation site of the monoclonal antibody candidate was located at N<sub>300</sub> of the heavy chain; there were 16 pairs of disulfide bonds, 4 pairs within each of the two heavy chains, 2 pairs between chains, 2 pairs within each of the 2 light chains, and 1 pair between each of the two groups of light and heavy chains.

**Conclusion:** The primary structural confirmation of the national standard candidate of infliximab monoclonal antibody activity provides a technical guarantee for the establishment of the monoclonal antibody standard substance, the standardization of analytical methods and the control of product quality.

**Keywords:** infliximab; national standard; primary structure; UPLC-MS/MS; characterization

自 1986 年首个鼠源性单克隆抗体问世以来,单克隆抗体药物已经发展到了第 4 代<sup>[1]</sup>。由于其对特定靶点的高度选择性和亲和力,能够与特定的分子或细胞结合,阻断疾病发展的关键信号通路,因此在肿瘤、感染病、自身免疫性疾病、器官性移植等多个领域发挥有效治疗作用<sup>[2]</sup>。截至 2024 年 5 月,全球约有 140 种单克隆抗体药物获美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准,并且在 2023 年全球药品销售 TOP 20 产品中抗体类药物有 8 种,且销售额占据全球医药市场的约 50%;与此同时,2023 年中国药品销售 TOP 25 榜上,抗体类药物有 9 种,抗体占全国销售额 40%<sup>[3]</sup>,因此治疗性单克隆抗体药物是国内外研发的热点之一。

英夫利西单抗是一种人鼠嵌合型免疫球蛋白 G(IgG)类单克隆抗体,具有高亲和力和特异性结合肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的能力<sup>[4]</sup>,通过与 TNF- $\alpha$  分子结合,英夫利西单抗能够阻断 TNF- $\alpha$  的活性,并且能够有效中和其对目标细胞的作用<sup>[5-6]</sup>。TNF- $\alpha$  是由免疫系统所产生的一类炎症性的细胞调节因子,通过与其 TNF 受体(TNFR)结合,可以促进炎症细胞间的活化和迁移,增加炎症介质的释放<sup>[7]</sup>。实验显示,当机体长期暴露于高水平的 TNF- $\alpha$  或者 TNF- $\alpha$  在体内过度表达会导致多种炎症性疾病的发生,因此 TNF- $\alpha$  被认为是参与自身免疫性疾病的主要炎症细胞因子以及重要药物靶点<sup>[6-7]</sup>。目前已广泛用于治疗类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)、强直性脊柱炎(ankylosing spondylitis, AS)、银屑病性关节炎(psoriaticarthritis, PsA)、溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)、成人和儿童克罗恩病(Crohn's disease,

CD)等疾病<sup>[8]</sup>。

欧洲药品管理局(EMA)和国际协调会议(ICH)Q6B 以及《中华人民共和国药典》中有关生物制品的指导原则指出了生物制品制备过程中对其质量特性分析的重要性,包括组分测定、物理性质和一级结构等测定<sup>[9]</sup>。国家标准品的建立为药企、监督机构提供标准,而一级结构的表征可以使国家标准品获得更全面、更准确的信息<sup>[10]</sup>。因此本研究目的对英夫利西单抗活性候选国家标准品进行结构确证,为该国家标准品的研制提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品及试剂** 英夫利西单抗候选国家标准品(批号 330008)为中国食品药品检定研究院(中检院)自制;碳酸氢铵(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>,纯度 $\leq$ 100%,LC-MS级,Merck公司)、乙腈(ACN,纯度 $\geq$ 99.9%,LC-MS级,Fisher Scientific公司)、氨水(纯度 $\geq$ 25%,LC-MS级,Fluka公司)、超纯水(18.2 M $\Omega$   $\times$  cm, 25  $^{\circ}$ C, Millipore公司)、二硫苏糖醇(DTT,纯度 $\geq$ 99.0%,上海博光生物科技有限公司)、碘乙酸钠(MIA,纯度 $\geq$ 98%,Sigma公司)、乙二胺四乙酸(纯度 $\geq$ 99.5%,AR,国药集团化学试剂有限公司)、甲酸铵(NH<sub>4</sub>FA,纯度 $\geq$ 99.0%,LC-MS级,Merck公司)、甲酸(FA,纯度 $\geq$ 99.0%,LC-MS级,Thermo公司)、胰蛋白酶(Trypsin酶,16.5 mg  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,上海迈泰君奥生物技术有限公司)、组氨酸(上海协和氨基酸有限公司)、盐酸胍(AR级,纯度 $\geq$ 99.0%,国药集团化学试剂有限公司)。

**1.1.2 仪器耗材** ACQUITY BioAccord LC-MS 超高效液相色谱仪(配备电喷雾电离源,ESI源),液相

色谱分析色谱柱为 ACQUITY UPLC Protein BEH C<sub>4</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), XEVO G2-S Q-TOF 高分辨质谱仪(配备 ESI 源), 质量肽图分析色谱柱为 ACQUITY UPLC Peptide BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 均购自 Waters 公司。AKTA avant 蛋白纯化仪(avant 150, GE 公司)、超滤离心管(10 KD/30 KD/50 KD, Millipore 公司)、G25 脱盐柱(5 mL, GE Healthcare 公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 英夫利西单抗候选国家标准品完整相对分子质量分析** 使用移液器将待处理样品转移至 10 KD 超滤离心管中, 并使用 50 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液(pH 8.0) 置换 3~6 次, 保证置换后样品浓度在 5 mg · mL<sup>-1</sup> 以上。将置换后的样品用 50 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.0) 溶液稀释至 1 μg · μL<sup>-1</sup> 左右; 室温下样品经过 17 000 g, 离心 10 min, 小心吸取上清至清洁的进样小瓶中等待上机检测。色谱柱: ACQUITY UPLC Protein BEH C<sub>4</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A1: 含 0.1%FA 的水溶液; 流动相 A2: 超纯水; 流动相 B1: 含 0.1%FA 的 ACN 溶液; 流动相 B2: ACN; 流速: 0.4 mL · min<sup>-1</sup>; 主洗脱梯度为 0~12 min, 10% B1 → 95% B1; 紫外检测波长: 280 nm; 柱温: 80 °C; 进样体积: 10 μL。质谱参数: 正离子全扫描 Full scan; 扫描范围: *m/z* 400~7 000。使用 UNIFI 软件(1.9 版本, Waters 公司)对采集的数据进行解卷积处理, 添加 N 端焦谷氨酸环化、N-糖基化、末端赖氨酸截除等翻译后修饰后使用理论分子量和实测分子量进行匹配, 分子量允许误差范围为理论分子量 ± 50。

**1.2.2 英夫利西单抗候选国家标准品轻重链分析** 使用移液器将待处理样品转移至 10 KD 超滤离心管中, 并使用 50 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液(pH 8.0) 置换 3~6 次, 保证置换后样品浓度在 5 mg · mL<sup>-1</sup> 以上。将置换后的样品用 50 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 8.0) 溶液稀释至 0.5 μg · μL<sup>-1</sup> 左右; 向样品溶液中加入还原剂 DTT, 使终浓度为 50 mmol · L<sup>-1</sup>, 混匀后 37 °C 孵育 10 min; 室温下样品经过 17 000 g, 离心 10 min, 小心吸取上清至清洁的进样小瓶中等待上机检测。色谱柱: ACQUITY UPLC Protein BEH C<sub>4</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A1: 含 0.1%FA 的水溶液; 流动相 A2: 超纯水; 流动相 B1: 含 0.1%FA 的 ACN 溶液; 流动相 B2: ACN; 流速: 0.4 mL · min<sup>-1</sup>; 主洗脱梯度为 0~12 min, 10% B1 → 95% B1。紫外检测波长: 280 nm; 柱温: 80 °C; 进样体积: 10 μL。质谱参数: 正离子全

扫描 Full scan; 扫描范围 *m/z* 400~7 000。使用 UNIFI 软件(1.9 版本)对采集的数据进行解卷积处理, 添加 N 端焦谷氨酸环化、N-糖基化、末端赖氨酸截除等翻译后修饰后使用理论分子量和实测分子量进行匹配, 分子量允许误差范围为理论分子量 ± 50。

**1.2.3 英夫利西单抗候选国家标准品肽图分析** 取检测样品(浓度 > 5 mg · mL<sup>-1</sup>) 500 μg, 加入 8 mol · L<sup>-1</sup> 盐酸胍 375 μL 以及 1 mol · L<sup>-1</sup> DTT, 使 DTT 终浓度为 15 mmol · L<sup>-1</sup>, 补充 pH 6.0 的甲酸铵(NH<sub>4</sub>FA) 缓冲液至样品总体积为 500 μL, 37 °C 孵育 1 h; 加入碘乙酸钠, 始终浓度为 50 mmol · L<sup>-1</sup>, 混匀, 室温避光孵育 45 min; 加入 1 mol · L<sup>-1</sup> DTT, 使终浓度为 35 mmol · L<sup>-1</sup> 以终止烷基化, 混匀后进行脱盐; 将 AKTA avant 蛋白纯化仪上设置 Alam system puressure High 和 Alam pre column pressure High 为 0.5 MPa, Delta C 为 0.3 MPa, 并使用超纯水 75 mL 冲洗系统, 在选中柱位上安装 5 mL G25 预装脱盐柱, 5 mL · min<sup>-1</sup> 流速超纯水冲洗色谱柱 5~10 min, 将管路放入 50 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 溶液(pH 8.0) 中, 待电导缓慢升起走平后接 500 μL 上样环, 用 1 mL 注射器吸取缓冲液连续冲洗 3 次, 然后用注射器吸取样品并打入上样环, Inject 模块由 injection valve 改为 inject, 同时流速降为 2 mL · min<sup>-1</sup> 并且紫外归零, 收集 280 nm 紫外吸收峰, 收峰阈值设定为 100 mAU, 样品最终脱盐至 pH 8.0 的 50 mmol · L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 缓冲液中, 检测脱盐后的样品浓度, 应为 0.2~0.4 mg · mL<sup>-1</sup> (如低于此区间浓度进行浓缩处理); 取脱盐后样品 200 μL, 按样品-酶(10:1, w/w) 加入 Trypsin 酶。37 °C 水浴 2~4 h; 向酶切后的样品中加入甲酸, 使终浓度 0.5%~1.0%, 终止酶切反应。室温下样品经过 17 000 g, 离心 10 min, 吸取上清。色谱柱: ACQUITY UPLC Peptide BEH C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A: 含 0.1%FA 水溶液; 流动相 B: 含 0.1%FA 的 ACN 溶液; 流速: 0.2 mL · min<sup>-1</sup>; 主洗脱梯度为 2~82 min, 1% B → 37% B。紫外检测波长: 214 nm; 柱温 45 °C; 进样体积 10 μL。质谱参数: 采集模式: ESI+、Resolution、MS<sup>2</sup>; 扫描范围: *m/z* 50~1 990; 毛细管电压: 3.00 kV; 锥孔电压: 40 V; 偏置电压: 80 V; 源温度: 120 °C; 脱溶剂温度: 450 °C; 锥孔气流速: 100 L · h<sup>-1</sup>; 脱溶剂气流速: 800 L · h<sup>-1</sup>。使用 UNIFI 软件(1.9 版本)对采集的数据进行解卷积处理, 添加烷基化、N 端焦谷氨酸环化、N-糖基化、末端赖氨酸截除、氧化等翻译后修饰后对其相对分子质量进行匹配, 一级质谱分子量允差范围为 ± 30, 二级

碎片允差范围为  $\pm 10$ , b/y 离子碎片数量  $\geq 5$ 。

**1.2.4 英夫利西单抗候选国家标准品二硫键分析** 取待检测样品(浓度大于  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,若小于则进行浓缩)  $500 \mu\text{g}$ ,依次加入  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸胍  $375 \mu\text{L}$ ,补充甲酸铵缓冲液(pH 6.0)至总体积为  $491.3 \mu\text{L}$ ,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 1 h;加入  $2.9 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的碘乙酸钠溶液  $8.70 \mu\text{L}$ ,避光孵育 45 min。将 AKTA avant 蛋白纯化仪上设置 Alam system puressure High 和 Alam pre column pressure High 为  $0.5 \text{ MPa}$ , Delta C 为  $0.3 \text{ MPa}$ ,并使用  $75 \text{ mL}$  超纯水冲洗系统,在选中柱位上安装  $5 \text{ mL G25}$  预装脱盐柱,  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  流速超纯水冲洗色谱柱  $5\sim 10 \text{ min}$ ,将管路放入  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$  溶液(pH 8.0)中,待电导缓慢升起走平后接  $500 \mu\text{L}$  上样环,用  $1 \text{ mL}$  注射器吸取缓冲液连续冲洗 3 次,然后用注射器吸取样品并打入上样环,Inject 模块由 injection valve 改为 inject,同时流速降为  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,紫外归零,收集  $280 \text{ nm}$  紫外吸收峰,收峰阈值设定为  $100 \text{ mAU}$ ,样品最终脱盐至 pH 8.0 的  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$  缓冲液中,检测脱盐后的样品浓度,应为  $0.2\sim 0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (如低于此区间浓度进行浓缩处理);取  $200 \mu\text{L}$  脱盐后样品,按样品-酶( $10:1 \text{ w/w}$ ),加入 Trypsin 酶。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴孵育  $2\sim 4 \text{ h}$ ,向酶切后的样品中加入甲酸,使终浓度  $0.5\%\sim 1.0\%$ ,终止酶切反应;室温下样品经过  $17\ 000 \text{ g}$ ,  $10 \text{ min}$  离心后,吸取上清。色谱柱:Acquity BEH  $\text{C}_{18}$ ( $1.7 \mu\text{m}$ ,  $2.1 \times 100 \text{ mm}$ );流动相 A:含  $0.1\% \text{ FA}$  的水溶液;流动相 B:含  $0.1\% \text{ FA}$  的 ACN 溶液;流速:  $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ;洗脱梯度为  $2\sim 82 \text{ min}$ ,  $1\% \text{ B1} \rightarrow 37\% \text{ B1}$ 。检测波长:  $214 \text{ nm}$ ;柱温:  $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ;进样

体积:  $10 \mu\text{L}$ 。质谱参数:采集模式:ESI+、Resolution、 $\text{MS}^e$ ;扫描范围:  $m/z$   $50\sim 1\ 990$ ;毛细管电压:  $3.00 \text{ kV}$ ;锥孔电压:  $40 \text{ V}$ ;偏置电压:  $80 \text{ V}$ ;源温度:  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ ;脱溶剂温度:  $450 \text{ }^\circ\text{C}$ ;锥孔气流速:  $100 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ ;脱溶剂气流速:  $800 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。使用 UNIFI 软件(1.9 版本)对采集的数据进行解卷积处理,分析模式调整为二硫键匹配,一级质谱分子量允差范围为  $\pm 30$ ,二级碎片允差范围为  $\pm 10$ , b/y 离子碎片数量  $\geq 5$ 。

## 2 结果

### 2.1 英夫利西单抗候选国家标准品完整相对分子质量分析

取未脱糖的标准品采用 LC-MS 进行完整蛋白质质量检测,检测数据通过使用 Waters 公司的 UNIFI 软件进行分析,并且根据去卷积图谱进行分子量确认。结果显示(表 1、图 1),英夫利西单抗候选标准品的实测分子质量为  $148\ 515.16$ ,理论值为  $148\ 511.79$ ,相对误差  $22.7$ ,在仪器误差允许范围内,实测分子量与理论分子量相符合基本一致。此外,在完整蛋白水平上检测出其重要修饰组分为:C 末端赖氨酸截除(-K)及 G0F、G1F、G2F 等糖基化修饰为主。

表 1 英夫利西单抗候选标准品完整蛋白分子量

Tab. 1 Comparison of intact protein mass analysis of infliximab standard candidate

名称 (name)	实测分子量 (measured molecular mass)	理论分子量 (theoretical molecular mass)	相对误差 (relative error)
英夫利西候选标准品 (infliximab standard candidate)	148 515.16	148 511.79	22.7

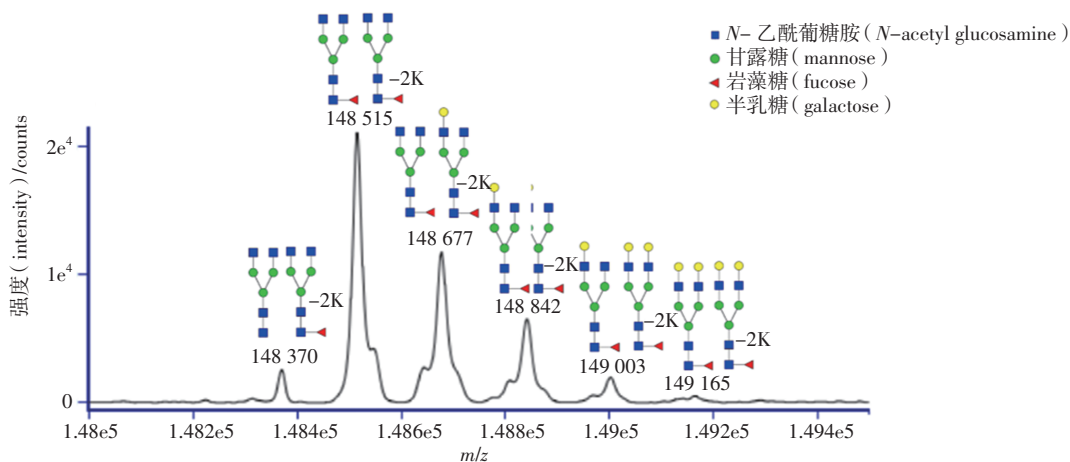


图 1 英夫利西单抗候选标准品完整蛋白去卷积连续质谱图

Fig. 1 Deconvolutional continuum mass spectrometry of the intact protein of the infliximab standard candidate

2.2 英夫利西单抗候选国家标准品轻重链亚基相对分子质量分析

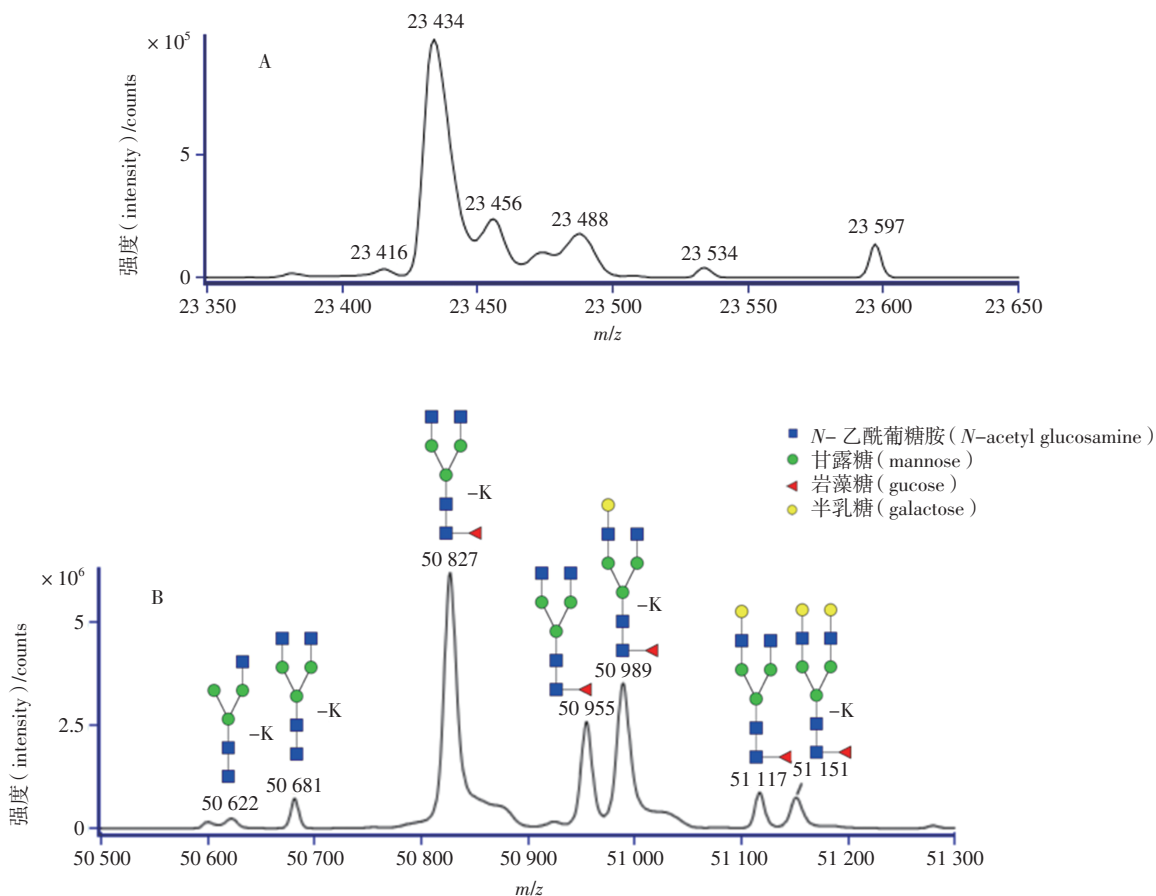
亚基水平分析结果显示(表2、图2),轻、重链主峰分子量均与理论分子量相符(重链修饰以C端-K,

G0F糖型为主)。对不同修饰质谱峰强度进行归一化计算,结果显示重链翻译后修饰(表3)的C端赖氨酸切除占比89.32%,此外还检测到少量非糖基化重链(NGHC)的存在。

表2 英夫利西单抗候选标准品轻重链亚基分子量

Tab. 2 Molecular weight of light and heavy chain subunits of of infliximab standard candidate

	LC-MS 精确分子量 (precise molecular weight)	理论分子量 (theoretical molecular weight)	相对误差 (relative error)
轻链 (light chain)	23 435.01	23 434.63	16.2
重链 (heavy chain)	50 827.34	50 825.30	40.1



A: 轻链 B: 重链

A: light chain B: heavy chain

图2 英夫利西单抗候选标准品去卷积连续质谱图

Fig. 2 Mass spectrometry of infliximab standard candidate after deconvolution

表3 英夫利西单抗候选标准品重链修饰类型及相对比例

Tab. 3 Heavy chain modification sites of infliximab standards candidate

名称 (name)	修饰 (modification) /%	
重链 (heavy chain)	-K	NGHC
	89.32	0.37

### 2.3 英夫利西单抗候选国家标准品肽图分析

肽图分析在单克隆抗体检验中作为关键质量属性分析方法之一,能在一次分析中同时获得一级序列覆盖率、二硫键位置、翻译后修饰等信息,形成特征性指纹图谱,在结构确证与特征性鉴别中发挥重要作用。

### 2.3.1 英夫利西单抗候选国家标准品序列覆盖率分析

通过变性、还原、烷基化、酶解等反应,按以上“1.2.3”项方法进行检测,得到轻、重链一级结构覆盖率。分析结果如图3所示,候选标准品的轻、重链序列覆盖率均为100%;该结果显示英夫利西单抗活性候选国家标准品氨基酸序列与理论氨基酸序列一致。

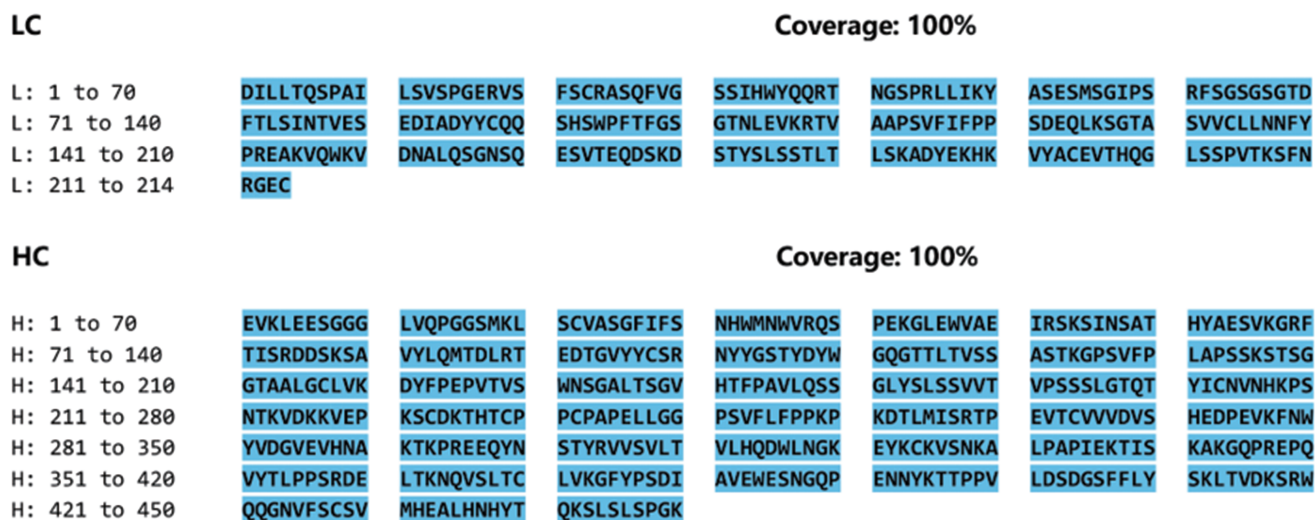


图3 英夫利西单抗候选标准品一级质谱覆盖率分析

Fig. 3 Secondary mass spectrometry of infliximab standard candidate

### 2.3.2 英夫利西单抗候选国家标准品 CDR 鉴定

互补决定区 (complementarity-determining region, CDR) 是抗体分子中可变区 (V 区) 的一部分,作为抗原结合的核心功能域,主要负责与抗原的结合。这些区域的氨基酸序列高度变异,使得每种抗体能够识别不同的抗原,同时也决定了抗体的特异性。每个抗体通常

有 3 对 H (重链) 和 L (轻链) 互补决定区,分别称为 CDR1、CDR2 和 CDR3。

本研究在质量肽图谱水平对该候选物的 CDR 区进行了分析 (表 4、图 4、表 5、图 5),结果显示英夫利西单抗候选国家标准品 CDR 区序列与理论序列相一致,该结果也为后续功能验证提供了可靠的分子基础。

表 4 轻链 CDR

Tab. 4 CDR of light chain

	CDR1	CDR2	CDR3
序列 (sequence)	QFVGSS	YAS	QQSHSWPFT
肽段位点 (peptide site)	L : T3	L : T6	L : T7
水解片段 (digested peptide)	ASQFVGSSSIHWYQQR	YASEMSGIPSR	FSGSGSGTDFTLTINTVESEDIADYQCQSHSWPFT FGSGTNLEVK
预期质量 (expected mass)	1 793.872	1 284.589	5 066.259
观测质量 (observed mass)	1 793.877	1 284.587	5 066.282
检测值 (observed) / (m/z)	598.631	642.797	1 267.326
保留时间 (retention time) / min	37.22	25.04	64.96

注 (note): 表中 L 代表轻链; H 代表重链; T 代表肽段; 例如: CDR1 对应的 L : T3 代表 CDR1 位于经胰蛋白酶酶切后轻链第 3 条肽段上 (L stands for light chain; H stands for heavy chain; T stands for peptide; L : T3 for CDR1 means that CDR1 is located on the third peptide of the light chain after trypsin cleavage)

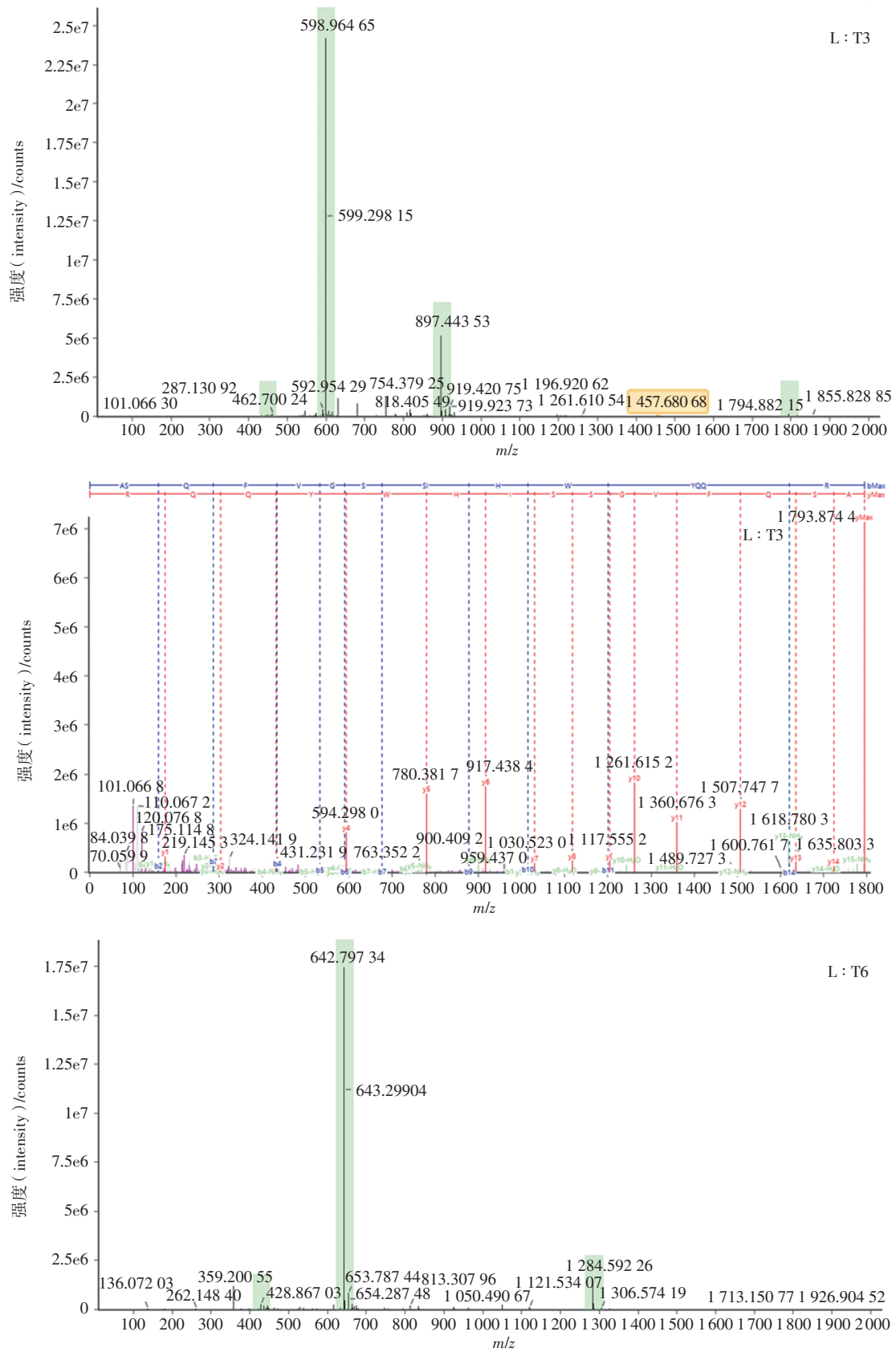


图 4 轻链 CDR 肽段一级质谱图与二级碎片质谱图  
Fig. 4 Primary mass spectrometry and secondary fragmentation mass spectrometry of the light chain CDR

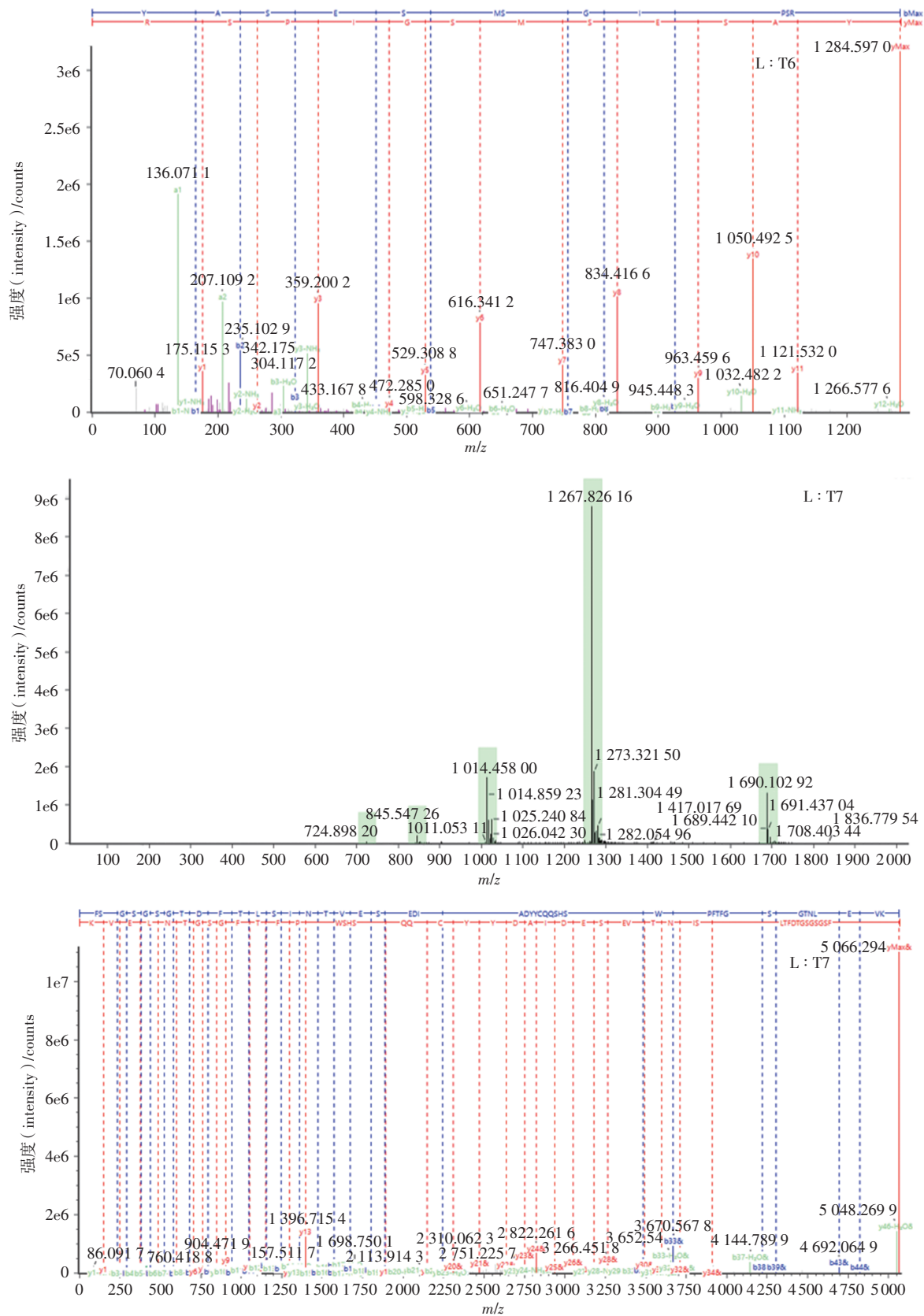


图4(续)  
Fig. 4 (continued)

表 5 重链 CDR 区

Tab. 5 CDR region of heavy chain

	CDR1	CDR2	CDR3
序列 (sequence)	GFIFSNHW	IRSKSINSAT	RNYYGSTYDY
肽段位点 (peptide site)	H : T3	H : T7	H : T13
水解片段 (digested peptide)	LSCVASGFIFSNHWMNWVR	SINSATHYAESVK	NYYGSTYDYWGQTTTLTVSSASTK
预期质量 (expected mass)/Da	2 311.090	1 406.691	2 650.194
观测质量 (observed mass)/Da	2 311.085	1 406.689	2 650.210
保留时间 (retention time)/min	61.50	23.03	44.23

注 (note): L 代表轻链; H 代表重链; T 代表肽段 (L stands for light chain; H stands for heavy chain; T stands for peptide)

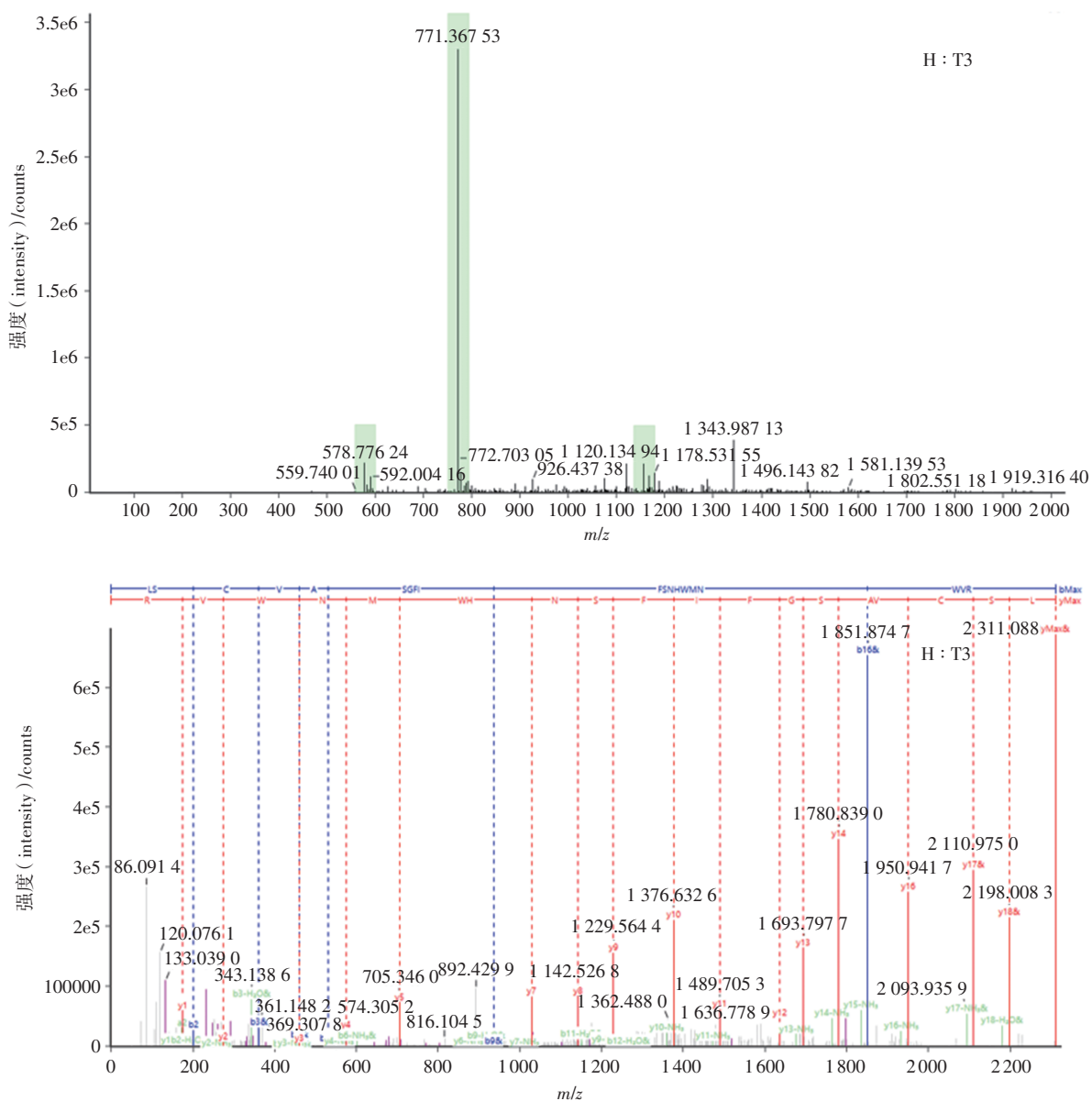


图 5 重链 CDR 一级质谱图与二级碎片质谱图

Fig. 5 Primary mass spectrometry and secondary fragmentation mass spectrometry of the heavy chain CDR

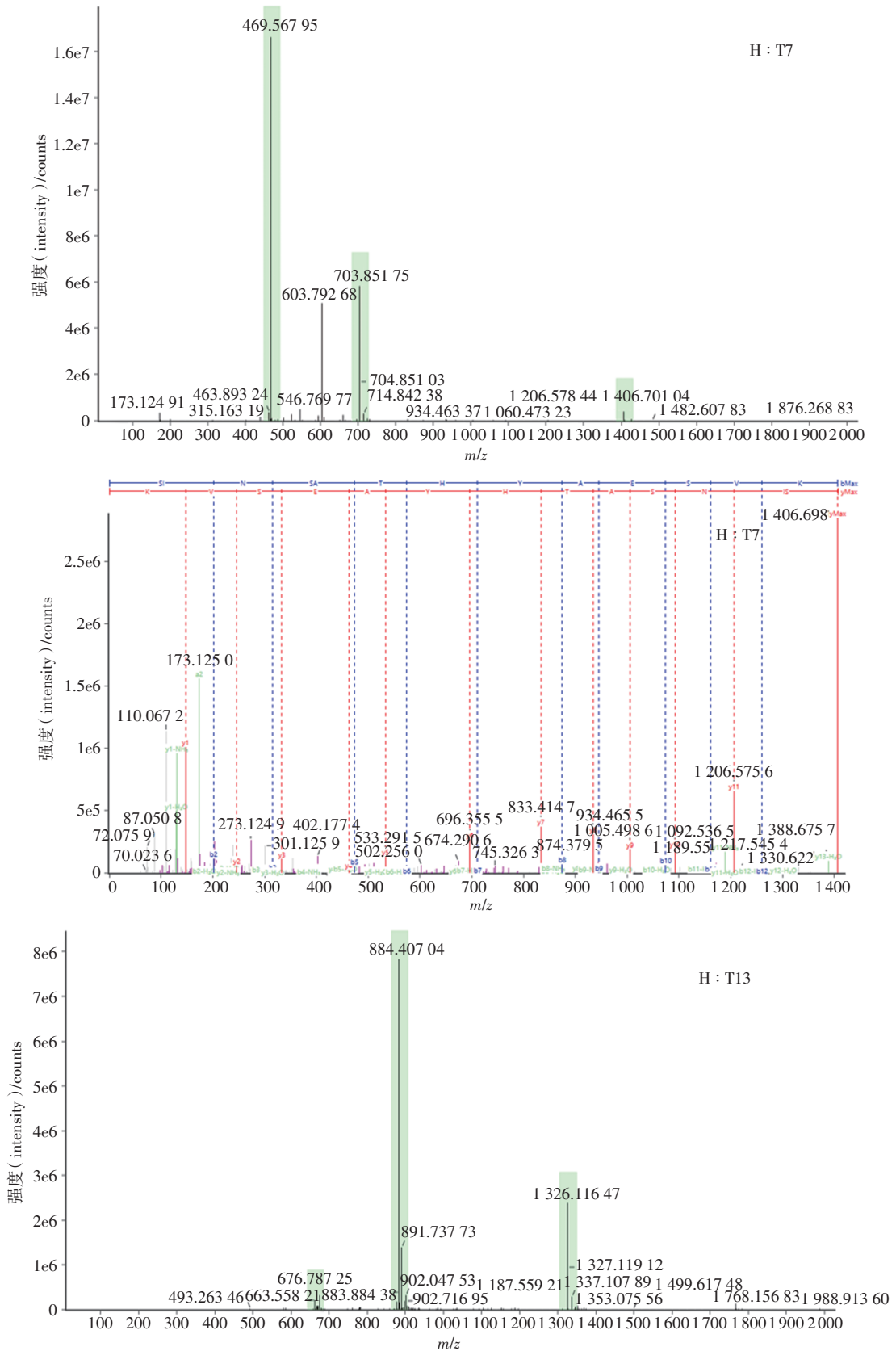


图 5 (续)

Fig. 5 (continued)

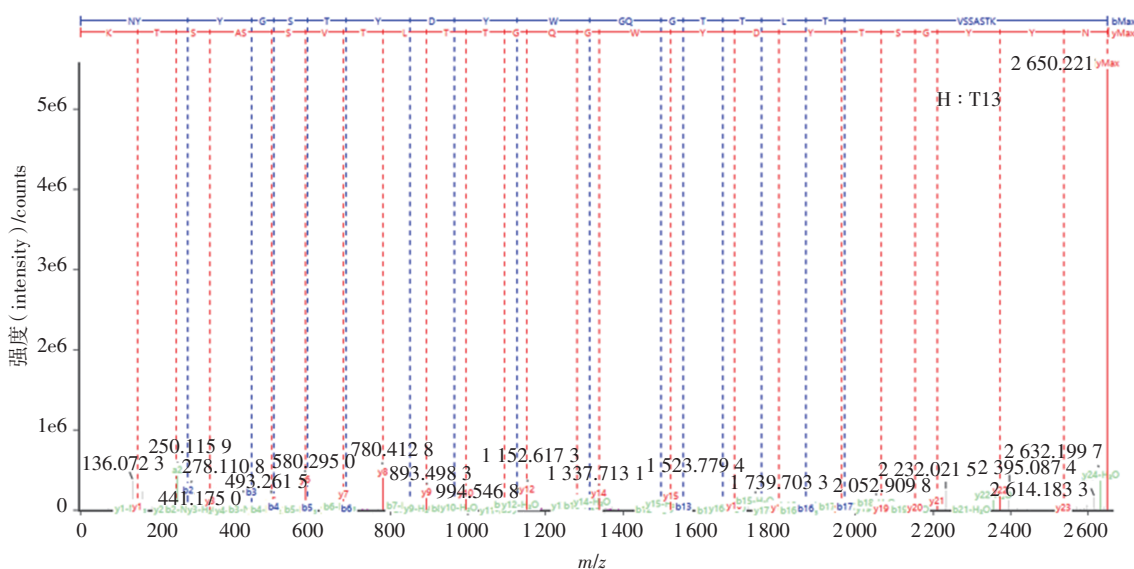


图 5(续)

Fig. 5 (continued)

2.3.3 英夫利西单抗候选国家标准品翻译后修饰 翻译后修饰 (PTMs) 会对抗体药物的结构与功能产生重要影响,原始质量肽图数据通过 UNIFI 软件分析、使用峰强度归一化进行计算,结果显示部分肽段产生氧化和脱酰胺翻译后修饰,其种类和相对含量结果汇

总如表 6、7,甲硫氨酸 (M) 氧化修饰分别在轻 / 重链中均能检测到;脱酰胺反应发生在重链天冬酰胺和谷氨酰胺残基上。此外在重链 N 端检测到 0.8% 的焦谷氨酸环化修饰 (表 8)。

表 6 英夫利西单抗候选标准品氧化修饰位点及比例

Tab. 6 Proportions and oxidative modification sites of infliximab standard candidate

修饰位点 (modification site)	L : T6 (M6)		H : T11 (M7)		H : T22 (M4)	
修饰 (modification)	无氧化 (no oxidation)	氧化 (oxidation)	无氧化 (no oxidation)	氧化 (oxidation)	无氧化 (no oxidation)	氧化 (oxidation)
肽段序列 (sequence of peptide)	YASEMSGIPSR		SAVYLQMTDLR		DTLMISR	
预期质量 (expected mass) /Da	1 284.589	1 300.584	1 296.662	1 312.657	835.434	851.429
观测质量 (observed mass) /Da	1 284.587	1 300.588	1 296.659	1 312.660	835.428	851.419
保留时间 (retention time) /min	25.04	18.69	41.88	32.27	26.73	22.53
占比 (proportions) /%	\	0.8	\	0.3	\	3.8

表 7 英夫利西单抗候选标准品脱酰胺修饰位点及比例

Tab. 7 Proportions and deamidation modification sites of infliximab standard candidate

修饰位点 (modification site)	H : T7 (N3)		H : T27 (N14)		H : T37 (N1)		H : T38 (N14)	
修饰 (modification)	无脱酰胺 (no deamidation)	脱酰胺 (deamidation)	无脱酰胺 (no deamidation)	脱酰胺 (deamidation)	无脱酰胺 (no deamidation)	脱酰胺 (deamidation)	无脱酰胺 (no deamidation)	脱酰胺 (deamidation)
肽段序列 (sequence of peptide)	SINSATHYAESVK		VVSVLTVLHQDWLNGK		NQVSLTCLVK		GFYPDIAVEWESNGQPENNYK	
预期质量 (expected mass) /Da	1 406.691	1 407.675	1 808.006	1 808.991	1 161.630	1 162.614	2 544.131	2 545.115
观测质量 (observed mass) /Da	1 406.689	1 407.667	1 808.012	1 808.986	1 161.626	1 162.608	2 544.137	2 545.104 4
保留时间 (retention time) /min	23.031	23.854	57.718	58.018	38.425	41.954	48.980	49.678
占比 (proportions) /%	\	5.9	\	31.5	\	1.4	\	19.4

注 (note): 表中 L 代表轻链; H 代表重链; T 代表肽段; L : T6 (M6) 代表该氧化位点位于经胰蛋白酶酶切后轻链由 N 端到 C 端的第 6 个肽段上第 6 个氨基酸 (甲硫氨酸) 上 (L indicates light chain; H indicates heavy chain; T indicates peptide; L : T6 (M6) indicates that the oxidation site is located on the sixth amino acid (methionine) in the sixth peptide segment from the N-terminal to the C-terminal end of the light chain after trypsin cleavage)

表 8 重链 N/C 端异质性

Tab. 8 N/C-terminal heterogeneity of the heavy chain

	between N/C	
	N 末端焦谷氨酸环化 (N-term pyroglutamic acid E) /%	C 端 K 缺失 (C-term-K) /%
Fd	0.8	\
Fc	\	87.6

2.3.4 英夫利西单抗候选国家标准品 N-糖基化位点 通过对比 PNGase F 酶切与非酶切肽图结果显

示,英夫利西单抗活性候选标准品的 N-糖基化发生在肽段 NXS/T (X 为非脯氨酸的其他任意氨基酸) 保守位点,糖基化修饰肽段为 EEQYNSTYR (图 6),糖基化发生在该肽段的天冬酰胺上。对该肽段使用糖苷酶 F 进行酶切处理,并对比酶切前后分子量之间的差异,结果显示,该肽段酶切前后具有 1 444 的分子量差异,与抗体中含量最高的糖型 G0F 糖型的分子量相匹配,再次证明了该肽段中具有糖基化修饰。

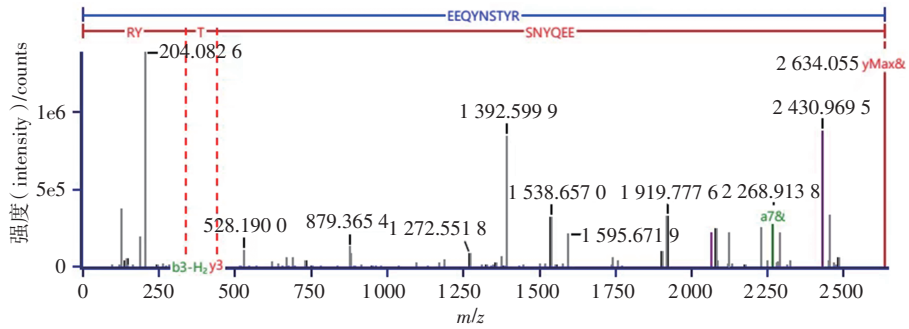


图 6 英夫利西单抗标准品糖基化位点

Fig. 6 Glycosylation sites of infliximab standard

2.3.5 英夫利西单抗候选国家标准品 N/C 端序列确认 氨基酸序列是蛋白质的一级结构的基础,《中华人民共和国药典》的质量控制中也指出单克隆抗体 N 末端序列验证的重要性。在经酶解之后,按上述

“1.2.3”项方法进行还原,样品经过 LC-MS/MS 检测后,结果显示(图 7),轻、重链 N 端及 C 端均与理论序列相一致。得到验证。

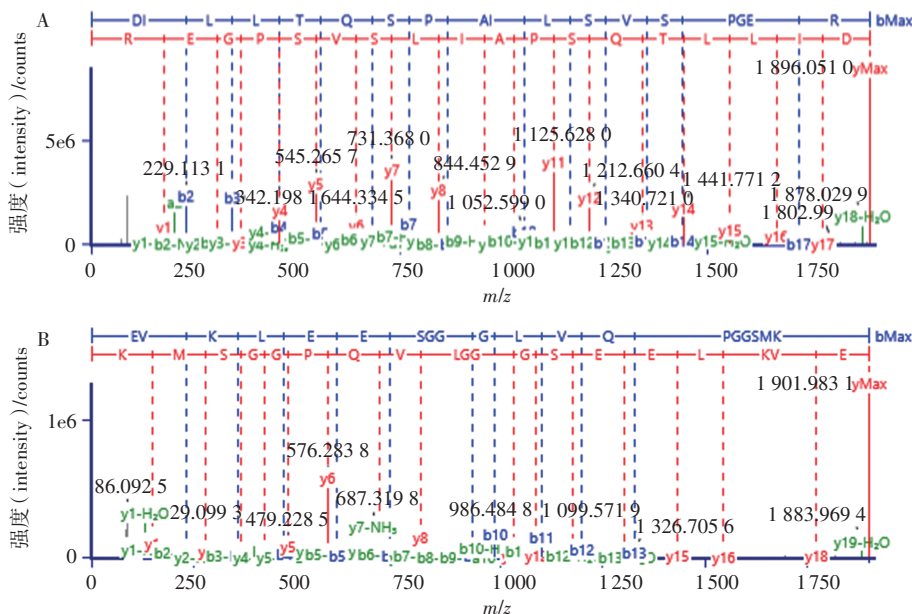


图 7 英夫利西单抗候选标准品 N/C 端位点分析

Fig. 7 Analysis of N/C sites of infliximab standard candidate

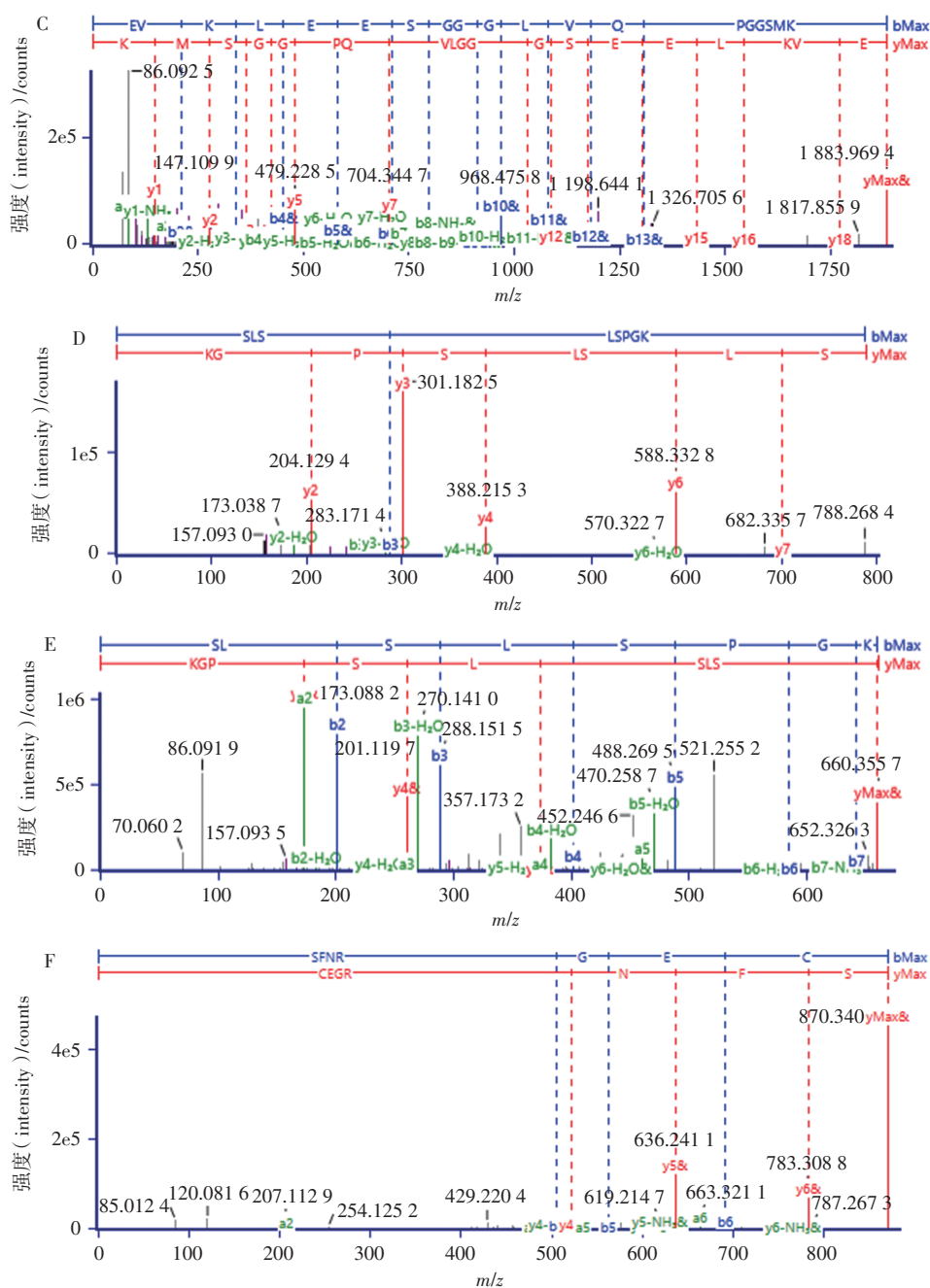


图7(续)

Fig. 7 (continued)

### 2.4 英夫利西单抗候选国家标准品二硫键分析

取英夫利西单抗国家标准品经 Trypsin 酶酶解后,进行非还原肽图检测,结果显示共有 16 对二硫键(表 9),2 条重链链内各 4 对,重链链间 2 对,2 条轻链链内各 2 对,2 组轻重链间各 1 对,分析得到的标准品二硫键符合 IgG1 抗体理论二硫键。

### 3 讨论

注射用英夫利西单抗上市多年以来,在治疗自身

免疫性疾病领域发挥了重要作用<sup>[11-12]</sup>。WHO 在《生物参考标准品的制备,表征和建立》(技术报告 932 号)技术报告中提到,开发和建立国际标准品在确保全球使用生物医药产品的质量和剂量一致性方面发挥了重要作用<sup>[13-14]</sup>。目前我国积极开展英夫利西单抗活性国家标准品的研制及表征工作。

在英夫利西单抗活性候选标准品表征中,一级结构的分析能确保序列准确性。本研究采用高分辨率

表 9 英夫利西单抗候选标准品二硫键位点分析

Fig. 9 Analysis of disulfide bond sites of infliximab standard candidate

位置 (site)	二硫键信息 (disulfide bond)			保留时间 (retention time)/min
	序号 (serial number)	理论二硫键 (theoretical disulfide bond)	对应肽段信息 (peptide information)	
轻链内 (light intra-chain)	轻链内第 1 对 (first pair in light chain)	L : C23-L : C88	LC : T2-LC : T7	62.02
	轻链内第 2 对 (second pair in light chain)	L : C134-L : C194	LC : T10-LC : T17	50.49
轻重链间 (inter light and heavy chain)	轻重链间 (interlight and heavy chain)	L : C214-H : C223	LC : T18-19-HC : T20	39.55
重链内 (heavy intra-chain)	重链内第 1 对 (first pair in heavy chain)	H : C22-H : C98	HC : T3-HC : T12	56.63
	重链内第 2 对 (second pair in heavy chain)	H : C147-H : C203	HC : T15-HC : T16	66.22
	重链内第 3 对 (third pair in heavy chain)	H : C264-H : C324	HC : T23-HC : T29	35.76
	重链内第 4 对 (fourth pair in heavy chain)	H : C370-H : C428	HC : T37-HC : T42	45.45
重链间 (heavy inter chain)	重链间 (heavy inter chain)	H : C229-H : C229 H : C232-H : C232	HC : T21-HC : T19-21	62.78

LC-MS 对其完整相对分子质量、轻重链检测,得到理论分子量与实际分子量相符合,未检测到氨基酸变异位点,证实此候选标准品正确表达,为后续结构与功能研究奠定基础<sup>[15-16]</sup>。肽图分析得到序列覆盖率、二硫键位置、糖基化位点等结构信息,其中二硫键位点鉴定中,是采用 Trypsin 酶对候选标准品酶切,通过质量肽图谱来确认二硫键的位置,对应位点的肽段能被检测到。二硫键的确证有效保证抗体分子的正确折叠以及正确三级结构的形成。

单抗药物作为 1 种生物大分子糖蛋白,本身具有复杂的糖链结构<sup>[17-19]</sup>,糖基化修饰分析结果显示,主要糖型与已知候选标准品特征糖型相符,包括特定的岩藻糖基化、半乳糖基化和唾液酸化等。糖基化的差异能导致药物在体内的药效发生改变,例如不同的岩藻糖基化水平与抗体依赖的细胞介导的细胞毒 (ADCC) 活性密切相关<sup>[20]</sup>。糖基化的有效控制是确保英夫利西单抗 Fc 效应功能的重要手段。

英国国家生物制品检定所 (NIBSC) 于 2019 年研制了首批国际英夫利西标准品<sup>[21]</sup>,欧洲药品质量管理局 (EDQM) 也研制了相应单抗的理化标准品和活性标准品<sup>[22]</sup>。在此基础上,我国也急需研制相应的英夫利西单抗活性标准品为药企、研发、监管等机构提供质量控制支撑<sup>[23]</sup>。本研究通过对英夫利西单抗活性候选国家标准品的完整相对分子质量、轻重链亚基相对分子质量、序列覆盖率、糖基化位点等进行分析来表征一级结构,为英夫利西单抗活性标准品的建立提供技术依据,为后续其他单抗品种的国家标准品研制提供可借鉴的思路。

#### 参考文献

- 付志浩,徐刚领,黄璟,等. 单克隆抗体药物研发进展[J]. 中国药事, 2021, 35(11): 1253  
FU ZH, XU GL, HUANG J, *et al.* Advances in the development of monoclonal antibody drugs[J]. *China Pharm Aff*, 2021, 35(11): 1253
- 陈宁,唐婧,李锦,等. 单克隆抗体药物的研究现状和热点分析[J]. 中国医院用药评价与分析, 2023, 23(1): 116  
CHEN N, TANG J, LI J, *et al.* Analysis of the research status and hot spots for monoclonal antibody drugs[J]. *Eval Anal Drug Use Hosp China*, 2023, 23(1): 116
- 杨翼. 中国药王 PK 世界药王「销售额 TOP 榜」[Z/OL]. (2024-05-25) [2024-08-20]. [https://mp.weixin.qq.com/s/tpx\\_AbgqqllgSoPCbue5bQ](https://mp.weixin.qq.com/s/tpx_AbgqqllgSoPCbue5bQ)  
YANG J. China's King of Pharmaceuticals PK World's King of Pharmaceuticals「Sales TOP List」[Z/OL]. (2024-05-25) [2024-08-20]. [https://mp.weixin.qq.com/s/tpx\\_AbgqqllgSoPCbue5bQ](https://mp.weixin.qq.com/s/tpx_AbgqqllgSoPCbue5bQ)
- FOBELO LOZANO MJ, SERRANO GIMENEZ R, SANCHEZ FIDALGO S. Therapeutic drug monitoring of infliximab in spondyloarthritis. A review of the literature[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2019, 85(10): 2264
- 耿庆迪. 英夫利西单抗与托珠单抗治疗中重度类风湿关节炎的疗效与安全性分析[D]. 济南: 山东大学, 2023  
GENG QD. Efficacy and Safety Analysis of Infliximab and Tolizumab in the Treatment of Moderate to Severe Rheumatoid Rthritis[D]. Jinan: Shandong University, 2023
- JANG D, LEE AH, SHIN HY, *et al.* The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in autoimmune disease and current TNF- $\alpha$  inhibitors in therapeutics[J]. *INT J MOL SCI*, 2021, 22(5): 2719
- 刘春雨,于传飞,武刚,等. 英夫利西单抗质量控制中的趋势分析[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 30  
LIU CY, YU CF, WU G, *et al.* Trend analysis in quality control of Infliximab[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(1): 30

- [ 8 ] ABOOBACKER S, AL ABOUD AM. Infliximab-abda [ M ]. Treasure Island ( FL ): StatPearls Publishing, 2023
- [ 9 ] 赵雪羽, 李萌, 武刚, 等. 以 CD79b 为靶点的抗体偶联药物的一级结构表征 [ J ]. 中国药学杂志, 2023, 58 ( 1 ): 33  
ZHAO XY, LI M, WU G, *et al.* Primary structure characterisation of antibody-coupled drugs targeting CD79b [ J ]. *Chin Pharm J*, 2023, 58 ( 1 ): 33
- [ 10 ] 朱文文, 李梦林, 张金兰. 单克隆抗体药物质量分析质谱技术研究进展 [ J ]. 药学学报, 2020, 55 ( 12 ): 2843  
ZHU WW, LI ML, ZHANG JL. Advances in mass spectrometry for quality analysis of monoclonal antibody drugs [ J ]. *Acta Pharm Sin*, 2020, 55 ( 12 ): 2843
- [ 11 ] 周培, 沈玉婷, 沈卫东. 英夫利西单抗治疗克罗恩病的疗效及安全性分析 [ J ]. 系统医学, 2023, 8 ( 3 ): 119  
ZHOU P, SHEN YT, SHEN WD. Efficacy and safety analysis of Infliximab in the treatment of Crohn's disease [ J ]. *Syst Med*, 2023, 8 ( 3 ): 119
- [ 12 ] SMOLEN JS, EMERY P. Infliximab: 12 years of experience [ J ]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13: 1
- [ 13 ] WHO. Recommendations for the Preparation, Characterization and Establishment of International and Other Biological Reference standards [ EB/OL ]. ( 2006-10-20 ) [ 2022-06-13 ]. <https://www.who.int/publications/m/item/annex-2-trs-no-932>
- [ 14 ] WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Seventy-ninth Report. Geneva: World Health Organization [ EO/OL ]. ( 2024-08-05 ) [ 2024-10-20 ]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240097971>
- [ 15 ] 李佳婧, 温学美, 刘菊, 等. LC-MS/MS 在线部分还原法快速表征雷珠单抗一级结构 [ J ]. 中国医药工业杂志, 2023, 54 ( 11 ): 1624  
LI JJ, WEN XM, LIU J, *et al.* Rapid characterisation of the primary structure of ranibizumab by LC-MS/MS on-line partial reduction [ J ]. *Chin J Pharm*, 2023, 54 ( 11 ): 1624
- [ 16 ] 曹丽梅, 刘明理, 袁伟媛, 等. 国家药品标准物质在生物制品质量控制中的应用 [ J ]. 中国生物制品学杂志, 2019, 32 ( 9 ): 1054  
CAO LM, LIU ML, YUAN WY, *et al.* Application of national drug standard substances in quality control of biological products [ J ]. *Chin J Biol*, 2019, 32 ( 9 ): 1054
- [ 17 ] 徐梦娇, 刘涛, 徐进, 等. 英夫利西单抗糖化方法开发验证及其在抗体药物中的普适性 [ J ]. 聊城大学学报 ( 自然科学版 ), 2024, 37 ( 5 ): 155  
XU MJ, LIU T, XU J, *et al.* Validation of Infliximab glycation method development and its generalisation to antibody drugs [ J ]. *J Liaocheng Univ ( Nat Sci Ed )*, 2024, 37 ( 5 ): 155
- [ 18 ] 王福贵, 刘涛, 李锦豪, 等. 多糖基化位点抗体药物质控中基于单四级杆的多属性分析方法开发与验证 [ J ]. 聊城大学学报 ( 自然科学版 ), 2024, 37 ( 5 ): 169  
WANG FG, LIU T, LI JH, *et al.* Development and validation of a single quadrupole-based multi-attribute analysis method for quality control of antibody drugs with multiple glycosylation sites [ J ]. *J Liaocheng Univ ( Nat Sci Ed )*, 2024, 37 ( 5 ): 169
- [ 19 ] XU MJ, LIU T, XU J, *et al.* Rapid mass spectrometry-based multiattribute method for glycation analysis with integrated afucosylation detection capability [ J ]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2024, 35 ( 8 ): 1669
- [ 20 ] 朱文文. 基于质谱技术曲妥珠单抗等三种药物结构表征与杂质分析新方法研究 [ D ]. 北京: 中国医学科学院, 2021  
ZHU WW. A New Method for Structural Characterisation and Impurity Analysis of Trastuzumab and Three Other Drugs based on Mass Spectrometry [ D ]. Beijing: Chinese Academy of Medical Sciences, 2021
- [ 21 ] NIBSC. WHO International Standard 1st International Standard for Infliximab 16/170 [ EB/OL ]. ( 2019-01-15 ) [ 2024-10-23 ]. [https://nibsc.org/products/brm\\_product\\_catalogue/detail\\_page.aspx?catid=16/170](https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=16/170)
- [ 22 ] EDQM. Information Leaflet Ph. Eur. Reference Standard Infliximab BRP batch1 [ EB/OL ]. ( 2021-10-04 ) [ 2024-10-23 ]. <https://crs.edqm.eu/db/4DCGI/search?vSelectName=1&vContains=1&vtUserName=Infliximab&OK=Search&vTypeCRS=>
- [ 23 ] 王一平, 梁争论, 毛群颖. WHO 国际疫苗标准物质和中国国家疫苗标准物质的研究进展 [ J ]. 微生物学免疫学进展, 2024, 52 ( 3 ): 71  
WANG YP, LIANG ZL, MAO QY. Research progress of WHO international vaccine standard material and Chinese national vaccine standard material [ J ]. *Prog Microbiol Immunol*, 2024, 52 ( 3 ): 71

( 本文于 2024 年 11 月 11 日收到 )