

平台化高通量 pH 梯度阳离子色谱法在单克隆抗体电荷异质性分析中的应用研究^{*}

李纲¹, 张一帆^{1,2}, 陈奔¹, 曹雪梅¹, 苏勇^{1**}

(1. 上海复旦张江生物医药股份有限公司, 上海 201210; 2. 复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

摘要 **目的:** 建立应用 pH 梯度分离的高通量、平台化高效液相阳离子交换色谱法, 用于单克隆抗体电荷异质性分析。**方法:** 利用不同 pH 的三羟甲基氨基甲烷、咪唑、哌嗪缓冲液组成 pH 梯度进行梯度洗脱, 采用相同色谱柱、流动相和分离梯度对不同等电点的单抗进行分离。**结果:** 用该法对美国药典收录的 3 种单抗—贝伐珠单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗进行检测, 并与对应各论中记载的盐梯度方法比较, 结果显示 3 种单抗主峰与酸区、碱区的分离度均有改善, 贝伐珠单抗分离度分别提高了 44% 和 500%; 曲妥珠单抗分离度分别提高了 83% 和 233%; 利妥昔单抗酸区分离度由无法给出提高到 0.7, 碱区分离度提高了 10%。针对贝伐珠单抗的方法进行再次优化(提高 40% 通量)并开展方法学验证。结果显示方法专属性良好, 高温破坏后可观察到酸区和碱区杂质均有趋势性增加; 精密度良好, 重复性实验中主峰保留时间 RSD 为 0.12%, 中间精密度实验中酸区、主峰、碱区百分比峰面积 RSD 均小于 2%; 准确度良好, 酸区、主峰、碱区在 5 个不同的浓度级别中回收率总体平均值分别为 100.4%, 101.0%, 101.4%; 线性良好, 蛋白含量 0.8~1.2 mg·mL⁻¹ 范围内酸区、主峰、碱区峰面积均与样品浓度呈线性关系, 主峰与碱区线性相关系数 R^2 均大于 0.999, 酸区 R^2 为 0.988; 耐用性良好, 检测条件发生一定变化时, 酸区、碱区和主峰的百分比峰面积测定 RSD 均小于 3%。**结论:** 建立的平台化 pH 梯度方法适用于不同单抗的电荷异质性分析, 且具有良好的分离度, 为单抗的研究和开发提供了一种通量更高的分离手段和分析方法。**关键词:** 生物类似药; 单克隆抗体; 电荷异质性; 高通量分析; 阳离子交换色谱法; 贝伐珠单抗; 曲妥珠单抗; 利妥昔单抗

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2018)02-0293-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2018.02.15

The application of a high-throughput pH gradient cation-exchange chromatography method for charge variants separation of multiple monoclonal antibodies^{*}

LI Gang¹, ZHANG Yi-fan^{1,2}, CHEN Ben¹, CAO Xue-mei¹, SU Yong^{1**}

(1. Shanghai Fudan-zhangjiang Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201210, China;

2. School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract **Objective:** To apply a high-throughput pH gradient-based ion-exchange chromatography method for the charge variants separation of several monoclonal antibodies. **Methods:** The buffer system consisted of tris,

^{*} 上海市“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目(15431905800)

^{**} 通信作者 Tel: (021) 58953355-1303; E-mail: ysu@fd-zj.com

第一作者 李纲 Tel: 181 0189 6956; E-mail: karolinska.li@hotmail.com

张一帆 Tel: (021) 58953355-3314; E-mail: yifzhang@fd-zj.com

imidazole and piperazine. Each buffer was adjusted to different pH, respectively. A pH gradient method was used to separate MABs with different pI values. **Results:** Three MABs including bevacizumab, trastuzumab and rituximab, which were collected in USP Medicines Compendium, were separated and compared with their original salt-gradient method results. Results indicated that the resolution of acidic variants and basic variants were improved among all MABs. In the case of bevacizumab, resolution improvements were 44% and 500%, respectively, and 83%, 233% in trastuzumab, it is slightly better in the case of rituximab. The method was further improved for bevacizumab separation and validated. Separation time was shortened by 40%. The results of specificity test showed that variants were positively correlated with heating time, repeatability test showed that the RSD of retention time of main peak is 0.12%, inter-mediate test showed that the RSD of area percentage was less than 2%. Accuracy test showed that the overall recovery of variants and main peak were 100.4%, 101.0%, and 101.4%, respectively. Linearity test showed that the linearity of variants and main peak was around 0.99. The method is robust if the chromatography condition deviate slightly, the RSD of variants and main peak were less than 3%. **Conclusion:** The pH gradient-based cation-exchange chromatography method is applicable for MABs with different pI values, which provides a higher throughput and better separated analysis approach for monoclonal antibody study and development.

Keywords: biosimilars; monoclonal antibody (MAB); charge heterogeneity; high flux analysis; cation-exchange chromatography; bevacizumab; trastuzumab; rituximab

当单克隆抗体(单抗, mAb)处在水相体系中,通常会产生带电极性氨基酸。它们与溶液中的物质产生分子间相互作用,表面残基会发生多种化学或酶修饰,从而使得单抗变成一种带有轻微静电差异的电荷异质性混合物^[1-3]。在生物制药行业中,离子交换色谱(ion-exchange chromatography, IEC)作为治疗性单抗产品电荷异质性分析的“金标准”被广泛应用^[2,4-7]。

传统的盐梯度 IEC 方法是产品特异性的,对于不同的抗体需要开发不同的方法^[8],对于需要同时开发多个品种的企业或检测机构工作意味着负荷高、通量低、效率差等问题,并且分离度往往无法令人满意^[9]。基因泰克公司于 2009 年发表了采用 pH 梯度进行 IEC 分析的第一篇报道^[10],经过改进和进一步发展,该方法已经很好地替代传统的盐梯度分离方法^[11]。pH 梯度的 IEC 分析相较于传统盐梯度 IEC 分析的分离度更好,具备平台化分析的能力—即可用同一方法检测不同抗体;此外, pH 梯度的 IEC 分析方法对样品基质的耐受性很强^[12],且这种方法的良好分离并不主要受制于色谱柱长度,因此可通过使用更短色谱柱获得更高通量。

根据 2015 年 2 月 28 日国家食品药品监督管理总局发布的《生物类似药研发与评价技术指导原则(试行)》中关于“研究中应尽可能使用敏感的、先进的分析技术和方法检测候选药与参照药之间可能存在的差异”的要求,本研究利用 pH 梯度 IEC 方法对

贝伐珠单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗这 3 种已被广泛研究和开发的抗体进行了初步分析,并与美国药典(USP)各论中记载的盐梯度方法进行比较。然后以贝伐珠单抗为例,研究了进一步提高分析通量的思路与方法,并进行方法学验证。

1 仪器、供试品和材料

1.1 仪器

高效液相色谱系统采用 Waters Acuity Arc 液相色谱系统。

1.2 供试品

mAb1、mAb2 和 mAb3 为上海复旦张江生物医药股份有限公司经由中国仓鼠卵巢细胞(CHO)所表达的单克隆抗体,这些单抗的等电点(pI)采用 Beckman Coulter 公司的 cIEF 试剂盒并参考标准操作规程进行测定。贝伐珠单抗(Bevacizumab, 商品名 Avastin[®], 批号 H0144)、曲妥珠单抗(Trastuzumab, 商品名 Herceptin[®], 批号 N3661)、利妥昔单抗(Rituximab, 商品名 Rituxan[®], 批号 H0151)均购自 Roche 公司。

1.3 材料

羧肽酶 B(Carboxypeptidase B, CpB)购自 Roche 公司;三羟甲基氨基甲烷、咪唑、哌嗪、磷酸钠、磷酸、氯化钠、MES、氢氧化钠均购自 Sigma 公司;色谱柱为 Thermo 公司弱阳离子色谱柱 ProPac[™] WCX-10(10 mm, 4 mm × 250 mm)。

2 方法

2.1 样品处理

用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠缓冲液 (pH 6.6) 将不同 MAb 分别稀释至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后按照 CpB 与样品质量比例 1 : 20 加入 CpB ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行酶切, 37°C 孵育 2 h。

2.2 液相色谱条件

2.2.1 平台化 pH 梯度方法 采用三元流动相, 其中流动相 A 为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 哌嗪水溶液, 用盐酸溶液调 pH 至 5.0, 流动相 B 为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑、 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 哌嗪水溶液, 流动相 C 为 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液, 分离梯度为 0 min, 0% 流动相 B 和 0% 流动相 C; 2 min, 0% 流动相 B 和 0% 流动相 C; 60 min, 96.8% 流动相 B 和 3.2% 流动相 C; 64 min, 96.8% 流动相 B 和 3.2% 流动相 C; 65 min, 0% 流动相 B 和 0% 流动相 C; 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 色谱柱温度 25°C , 样品室温控 $2 \sim 8^\circ\text{C}$, 进样体积 $40 \mu\text{L}$ 。经过初次实验后, 可根据单抗 pI 值的不同, 提高起始流动相 B 和流动相 C 的比例以提高通量, 原则是单位时间内流动相变化速率恒定。

2.2.2 贝伐珠单抗盐梯度检测方法 参考 USP, 流动相 A 为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠水溶液, 用磷酸调 pH 至 6.6, 流动相 B 为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液, 用磷酸调 pH 至 6.6, 分离梯度为在 50 min 内流动相 B 由 30%~70%, 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 色谱柱温度 25°C , 样品室温控 8°C , 进样体积 $40 \mu\text{L}$, 分离方法总长 75 min, 色谱柱为 $4.6 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$; packing L53 (可选 Tosoh, TSKgel CM-STAT)。

2.2.3 曲妥珠单抗盐梯度检测方法 参考 USP, 流动相 A 为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠水溶液, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.5, 流动相 B 为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 7.5, 分离梯度为在 38 min 内流动相 B 由 0~30%, 流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 色谱柱温度 45°C , 样品室温控 8°C , 进样体积 $40 \mu\text{L}$, 分离方法总长 55 min, 色谱柱为 $4.6 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$; packing L53 (可选 Tosoh, TSKgel CM-STAT)。

2.2.4 利妥昔单抗盐梯度检测方法 参考 USP, 流动相 A 为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES 水溶液, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.0, 流动相 B 为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES, 0.4

$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液, 用氢氧化钠溶液调 pH 至 6.0, 分离梯度为在 85 min 内流动相 B 由 17%~45%, 流速 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 色谱柱温度 30°C , 样品室温控 5°C , 进样体积 $40 \mu\text{L}$, 分离方法总长 115 min, 色谱柱为 $4.0 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$; packing L53 (可选 Dionex, Pro Pac WCX-10)。

3 结果

3.1 平台化 pH 梯度分离结果

如图 1 所示, 用 pH 梯度分析单抗的电荷异质性的, 采用完全相同的条件 (色谱柱、流动相、分离梯度) 可以对 pI 显著不同的单抗的电荷异质性进行分析, 且具有良好的分离度, 酸性峰、碱性峰与主峰得到了良好的分离, 基线平稳。

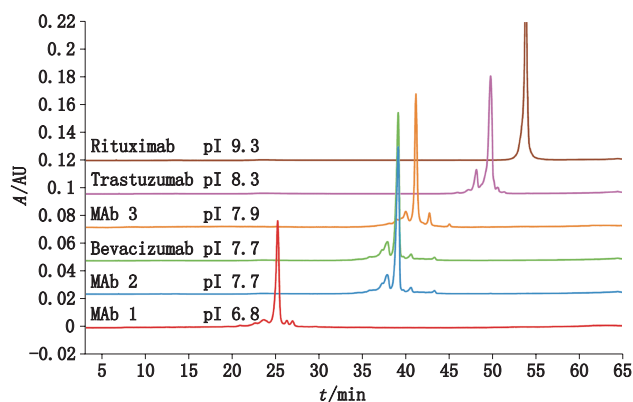


图 1 6 种不同 pI 单抗 pH 梯度分离结果

Fig. 1 The charge heterogeneity profiles of 6 MAbs with different pI values acquired by pH-IEC method

值得注意的是, pI 大于 9 的单克隆抗体的电荷异质性分析往往较难^[10], 可以看出通用型方法对于利妥昔单抗 (pI 9.3) 的分离也较差。可以利用四元泵的特性, 将 4 个流路放入不同的母液中, 自动混合出预期的流动相比比例 (此时流动相 A 为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑、 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 哌嗪水溶液, 用盐酸溶液调 pH 至 5.0; 流动相 B 为 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris、 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 咪唑、 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 哌嗪水溶液; 流动相 C 为 $500 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液; 流动相 D 为纯水), 仅改变梯度即可改善酸碱区与主峰的分离 (梯度条件见表 1, 分离图谱见图 2), 优化后的梯度条件 3 获得了最佳的分离效果, 显示出本方法良好的拓展性。

3.2 单抗盐梯度与 pH 梯度分离对比

采用传统盐梯度分析时, 不同单抗的分析需要配制不同的流动相、使用不同的色谱柱, 较为费时费力, 对于需要开发、检测多个品种的实验室,

表 1 利妥昔单抗优化分离液相条件

Tab. 1 LC conditions for improving rituximab separation

流动相梯度 (LC condition)	流路 (flow path)	流动相比例 (mobile phase ratio) /%					
		0.0 min	2.0 min	60.0 min	64.0 min	65.0 min	72.0 min
原始梯度 (original)	A	10.0	10.0	0.0	0.0	10.0	10.0
	B	0.0	0.0	9.7	9.7	0.0	0.0
	C	0.0	0.0	3.2	3.2	0.0	0.0
	D	90.0	90.0	87.1	87.1	90.0	90.0
梯度 1 (gradient 1)	A	10.0	10.0	0.0	0.0	10.0	10.0
	B	0.0	0.0	9.7	9.7	0.0	0.0
	C	0.0	0.0	9.6	9.6	0.0	0.0
	D	90.0	90.0	80.7	80.7	90.0	90.0
梯度 2 (gradient 2)	A	20.0	20.0	0.0	0.0	20.0	20.0
	B	0.0	0.0	19.4	19.4	0.0	0.0
	C	0.0	0.0	6.4	6.4	0.0	0.0
	D	80.0	80.0	74.2	74.2	80.0	80.0
梯度 3 (gradient 3)	A	20.0	20.0	0.0	0.0	20.0	20.0
	B	0.0	0.0	19.4	19.4	0.0	0.0
	C	0.0	0.0	12.8	12.8	0.0	0.0
	D	80.0	80.0	67.8	67.8	80.0	80.0
梯度 4 (gradient 4)	A	30.0	30.0	0.0	0.0	30.0	30.0
	B	0.0	0.0	29.0	29.0	0.0	0.0
	C	0.0	0.0	3.2	3.2	0.0	0.0
	D	70.0	70.0	67.8	67.8	70.0	70.0
梯度 5 (gradient 5)	A	30.0	30.0	0.0	0.0	30.0	30.0
	B	0.0	0.0	29.0	29.0	0.0	0.0
	C	0.0	0.0	9.6	9.6	0.0	0.0
	D	70.0	70.0	61.4	61.4	70.0	70.0

注 (note): 梯度流速均为 1 mL · min⁻¹ (the flow rates of gradient were 1 mL · min⁻¹)

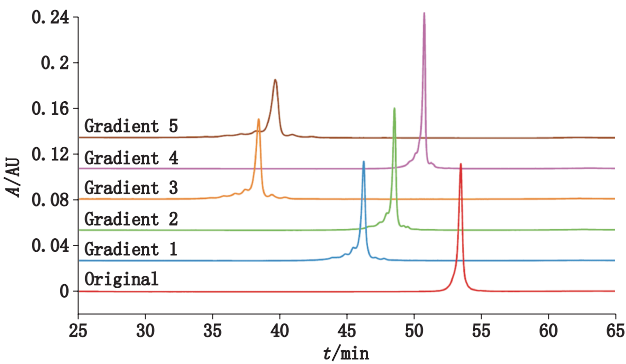


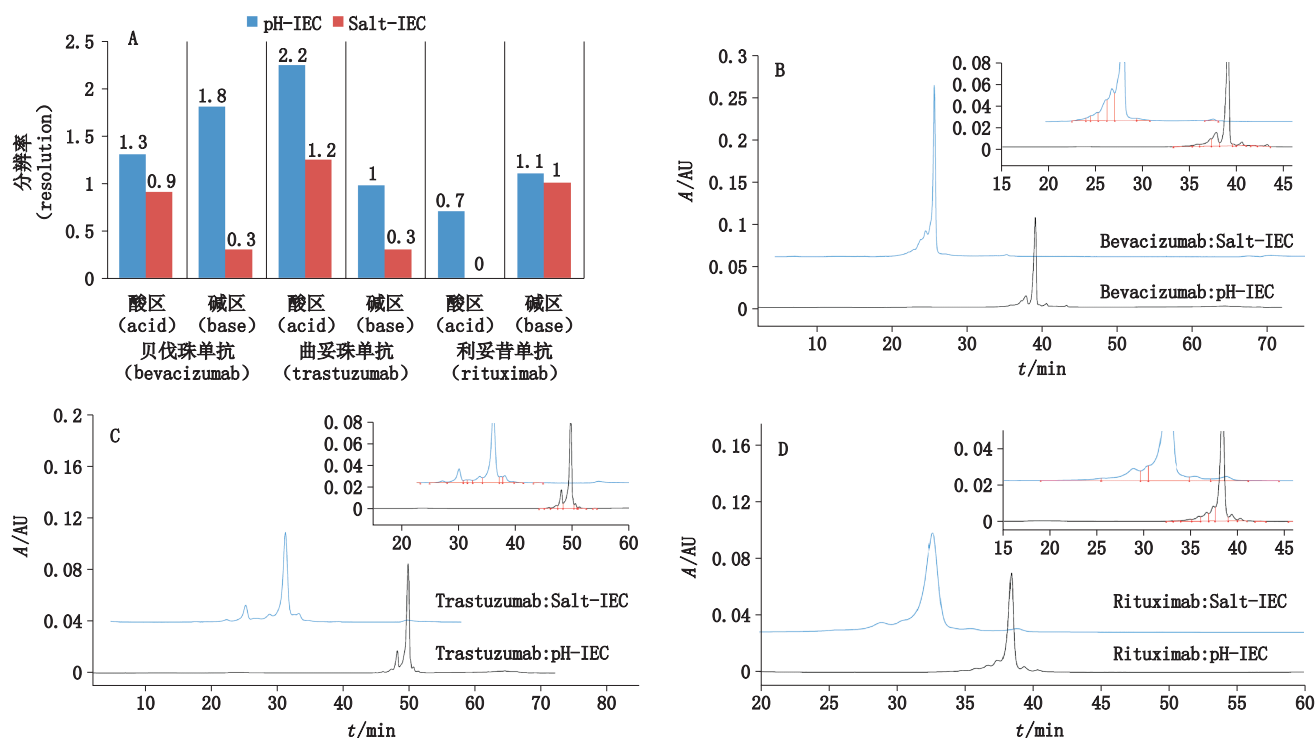
图 2 利妥昔单抗分离梯度优化
Fig. 2 Improving pH-IEC gradient of rituximab

极大地降低了工作效率,并且分离度往往难以令人满意。用 USP 各论中记载的盐梯度方法相应地对贝伐珠单抗、曲妥珠单抗和利妥昔单抗进行分离,酸性峰、碱性峰与主峰的分离度明显低于 pH-IEC 方法。分离结果与图谱比对见表 2 和图 3。此处描述的分度指主峰与其最接近的酸性峰之间的分度、主峰与其最接近的碱性峰之间的分度,在批放行检验、稳定性考察、工艺优化检测中一般不考虑各酸性峰间、各碱性峰间的分度。

表 2 pH 梯度与盐梯度分离结果对比

Tab. 2 Comparison of the separation results between pH gradient and salt gradient methods

峰面积 (area) /%	分离方法 (method)	贝伐珠单抗 (bevacizumab)	曲妥珠单抗 (trastuzumab)	利妥昔单抗 (rituximab)
酸区 (acidic variants)	pH 梯度 (pH gradient)	23.1	17.3	21.3
	盐梯度 (salt gradient)	30.6	24.5	17.6
主峰 (main peak)	pH 梯度 (pH gradient)	72.4	78.7	72.7
	盐梯度 (salt gradient)	67.9	65.9	75.9
碱区 (basic variants)	pH 梯度 (pH gradient)	4.5	4.0	6.0
	盐梯度 (salt gradient)	1.5	9.6	6.5



A. 分离度汇总 (resolution summary) B. 贝伐珠单抗 (bevacizumab) C. 曲妥珠单抗 (trastuzumab) D. 利妥昔单抗 (rituximab)

图 3 3 种单抗 pH-IEC 与 Salt-IEC 分离方法比较

Fig. 3 Resolution comparison between pH-IEC and Salt-IEC methods towards three MAbs

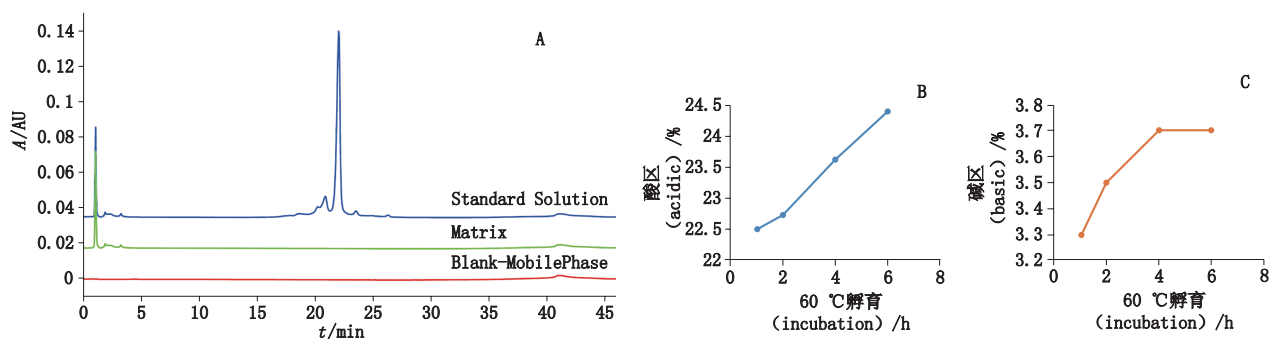
3.3 贝伐珠单抗 pH 梯度方法优化与验证

Mab 2 是贝伐珠单抗的生物类似药,针对这一品种我们照“2.2.1”中所述对方法进行优化,每一针分离时间由原先的 72 min 缩短至 46 min,与原方法相比,通量提高了约 40%,并对该方法进行了方法学验证。

3.3.1 专属性 取流动相 A 作为空白样品 (blank-mobile phase),将制剂缓冲液与蛋白样品同步前处理,分别制成基质样品 (matrix) 和标准样品 (standard solution)。如图 4 所示,流动相、基质溶液的色谱图在积分窗口内无任何色谱峰,供试品显示有

明显的酸区、主峰和碱区,经高温破坏后可观察到酸区杂质和碱区杂质均有趋势性增加。

3.3.2 精密度 重复性试验中制备 6 份样品,每个样品进样 3 次,共 18 针数据进行统计分析。结果显示主峰保留时间重复性良好, RSD 为 0.12%,酸区、主峰、碱区百分比峰面积 RSD 分别为 1.5%、0.44%、1.6%,中间精密度实验由其他实验者同法制备样品,与原实验者数据统计分析。结果显示酸区、主峰、碱区百分比峰面积 RSD 分别为 1.6%、0.47%、1.8%。结果见表 3、4。



A. 流动相、基质溶液、供试品叠加图 (chromatogram of the mobile phase, the matrix solution and the standard solution) B. 高温破坏实验酸区变化 (acidic variants during heat treatment) C. 高温破坏实验碱区变化 (basic variants during heat treatment)

图4 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—专属性

Fig. 4 Method validation of pH-IEC for bevacizumab biosimilar—specificity

表3 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—精密度: 重复性结果表 (n=18)

Tab. 3 Results of method validation for bevacizumab biosimilar—precision: repeatability

样品编号 (No.)	峰面积 (area) / (μV · s ⁻¹)			峰面积 (area) / %			保留时间 (retention time) / min
	酸区 (acidic)	主峰 (main)	碱区 (basic)	酸区 (acidic)	主峰 (main)	碱区 (basic)	主峰 (main)
1	684384	2348761	78072	22.0	75.5	2.5	22.062
2	697499	2333423	76420	22.4	75.1	2.5	22.042
3	711778	2390065	78965	22.4	75.1	2.5	22.012
4	690809	2402090	80247	21.8	75.7	2.5	22.035
5	687861	2410192	79387	21.6	75.9	2.5	22.012
6	697879	2413605	77486	21.9	75.7	2.4	22.041
Mean	695035	2383023	78430	22.0	75.5	2.5	0.027
SD	9770	33825	1383	0.3	0.3	0.0	0.12
RSD/%	1.4	1.4	1.8	1.5	0.44	1.6	22.1

注 (note): 所有数据均为 3 次进样平均值 (every single data was the average of three injections)

表4 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—精密度: 中间精密度结果表

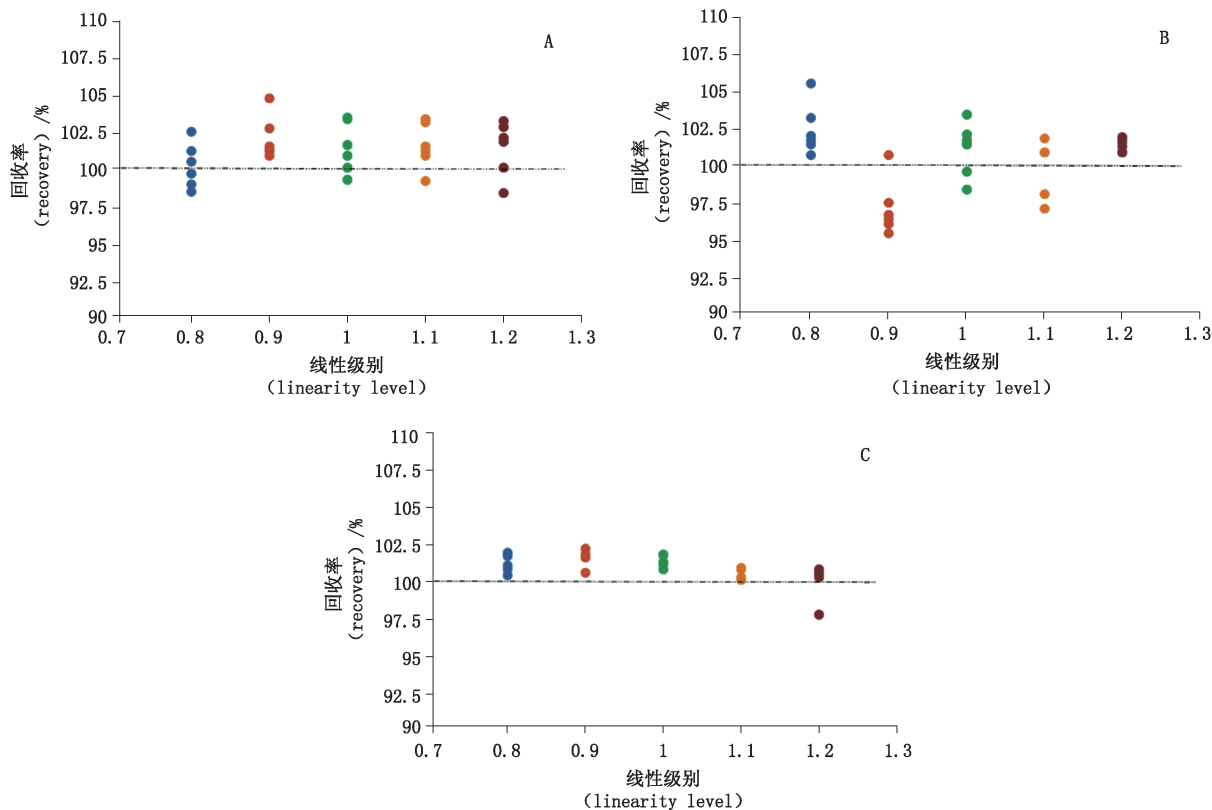
Tab. 4 Results of method validation for bevacizumab biosimilar—precision: intermediate

进样 (injection)	峰面积 - 酸区 (area, acidic) / %		峰面积 - 主峰 (area, main) / %		峰面积 - 碱区 (area, basic) / %	
	实验员 1 (analyst 1)	实验员 2 (analyst 2)	实验员 1 (analyst 1)	实验员 2 (analyst 2)	实验员 1 (analyst 1)	实验员 2 (analyst 2)
1	22.0	22.8	75.5	74.7	2.5	2.5
2	22.4	22.5	75.1	75.0	2.5	2.5
3	22.4	22.4	75.1	75.1	2.5	2.5
4	21.8	22.5	75.7	75.1	2.5	2.4
5	21.6	22.4	75.9	75.1	2.5	2.5
6	21.9	22.3	75.7	75.3	2.4	2.4
Mean	22.2		75.3		2.5	
SD	0.3		0.4		0.0	
RSD/%	1.6		0.47		1.8	

注 (note): 所有数据均为 3 次进样平均值 (every single data was the average of three injections)

3.3.3 准确度 设定 5 个不同浓度 (80%、90%、100%、110%、120%), 进样后计算每个浓度下的酸区面积、主峰面积、碱区面积, 与标准浓度进样的结果进行比对。通过计算回收率, 统计分析准确度。如图 5 所示, 酸区 6 次进样的平均回收率在 5 个不同级别分别为 102.4%、97.1%、101.1%、100.0%、101.4%, 主峰 6 次进样的平均回收率在 5 个不同级别分别为 101.3%、

101.6%、101.3%、100.5%、100.1%, 碱区 6 次进样的平均回收率在 5 个不同级别分别为 100.3%、102.1%、101.5%、101.6%、101.5%, 且各组数据的 RSD 均小于 2%; 酸区所有数据回收率的总体平均值为 100.4%, 主峰所有数据回收率的总体平均值为 101.0%, 碱区所有数据回收率的总体平均值为 101.4%, RSD 均小于 2%。



A. 酸区回收率 (recovery of acidic variants) B. 主峰回收率 (recovery of main peak) C. 碱区回收率 (recovery of basic variants)

图 5 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—准确度

Fig. 5 Method validation of pH-IEC for Bevacizumab biosimilar—Accuracy

3.3.4 线性与范围 本方法将供试品稀释 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 进行检测。由于检测浓度较低, 因此无论对于批放行检验样品或工艺过程样品均可通过简单的稀释达到, 使得本方法在单抗产品的阳离子色谱法分析中适用性很强, 该方法线性与范围验证与本文中涉及的 3 个抗体的 USP 各论中均一致。设定 5 个线性级别 (80%、90%、100%、110%、120%, 蛋白质含量分别对应 0.8、0.9、1.0、1.1、1.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行检测, 分别对酸区、主峰、碱区的峰面积与样品蛋白含量进行回归分析。如图 6 所示, 在检测范围 80%~120% 内, 酸区、主峰、碱区峰面积均与样品蛋白含量呈线性关系, 线性相关系数 R^2 分别为 0.987 6、0.999 5、0.999 0。

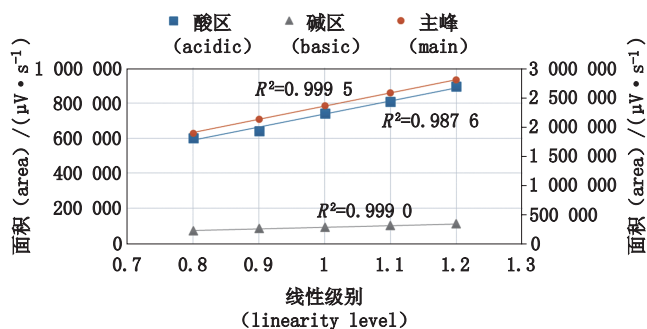


图 6 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—线性与范围

Fig. 6 Method validation of pH-IEC for bevacizumab biosimilar—linearity and range

3.3.5 耐用性 分别向供试品中添加 0、50、100、150、200 和 250 mmol·L⁻¹ 的氯化钠后进行检测,具体数据见表 5。结果显示方法对基质的耐受性很强,即使供试品缓冲液中存在高浓度的盐也不影响蛋白质在色谱柱上的保留和洗脱,不同浓度氯化钠添加的供试品酸区、主峰、碱区的百分比峰面积 RSD 分别为 0.8%、0.3%、2.0%;将色谱柱温度设置在 20~35 ℃,如图 7 和表 6 所示,方法对温度的耐受性良好,不同色谱柱温度仅影响绝对保留时间,结果显示在该温度范围内主峰的保留时间 RSD 均为 0.1%,所有供试品酸区、主峰、碱区的百分比峰面积的总体 RSD 分别为 2.3%、0.7%、5.3%;ProPac™ WCX-10 色谱柱长 25 cm,该系列同时提供一根 5 cm 的预柱,如图 8 所示,在 pH-IEC 模式下选用短色谱柱可以进一步提高通量,同时对分离度无明显影响,因此更加适用于需要快速检测的研发早期筛选评价阶段。

表 5 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—耐用性:基质效应结果表

Tab. 5 Results of method validation for bevacizumab biosimilar—robustness: matrix effect

NaCl 含量 (NaCl concentration)/ (mmol·L ⁻¹)	峰面积 - 酸区 (area, acidic)/%	峰面积 - 主峰 (area, main)/%	峰面积 - 碱区 (area, basic)/%
0	24.55	71.79	3.65
50	24.57	71.82	3.61
100	24.53	71.80	3.66
150	24.65	71.54	3.81
200	24.87	71.37	3.76
250	24.23	72.04	3.73
Mean	24.6	71.7	3.7
SD	0.2	0.2	0.1
RSD/%	0.8	0.3	2.0

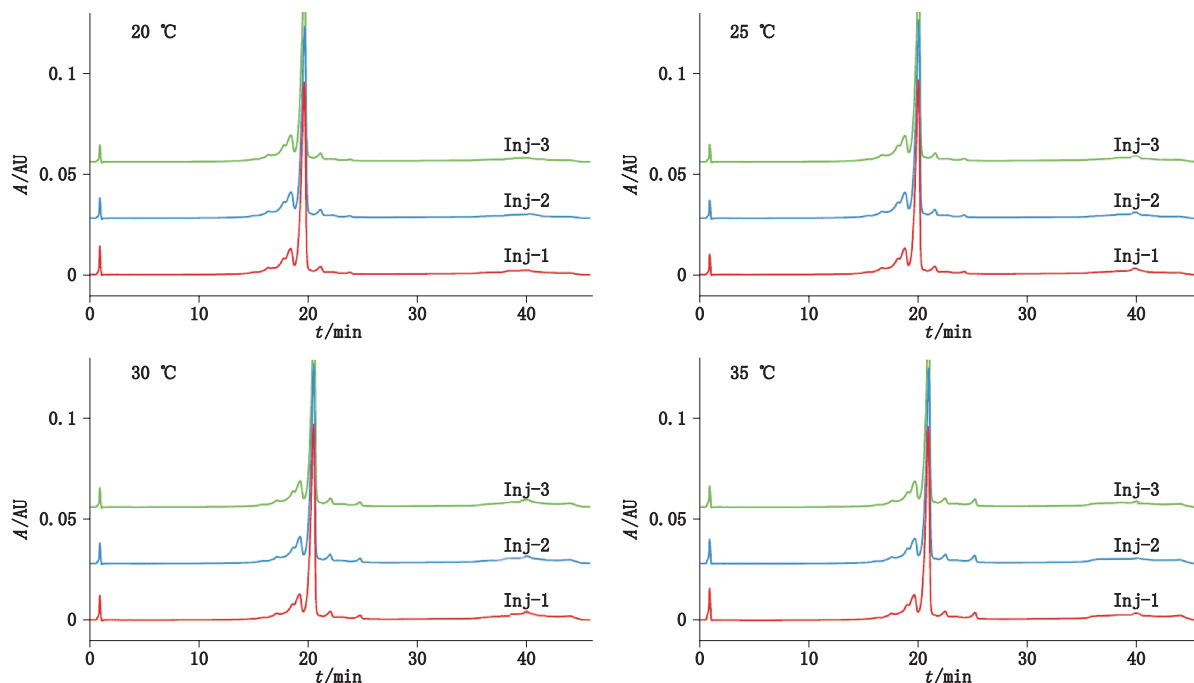


图 7 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—耐用性:色谱柱温度

Fig. 7 Method validation of pH-IEC for bevacizumab biosimilar—robustness: column temperature

4 讨论

目前,在生物技术药物分析实验室中,对于单克隆抗体的电荷异质性分析工作除采用高效液相色谱法之外,通常还有等电聚焦(IEF)、毛细管等电聚焦(cIEF)、镜像毛细管电泳(iCE)等手段^[13-14],但上述

方法相比于 HPLC 法仍然存在一些劣势,如分辨率不足(IEF),溶液配制烦琐、通量较低(cIEF),设备昂贵、功能单一(iCE)等问题。阳离子交换色谱法仍然是 mAb 开发和放行检验中的首选电荷异质性分析方法^[15]。

表 6 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—耐用性: 色谱柱温度结果表

Tab. 6 Result of method validation for bevacizumab biosimilar—robustness: column temperature

色谱柱温度 (column temperature)	峰面积 - 酸区 (area, acidic) /%	峰面积 - 主峰 (area, main) /%	峰面积 - 碱区 (area, basic) /%	主峰保留时间 (retention time of main peak) /min
20 °C	25.01	70.63	4.36	19.798
	25.03	70.57	4.40	19.828
	25.06	70.52	4.42	19.800
Mean	25.0	70.6	4.4	19.809
SD	0.0	0.1	0.0	0.0
RSD/%	0.1	0.1	0.7	0.08
25 °C	24.65	70.79	4.56	20.190
	25.21	70.18	4.61	20.223
	25.26	70.21	4.53	20.223
Mean	25.0	70.4	4.6	20.212
SD	0.3	0.3	0.0	0.0
RSD/%	1.4	0.5	0.9	0.09
30 °C	24.83	70.61	4.56	20.638
	24.83	70.40	4.77	20.650
	24.95	70.18	4.87	20.683
Mean	24.9	70.4	4.7	20.657
SD	0.1	0.2	0.2	0.0
RSD/%	0.3	0.3	3.3	0.11
35 °C	23.94	71.10	4.96	21.090
	23.79	71.06	5.15	21.140
	23.63	71.84	4.52	21.129
Mean	23.8	71.3	4.9	21.120
SD	0.2	0.4	0.3	0.0
RSD/%	0.7	0.6	6.6	0.12
Mean	24.68	70.67	4.64	\
Overall SD	0.57	0.48	0.24	\
Overall RSD/%	2.3	0.7	5.3	\

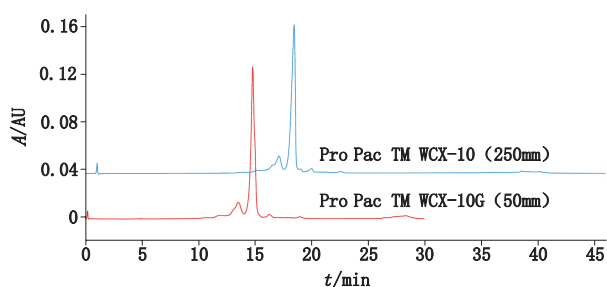


图 8 贝伐珠单抗生物类似药 pH-IEC 方法学验证—耐用性: 短色谱柱
Fig. 8 Method validation of pH-IEC for bevacizumab biosimilar—robustness: shorter column

本研究中采用的 pH 梯度 IEC 方法具有方法平台化、分离度好、通量高、耐用性强 (供试品体系耐受高浓度盐, 离子强度 0~250 mmol · L⁻¹ NaCl、色谱柱温

度范围广、可在不影响分离度的情况下用短色谱柱提高通量) 等优势。在治疗性单抗产品的早期筛选阶段, 对于来源多样、基质情况复杂的不同细胞株亚克隆表达的单抗, 采用 pH-IEC 方法能够省去大量前处理步骤或大大节约前处理时间, 在高通量方法的帮助下一次性对数十个甚至上百个样品进行分析; 在单抗的批放行检验或复核检验中, 采用 pH-IEC 方法能够用完全相同的条件对不同等电点 (pI) 的单抗进行分离, 对本研究中的 6 个不同的单抗均可实现良好分离, 此外我们还将收录于美国药典 (USP) 的 3 种单抗—贝伐珠单抗、曲妥珠单抗、利妥昔单抗与其各论中记载的盐梯度分离方法进行比较, 结果显示 3 种单抗的主峰与酸区、碱区的分离度均有改善, 贝伐珠单

抗分离度分别提高了 44% 和 500%; 曲妥珠单抗分离度分别提高了 83% 和 233%; 利妥昔单抗酸区分离度由无法给出提高到 0.7, 碱区分离度提高了 10%。应用这种方法, 缩短了检验时间, 加速了检验流程, 且分离度较盐梯度方法更佳, 提高了检测结果的准确程度。

该方法还可按照单位时间内流动相变化速率恒定的原则, 根据单抗 pI 值的不同, 提高起始流动相 B 和流动相 C 的比例, 进一步提高通量, 在本研究中对贝伐珠单抗的检测方法进行优化, 使得每一针分离时间由原先的 72 min 缩短至 46 min, 与原方法相比通量约提高了 40%, 并对该方法进行了方法学验证。验证结果显示方法专属性良好, 经高温破坏后, 可观察到酸区杂质和碱区杂质均有趋势性增加; 精密度良好, 在重复性试验中主峰保留时间 RSD 为 0.12%, 在中间精密度试验中酸区、主峰、碱区百分比峰面积 RSD 均小于 2%; 准确度良好, 酸区、主峰、碱区在 5 个不同浓度级别中回收率总体平均值分别为 100.4%、101.0%、101.4%; 线性良好, 在蛋白含量 0.8~1.2 mg·mL⁻¹ 范围内, 酸区、主峰、碱区的峰面积与样品蛋白含量呈线性关系, 主峰与碱区线性相关系数 R^2 均大于 0.999, 酸区 R^2 为 0.988; 耐用性良好, 当流动相 pH、色谱柱温度在一定范围内波动时, 或将供试品和流动相放置几天, 酸区、碱区和主峰的百分比峰面积含量测定结果重复性良好, RSD 均小于 3%。

综上所述, 对于有开发、检测多个抗体品种需求的实验室, pH 梯度 IEC 方法无论在研发初期还是放行检验中都能够有效降低人力、物力和时间成本。该方法良好的潜力使其正逐渐替代传统的盐梯度 IEC 方法。对于研发企业来说, 采用更先进的分析方法, 也遵循了《生物类似药研发与评价技术指导原则》中关于 State of the Art 的分析精神。

参考文献

- [1] PONNIAH G, KITA A, NOWAK C, *et al.* Characterization of the acidic species of a monoclonal antibody using weak cation exchange chromatography and LC-MS [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(17): 9084
- [2] BECK A, WAGNERROUSSET E, AYOUB D, *et al.* Characterization of therapeutic antibodies and related products [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(2): 715
- [3] HARRIS R J, 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.
- [4] 于传飞, 王文波, 刘春雨, 等. 离子交换色谱对抗 VEGFR2 单抗的电荷异质性分析 [J]. *微生物学免疫学进展*, 2014, 42(5): 17
- [5] YU CF, WANG WB, LIU CY, *et al.* Analysis of charge heterogeneity for anti-VEGFR2 monoclonal antibody by CEX-HPLC [J]. *Prog Microbiol Immuno*, 2014, 42(5): 17
- [6] BECK A, DIEMER H, AYOUB D, *et al.* Analytical characterization of biosimilar antibodies and Fc-fusion proteins [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2013, 48: 81
- [7] STOLL D R, HARMES DC, DANFORTH J, *et al.* Direct identification of rituximab main isoforms and subunit analysis by online selective comprehensive two-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry. [J]. *Anal Chem*, 2015, 87(16): 8307
- [8] GANDHI S, REN D, XIAO G, *et al.* Elucidation of degradants in acidic peak of cation exchange chromatography in an IgG1 monoclonal antibody formed on long-term storage in a liquid formulation [J]. *Pharm Res*, 2012, 29(1): 209
- [9] FEKETE S, BECK A, FEKETE J, *et al.* Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part I: salt gradient approach. [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102(3): 33
- [10] FEKETE S, BECK A, FEKETE J, *et al.* Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102: 282
- [11] ZHANG L, PATAPOFF T, FARNAN D, *et al.* Improving pH gradient cation-exchange chromatography of monoclonal antibodies by controlling ionic strength [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1272(1): 56
- [12] FARNAN D, MORENO GT. Multiproduct high-resolution monoclonal antibody charge variant separations by pH gradient ion-exchange chromatography [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(21): 8846
- [13] REA JC, MORENO GT, LOU Y, *et al.* Validation of a pH gradient-based ion-exchange chromatography method for high-resolution monoclonal antibody charge variant separations [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(2): 317
- [14] 于传飞, 郭玮, 王兰, 等. 成像毛细管等电聚焦电泳法对单克隆抗体制品的电荷异质性分析 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(7): 1212
- [15] YU CF, GUO W, WANG L, *et al.* Charge heterogeneity analysis of monoclonal antibody products with imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2014, 34(7): 1212
- [16] 于传飞, 王兰, 张峰, 等. 重组人源化抗 DR5 单克隆抗体质控方法的建立 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(9): 1168
- [17] YU CF, WANG L, ZHANG F, *et al.* Development of a method for quality control of recombinant humanized anti-DR5 monoclonal antibody [J]. *Chin J Biol*, 2014, 27(9): 1168
- [18] DU Y, WALSH A, EHRICK R, *et al.* Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies [J]. *MAbs*, 2012, 4(5): 578

(本文于 2017 年 4 月 27 日收到)