

## 治疗性单克隆抗体电荷异质性分析方法比较\*

王文波, 武刚, 于传飞, 张峰, 刘春雨, 李萌, 陈伟, 郭莎, 高凯, 王兰\*\*

(中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室, 卫生部生物技术产品检定及标准化重点实验室, 北京 100050)

**摘要 目的:**对4种常用的单抗电荷异质性分析方法进行比对研究。**方法:**以重组抗TNF $\alpha$ 全人源单克隆抗体为例,分别利用离子交换色谱(IEC)、毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦电泳(CIEF)和成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)4种方法对该抗体的电荷异质性进行分析;利用CIEF和iCIEF2种方法对抗体主峰等电点(pI)进行分析。**结果:**4种方法能够对重组抗TNF $\alpha$ 全人源单克隆抗体的电荷异构体进行有效的分离和定量,其中IEC和CZE2种方法检测的电荷异构体峰面积百分比(酸性峰、主峰和碱性峰)较为一致,4种方法检测的碱性峰比例较一致,CIEF和iCIEF检测的主峰与酸性峰比例较其他方法偏高。CIEF和iCIEF检测抗体主峰等电点具有一定差异,其中,聚焦时间长短和pI Marker的选择是影响单抗pI值检测的主要因素。**结论:**通过抗体电荷异质性分析方法的比较研究可见,在单抗电荷异构体比例和主峰pI测定上4种方法具有一定的差异。对单抗的质控应结合产品特性和表征研究,合理选择电荷异质性分析方法。

**关键词:**单克隆抗体;电荷异质性;等电点;质量控制;毛细管电泳;离子交换色谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)08-1384-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.08.06

## Comparative study of different analytical methods for the charge heterogeneity analysis of therapeutic antibody\*

WANG Wen-bo, WU Gang, YU Chuan-fei, ZHANG Feng, LIU Chun-yu,  
LI Meng, CHEN Wei, GUO Sha, GAO Kai, WANG Lan\*\*

(National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To analyze charge heterogeneity of monoclonal antibody by four widely used analytical methods. **Methods:** Ion exchange chromatography (IEC), capillary zone electrophoresis (CZE), capillary isoelectric focusing (CIEF) and imaged capillary isoelectric focusing (iCIEF) were used to analyze the charge heterogeneity of the recombinant anti-TNF $\alpha$  fully human monoclonal antibody. The electronic point (pI) value of the main peak was also analyzed by CIEF and iCIEF. **Results:** The four methods in this study can efficiently isolate and quantitate charge isomers of recombinant humanized anti-TNF $\alpha$  mAb. The main peak and acidic/basic peak area percentage

\* 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2014ZX09304311-001, 2012ZX09304010)

通信作者 Tel:(010)67095707; E-mail: iamouran@163.com

第一作者 Tel:(010)67095963; E-mail: qinghaiminhe@163.com

analyzed by IEC and CZE were similar. The basic peak percentage analyzed by four methods was consistent. The main peak and acidic peak area percentage analyzed by CIEF and iCIEF were higher than the two other methods, and pI value of main peak was different between CIEF and iCIEF. The focusing time and pI marker affect the pI value calculation in this study. **Conclusion:** By comparing the methods of antibody charge heterogeneity analysis, we can see that there are some differences among the four analytical methods in the determination of antibody charge isomer ratio and pI peak. The appropriate method should be chosen for quality control based on the specificity and characterization of mAb.

**Keywords:** monoclonal antibody; charge heterogeneity; isoelectric point; quality control; capillary electrophoresis; ion exchange chromatography

单克隆抗体在其复杂的生产及存储过程中能产生大量的修饰和改变,如氧化/脱酰胺<sup>[1]</sup>、糖基化<sup>[2]</sup>、C末端赖氨酸截除<sup>[3]</sup>、N末端焦谷氨酸环化<sup>[4]</sup>等,造成抗体在电荷分布方面的异质性,这些修饰对抗体活性、免疫原性及药代动力学均有影响,同时也是整个生产工艺的重要指征。因此电荷变异体是抗体质控中关注的重点,对其进行有效的质量控制是十分必要的。

目前,对抗体电荷异质性分析的常用方法有等电聚焦电泳(IEF)、离子交换色谱(IEC)<sup>[5]</sup>、毛细管区带电泳(CZE)<sup>[6]</sup>、毛细管等电聚焦电泳(CIEF)<sup>[7]</sup>和成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)<sup>[8]</sup>。等电聚焦电泳(IEF)是根据抗体总的电荷差异进行分离;IEC中除了总电荷差异外,电荷的分布由于能够影响抗体与色谱柱的相互作用,也会影响电荷变异体的分离检测;CZE根据样品各组分的质荷比差异进行分离。上述方法均能对单抗样品的电荷异构体进行有效的分离,并具有各自的优势。pI是蛋白质的固有属性,通常测定方法有IEF以及CIEF和iCIEF,CIEF和iCIEF由于快速、准确、通用性强等特点,在单抗pI测定中较为常用。

由于以上常用的电荷异质性分析方法在分离机制上存在差异,对单抗异质性的分析可能会存在差异;同时,目前国内申报单位对治疗性单抗制品拟定质量控制方案时,忽略或尚未足够重视对单抗电荷异质性的有效控制。本研究通过对IEC、CZE、CIEF和iCIEF 4种常用电荷异质性分析方法进行比较研究,旨在探讨不同电荷异质性检测方法的差异及在质量控制中的重要性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 抗TNF $\alpha$ 全人源单克隆抗体样品,由本室保存,置换缓冲液为20 mmol·L<sup>-1</sup>的Tris缓冲液,pH.0。

十二水磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O),分析纯,购自Sigma公司。氯化钠(NaCl),分析纯,购自Sigma公司。超纯水:电阻率不低于18.2 M $\Omega$ ·cm,本研究中所有溶液均用超纯水配制。

Waters公司e2695高效液相色谱仪,UV检测器。Absciex公司PA800 plus系统毛细管电泳仪,UV检测器。ProteinSimple公司iCE280系统成像毛细管等电聚焦电泳仪。Absciex公司Absciex N-CHO涂层毛细管(有效长度20 cm,内径50  $\mu$ m,聚乙烯醇类涂层)。Thermo公司ProPac WCX-10色谱柱(4 mm×250 mm,固定相为羧酸盐)。GE公司3-10两性电解质。

**1.2 IEC分析** 色谱柱:ProPac WCX-10(4 mm×250 mm,固定相:羧酸盐);流动相:A相为0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠水溶液(称取3.58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O,加水900 mL溶解,用稀磷酸溶液调节pH至7.5,纯水定容1 000 mL,用0.22  $\mu$ m滤膜过滤,超声脱气后使用),B相为0.01 mol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠和0.5 mol·L<sup>-1</sup>氯化钠水溶液(称取3.58 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O和29.22 g NaCl,加水900 mL溶解,用稀磷酸溶液调节pH至5.5,纯水定容至1 000 mL,用0.22  $\mu$ m滤膜过滤,超声脱气后使用),洗脱梯度(0~20 min,6%B→16%B;20~22 min,16%B→100%B;22~26 min,100%B);流速:1.0 mL·min<sup>-1</sup>;上样量:100  $\mu$ L(1mg·mL<sup>-1</sup>);检测波长:280 nm。

**1.3 CZE 分析** 用纯水将样品稀释至  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $6.895 \text{ kPa}$  进样  $10 \text{ s}$ , 然后以  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\epsilon$ -氨基己酸- $0.2\%$  的羟丙基甲基纤维素为电泳缓冲液,  $30 \text{ kV}$  电压下分离  $15 \text{ min}$ , 检测波长  $214 \text{ nm}$ , 毛细管有效长度  $40 \text{ cm}$ , 总长  $50 \text{ cm}$ , 内径  $50 \mu\text{m}$ 。

**1.4 CIEF 分析** 混合  $200 \mu\text{L}$  的  $3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素 CIEF 胶、 $12 \mu\text{L}$  的 3-10 两性电解质、 $20 \mu\text{L}$  的阴极稳定剂、 $2 \mu\text{L}$  的阳极稳定剂、 $2 \mu\text{L}$  的 pI marker 和  $10 \mu\text{L}$  的纯水稀释后的样品溶液(质量浓度  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )  $172.375 \text{ kPa}$  进样  $99 \text{ s}$ , 然后在  $25 \text{ kV}$  电压下聚焦  $15 \text{ min}$ ,  $25 \text{ kV}$  电压下化学移动  $30 \text{ min}$ , 检测波长  $280 \text{ nm}$ , 毛细管有效长度  $20 \text{ cm}$ 。

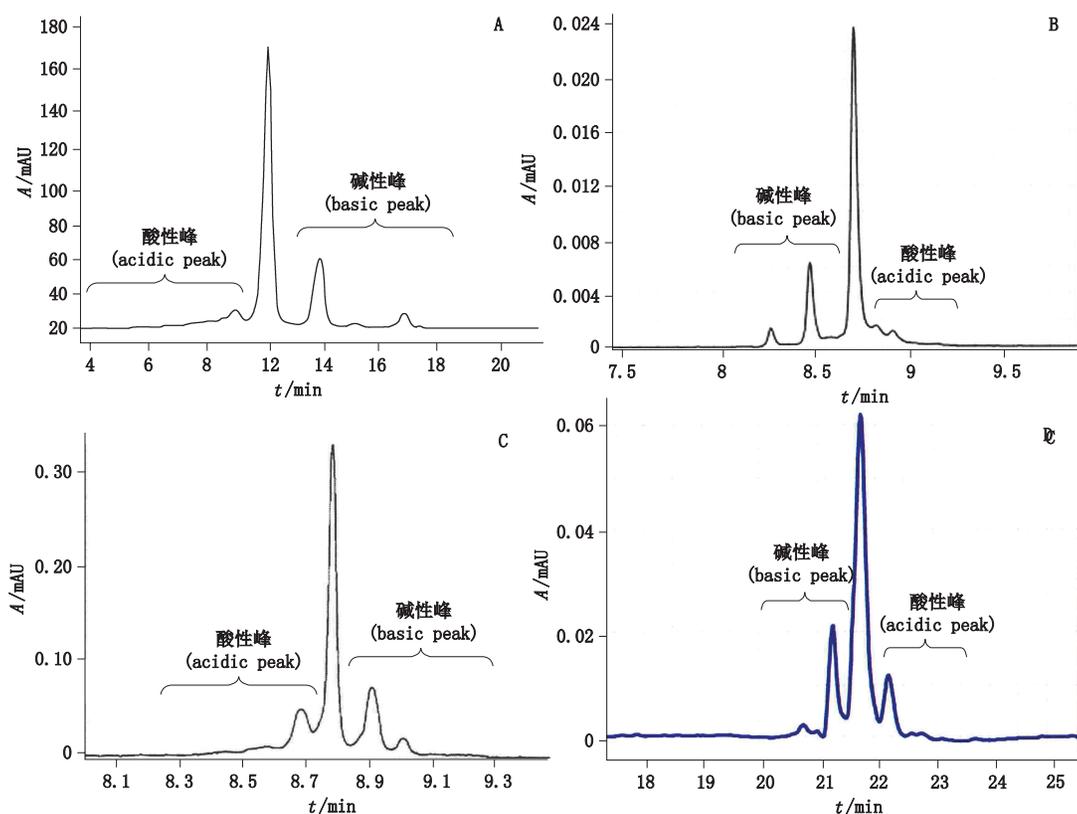
**1.5 iCIEF 分析** 将  $10 \mu\text{L}$  的纯水稀释后的样品溶液(质量浓度  $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )与  $70 \mu\text{L}$  的  $1\%$  甲基纤维素、 $1 \mu\text{L}$  的 pI marker 5.12、 $1 \mu\text{L}$  的 pI marker 9.77、 $8 \mu\text{L}$  的 3-10 两性电解质、 $40 \mu\text{L}$  的  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素和  $70 \mu\text{L}$  超纯水混匀。预聚焦电压  $1.5 \text{ kV}$ , 持续  $1 \text{ min}$ ;

聚焦电压  $3 \text{ kV}$ , 持续  $10 \text{ min}$ 。

**1.6 理论 pI 计算** 通过抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体一级序列, 在 Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))<sup>[9]</sup> 计算其理论 pI 值。

## 2 结果

**2.1 电荷异构体比例分析** 用 IEC、CZE、CIEF 和 iCIEF 4 种方法分别对抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体的电荷异质性进行了分析, 结果如图 1 所示, 抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体呈典型的单抗电荷异质性分布, 表现为主峰及其左右两侧的酸、碱性峰。由于分离机制的差异, 酸、碱性峰的出峰顺序有所不同, 在 IEC 和 iCIEF 方法下, 出峰顺序依次为酸性峰、主峰和碱性峰; CZE 和 CIEF 方法下, 出峰顺序依次为碱性峰、主峰和酸性峰。主峰及酸碱峰峰面积百分比见表 1 和图 2。



A. IEC B. CZE C. iCIEF D. CIEF

图 1 抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体电荷异质性分析图谱

Fig. 1 Chromatograms of charge heterogeneity analysis of human recombinant anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody

表 1 抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体电荷  
异质性分析 (mean  $\pm$  s, n=3)

Tab. 1 Analysis of charge heterogeneity of human  
recombinant anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody

方法 (method)	峰面积百分比 (peak area percentage) /%		
	酸性峰 (acidic peak)	主峰 (main peak)	碱性峰 (basic peak)
IEC	13.72 $\pm$ 0.09	62.80 $\pm$ 0.02	23.47 $\pm$ 0.10
CZE	12.81 $\pm$ 0.15	63.10 $\pm$ 0.29	24.09 $\pm$ 0.15
CIEF	17.99 $\pm$ 0.08	57.85 $\pm$ 0.08	24.16 $\pm$ 0.01
iCIEF	27.16 $\pm$ 0.09	51.64 $\pm$ 0.15	21.20 $\pm$ 0.21

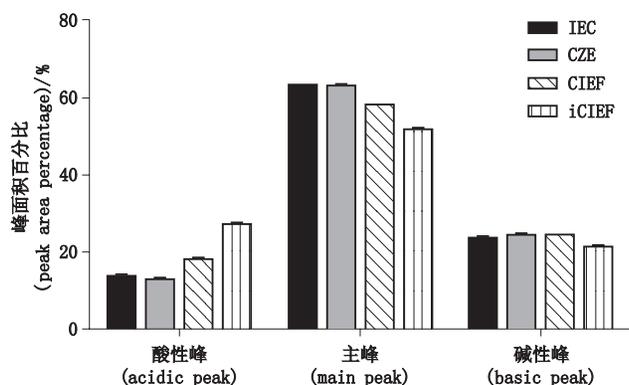


图 2 抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体电荷异构体峰面积百分比  
Fig. 2 Peak area percentage of charge isomers of human recombinant  
anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody

结果显示, IEC 和 CZE 2 种方法检测的电荷异构体比例较为一致, 4 种方法检测的碱性峰比例较一致, CIEF 和 iCIEF 检测的主峰与酸性峰面积比例较其他方法具有一定的差异。

2.2 主峰等电点分析 利用 CIEF 和 iCIEF 2 种方法对抗样品的主峰 pI 进行了检测, (CIEF 条件: 3-10 两性电解质, 聚焦 15 min, pI marker 分别为 4.1、5.5、7.0 和 10.0; iCIEF 条件: 3-10 两性电解质, 聚焦 10 min, pI marker 分别为 5.12 和 9.77), 结果如表 2 所示。2 种方法检测得到的主峰 pI 差异较大, CIEF 法的 pI 为 8.36, iCIEF 法的 pI 为 8.99。该抗体的理论 pI 为 8.36。

为了评价 CIEF 和 iCIEF 中主峰 pI 检测的影响因素, 采用不同聚焦时间和选择不同的 pI marker 进行分析。由于 2 种方法聚焦条件存在差异, 首先分析了在不同聚焦时间对 pI 测定的影响。由图 3-A 和表 2 可见, 聚焦时间长短对 pI 的测定具有较大的影响。CIEF 模式下随着聚焦时间的增加, 毛细管内 pH 梯度线性减弱,  $R^2$  值减小 (10 min 聚焦时 pH 线性梯度最好, 但聚焦不完全, 推荐采用聚焦 15 min), 样品主峰 pI 不断减小, pI marker 聚焦位置向样品两端扩散。而对于 iCIEF, 样品主峰 pI 随着聚焦时间不断增加, 2 个 pI marker 位置较为固定 (图 3-B 和表 2)。

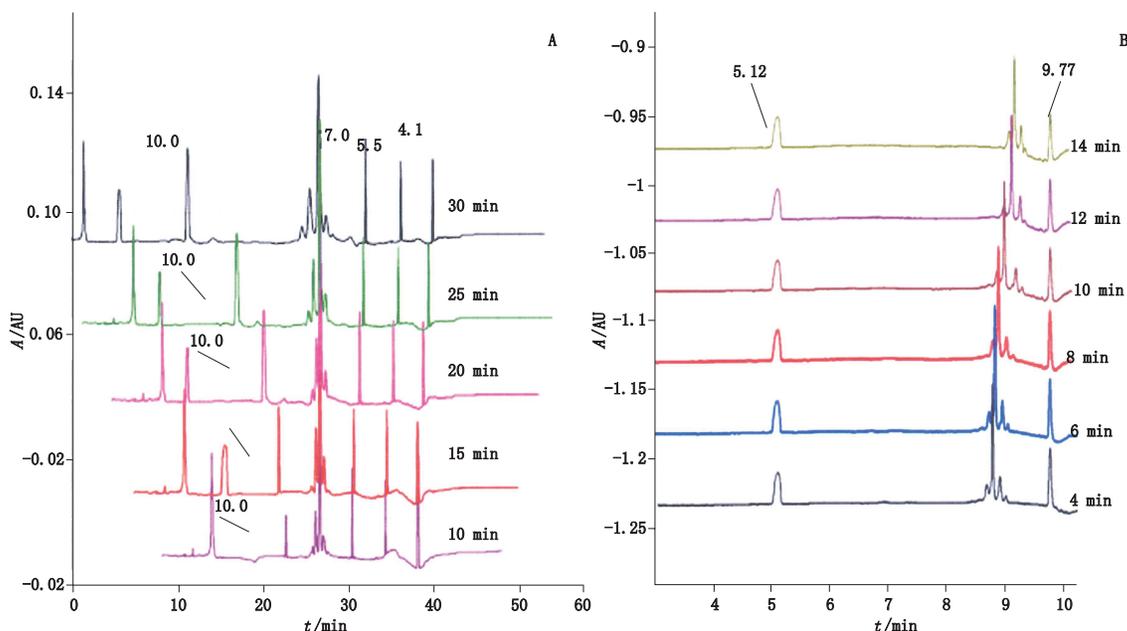


图 3 不同聚焦时间下 CIEF (A) 及 iCIEF (B) 分析  
Fig. 3 Analysis of CIEF (A) and iCIEF (B) by different focusing time

表 2 不同聚焦时间对 pI 值分析的影响 (mean ± s, %, n=3)

**Tab. 2 Analysis of pI value by different focusing times**

CIEF			iCIEF	
聚焦时间 (focusing time)/min	主峰等电点 (pI value of main peak)	R <sup>2</sup>	聚焦时间 (focusing time)/min	主峰等电点 (pI value of main peak)
10	8.47 ± 0.03	0.999 9	4	8.79 ± 0.02
15	8.36 ± 0.00	0.998 6	6	8.83 ± 0.01
20	8.09 ± 0.01	0.989 2	8	8.89 ± 0.01
25	7.74 ± 0.01	0.975 0	10	8.99 ± 0.01
30	7.28 ± 0.02	0.936 8	12	9.11 ± 0.02
—	—	—	14	9.16 ± 0.02

注 (note): R<sup>2</sup> 采用 PA800 plus 系统的 32Karat 软件进行计算, 因 iCIEF 电泳分析软件只能用 2 个 pI marker 进行拟合计算, 因此本表未列出 (The Rsquare in this table was calculated by 32Karat in PA800 plus system. Rsquare of iCIEF was not presented because only two pI marker could be analyzed by its analysis software)

对于不同 pI marker 对样品主峰 pI 值测定的影响, 在聚焦 15 min 的 CIEF 模式下进行了分析, 结果如表 3 所示。当选取样品 pI 两端的 marker 进行计算时, 不同 pI 值以及所用 marker 数量的选择对样品的 pI 值计算有一定影响, 但影响不大 (在约 0.1 pI 范围内), 而 pI marker 均在样品一侧时, 测定的样品 pI 值差异较大。因此, 建议在 pI 测定时, 选取样品 pI 两端与其 pI 值较接近的 marker 进行测定。

表 3 不同 pI marker 对主峰 pI 值计算的影响 (mean ± s, %, n=3)

**Tab. 3 Effect of different pI markers on calculation of pI value of main peak**

pI marker	主峰等电点 (pI value of main peak)
4.1、5.5	8.57 ± 0.01
4.1、10.0	8.25 ± 0.01
5.5、10.0	8.28 ± 0.01
7.0、10.0	8.36 ± 0.00
4.1、5.5、10.0	8.27 ± 0.01
5.5、7.0、10.0	8.32 ± 0.00
4.1、5.5、7.0、10.0	8.32 ± 0.01

虽然 2 种方法测定的 pI 值差异较大, 但同一种方法内其测定电荷异构体比例和 pI 值却较稳定, 因此这 2 种方法均适用于单抗的电荷异质性分析和鉴别 (根据图谱或 pI 值), 对于 2 种方法在 pI 值测定上的差异, 将在今后进一步进行研究。

### 3 讨论

抗体电荷异质性的分析, 能够更好地保证产品的批间一致性, 同时也能够发现由生产工艺的变化引起的抗体电荷分布的改变, 从而对整个生产流程进行监测, 并能推动对生产工艺的优化, 保证抗体的安全有效性, 因此在抗体质控和放行中进行电荷异质性分析十分必要。

抗体电荷异质性常规分析方法包括 IEC、IEF 以及 CIEF 和 CZE。平板等点聚焦电泳法操作烦琐, 分辨率比较低, 定量不准确; IEC、CIEF 和 iCIEF 具有较好的分辨率及定量优势, CIEF 在抗体药物偶联物 (ADC) 中未偶联抗体的检测也有一定的应用<sup>[10]</sup>; CZE 通用性强、分析时间短, 且具有相当的分离度和准确性。其中 IEC<sup>[11]</sup> 和 CZE<sup>[12]</sup> 可与 MS 兼容进一步对电荷异构体进行表征。上述方法由于分离机制的不同, 分别从不同的角度对抗体电荷变异体进行描述<sup>[13-15]</sup>。

本研究对目前较常使用的 IEC、CIEF、iCIEF 和 CZE 4 种电荷异质性方法进行了比对分析, 结果表明这些方法能够对单抗的电荷异构体进行有效分离和定量。对本研究中采用的抗 TNF $\alpha$  全人源单克隆抗体, 4 种方法在电荷异构体比例和等电点测定上存在一定的差异。根据质量源于设计的理念, 企业应结合产品特性和表征数据, 对电荷异构体与抗体活性、免疫原性及体内药代等方面的关联进行评价, 从而选择合理的分析方法、设定产品合理科学的质量标准, 以保证产品的有效性和安全性。

### 参考文献

[1] YAN Y, WEI H, FU Y, et al. Isomerization and oxidation in the complementarity-determining regions of a monoclonal antibody: a study of the modification-structure-function correlations by hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(4): 2041

[2] BATRA J, RATHORE AS. Glycosylation of monoclonal antibody products: current status and future prospects [J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32(5): 1091

[3] LIU H, PONNIAH G, ZHANG HM, et al. *In vitro* and *in vivo*

- modifications of recombinant and human IgG antibodies [J]. *MAbs*, 2014, 6(5): 1145
- [4] BRORSON K, JIA AY. Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30: 140
- [5] FEKETE S, BECK A, VEUTHEY JL, *et al.* Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 113: 43
- [6] MORITZ B, SCHNAIBLE V, KIESSIG S, *et al.* Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 983-984: 101
- [7] CAO J, SUN W, GONG F, *et al.* Charge profiling and stability testing of biosimilar by capillary isoelectric focusing [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(10): 1461
- [8] ANDERSON CL, WANG Y, RUSTANDI RR. Applications of imaged capillary isoelectric focussing technique in development of biopharmaceutical glycoprotein-based products [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(11): 1538
- [9] WILKINS MR, GASTEIGER E, BAIROCH A, *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. *Methods Mol Biol*, 1999, 112: 531
- [10] LIN J, LAZAR AC. Determination of charge heterogeneity and level of unconjugated antibody by imaged cIEF [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1045: 295
- [11] ALVAREZ M, TREMINTING, WANG J, *et al.* On-line characterization of monoclonal antibody variants by liquid chromatography-mass spectrometry operating in a two-dimensional format [J]. *Anal Biochem*, 2011, 419(1): 17
- [12] WHITMORE CD, GENNARO LA. Capillary electrophoresis-mass spectrometry methods for tryptic peptide mapping of therapeutic antibodies [J]. *Electrophoresis*, 2012, 33(11): 1550
- [13] REA JC, FREISTADT BS, MCDONALD D, *et al.* Capillary ion-exchange chromatography with nanogram sensitivity for the analysis of monoclonal antibodies [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1424: 77
- [14] CHEN XN, NGUYEN M, JACOBSON F, *et al.* Charge-based analysis of antibodies with engineered cysteines: from multiple peaks to a single main peak [J]. *MAbs*, 2009, 1(6): 563
- [15] HE Y, LACHER NA, HOU W, *et al.* Analysis of identity, charge variants, and disulfide isomers of monoclonal antibodies with capillary zone electrophoresis in an uncoated capillary column [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(8): 3222

(本文于 2016 年 8 月 3 日收到)