·综述·

治疗性单克隆抗体类药物分析技术及其应用

张国林[1],景荣先[2],郭　乐[3],邢以文[1],薛　满[1]
(1 苏州市药品检验检测研究中心,苏州 215000;2 苏州市立医院,苏州 215000;
3 宁夏医科大学,银川 750004)

[摘要] 治疗性单克隆抗体(单抗)类药物是高度均一的生物大分子,抗原表位、理化性质和生物活性等方面的均一性程度高,能够通过特异性地与靶标分子结合发挥治疗作用。单抗类药物治疗过程中不良反应发生率低、患者耐受性高。单抗类药物是生物药物领域的热点和焦点,已成为现代生物制药行业中占比最大、增长最快的细分领域。根据生产技术和工艺的不同,单抗类药物发展已经经历了4代。我国最近批准上市的信迪利单抗注射液、特瑞普利单抗注射液、注射用卡瑞利珠单抗和替雷利珠单抗注射液等均属于第3代人源化单克隆抗体药物。单抗类药物分子结构复杂,容易发生二聚体、多聚体、末端氨基酸突变等不均一性变化,严重影响临床用药的安全性和有效性。对单抗类药物的原液和成品进行有效的质量控制是确保该类产品安全性和有效性的重要措施。目前,单抗类产品质量控制与分析的主要方法包括高效液相色谱(HPLC)法、酶联免疫吸附测定(ELISA)法、毛细管区带电泳(CZE)法、毛细管等电聚焦电泳(cIEF)法、成像毛细管等电聚焦电泳(iCIEF)法和十二烷基硫酸钠-毛细管电泳(CE-SDS)法等。本文就单抗类药物质量控制分析方法及应用进行综述,为相关研究及产品质量控制提供参考。

[关键词] 单克隆抗体;高效液相色谱法;酶联免疫吸附测定法;毛细管区带电泳法;细管等电聚焦电泳法;十二烷基硫酸钠-毛细管电泳

[中图分类号] R979.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)06-0528-07

Analysis technology and application progress of therapeutic monoclonal antibody drugs

ZHANG Guo-lin[1], JING Rong-xian[2], GUO Le[3], XING Yi-wen[1], XUE Man[1]
(1 *Suzhou Institute for Drug Control*, *Suzhou* 215000, *China*; 2 *Suzhou Municipal Hospital*, *Suzhou* 215000, *China*; 3 *Ningxia Medical University*, *Yinchuan* 750004, *China*)

[**Abstract**] Therapeutic monoclonal antibody (mAb) drugs are highly homogeneous bio-macromolecules, with high degree of homogeneity in antigen epitopes, physical and chemical properties and biological activities, which can specifically bind to the target molecules. In the course of treatment, the incidence of adverse reactions is low while the tolerance of patients is high. Monoclonal antibodies are the focus in the field of bio-pharmaceutics, which have become the most important and fastest growing area in modern biopharmaceutical industry. According to the different production process and technology, the development of monoclonal antibodies has experienced four generations. Sintilimab injection, treprizumab injection, carrizumab for injection and tirizumab injection recently approved in China are all the third generation of humanized monoclonal antibody drugs. The molecular structure of monoclonal antibody drugs is complex, which is easy to change the heterogeneity of dimer, polymer and terminal

[基金项目] 江苏省市场监督管理局科技项目(KJ207561);苏州市科技发展计划资助项目(SYS201425)

[作者简介] 张国林,男,博士,副主任药师,主要从事药品检测质量控制方面的研究。联系电话:(0512)66090229,E-mail:zhangguolin2006@163.com。

amino acid mutation. These changes may cause serious effects on the safety and effectiveness of clinical medication. It is an important measure to control the quality of the original and finished products of monoclonal anti-tumor drugs to ensure the safety and effectiveness of such products. At present, the main methods of quality control and analysis of monoclonal antibody products include HPLC, ELISA, CZE, cIEF, iCIEF and CE-SDS. In this paper, the analysis methods for quality control and application status of monoclonal antibodies were reviewed, which can provide reference for related research and product quality control.

[**Key words**] monoclonal antibody; high performance liquid chromatography; enzyme linked immunosorbent assay; capillary zone electrophoresis; capillary isoelectric polycarbonate electrophoresis; sodium dodecyl sulfate capillary electrophoresis

传统的抗肿瘤化疗药物通过干扰肿瘤细胞有丝分裂、阻止 DNA 复制和损伤 DNA 分子发挥抗肿瘤作用。化疗药物不良反应多、选择性差的特点决定了其临床应用受到较大限制。单克隆抗体(单抗)类药物是经过分子生物学手段制备的、由单一 B 细胞克隆得到的高度均一的生物大分子[1-2]。单抗类药物抗原表位、理化性质和生物活性等方面的均一性程度高,能够特异性与靶标分子结合,治疗过程中不良反应发生率低、患者的耐受性高[3-4]。从 1986 年全球第一个鼠源性单抗药物 Muromonab OKT3 上市以来,单抗类药物经历了人鼠嵌合单抗(第 2 代)、人源化单抗(第 3 代)的进步,已发展至如今的第 4 代的全人源化产品。

治疗性单抗类药物属于结构复杂的生物大分子,经过细胞培养、分离纯化和运输保存等过程,容易发生不均一性变化,如形成二聚体和多聚体、发生末端氨基酸突变、脱酰胺化和糖链变化等结构的变异[5]。这些变异和不均一性将严重影响单抗类抗肿瘤药物的临床效果和安全性。随着生产工艺的不断优化和分析技术的进步,单克隆抗体药物的质量控制将日趋规范和严格,各国药品监督管理部门也在不断提升该类产品的质量控制要求。有效的质量控制分析方法是进行原液和成品质量控制、确保单抗类产品安全性和有效性的基础。目前,单抗类产品质量控制与分析的主要方法包括高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)法、酶联免疫吸附测定(enzyme linked immune-sorbent assay, ELISA)法、毛细管区带电泳(capillary zone electrophoresis, CZE)法、毛细管等电聚焦电泳(capillary iso-electric focusing, cIEF)法、成像毛细管等电聚焦电泳(imaging CIEF, iCIEF)法和十二烷基硫酸钠-毛细管电泳(capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate, CE-SDS)法等。本文分析单抗类产品分析技术与应用进展,为单抗类药物原液和成品的质量控制提供参考。

1 单抗类抗药物

单抗类药物是生物药物领域的热点和研发的焦点,是现代生物制药行业中占比最大、增长最快的细分领域。根据生产技术和工艺的不同,单抗类药物发展经历了 4 代。第 1 代为鼠源单抗,通过小鼠细胞生产抗体,产品的不良反应发生率高(50% ~ 80%);第 2 代为人鼠嵌合单抗,使用人源 C 区替代鼠源 C 区,临床应用的不良反应发生率相对较低(1% ~57%);第 3 代为人源化单抗,采用互补决定区(complementary determining region, CDR)移植体和特异性决定残基(specificity-deter mining residue, SDR)移植体生产,临床应用的不良反应发生率低(<10%);第 4 代为全人源化单抗,采用基于噬菌体展示技术的全人单抗技术平台生产,不良反应发生率极低[6]。

单抗类抗肿瘤药物是单抗类药物家族的重要成员,因其具有较高的特异性和较低的不良反应发生率以及患者的耐受性好而得到广泛应用[7-8]。近年来美国 FDA 和国家药品监督管理局(NMPA)均批准了一系列用于治疗恶性肿瘤的单抗类药物,如曲妥珠单抗(赫赛汀)、利妥昔单抗注射液(美罗华)等,见表 1。值得指出的是,NMPA 近 2 年新批准了一系列的单抗类抗肿瘤药物,包括信迪利单抗注射液(2018 年 12 月获批)、特瑞普利单抗注射液(2018 年 12 月获批)、注射用卡瑞利珠单抗(2019 年 5 月获批)和替雷利珠单抗注射液(2019 年 12 月获批)等,标志着抗肿瘤免疫治疗进入了“中国创新时代”[9-10],见表 1。

表 1 部分已批准上市的单抗类抗肿瘤药物

通用名(商品名)	类别/代次	作用机制	适应证/最早批准时间
利妥昔单抗注射液(美罗华)	第 2 代嵌合抗原(鼠人嵌合型)	与 CD20 结合,诱导细胞凋亡;补体依赖的细胞毒作用和抗体依赖细胞的细胞毒作用直接杀伤肿瘤细胞	复发或耐药的滤泡性中央型淋巴瘤/FDA(2004 年)[11]
曲妥珠单抗(赫赛汀)	第 3 代人源化单抗	附着在 Her2 上来阻止人体表皮生长因子在 Her2 上的附着,从而阻断癌细胞的生长	HER2 高表达乳腺癌/FDA(1998 年)[12]
西妥昔单抗(爱必妥)	第 2 代嵌合抗原(鼠人嵌合型)	与癌细胞表面的 EGF 受体特异性结合,竞争性阻断 EGF 和酪氨酸激酶(TK)结合促进细胞凋亡	转移性结直肠癌,头颈部鳞癌/FDA(2004 年)[13]
尼妥珠单抗(泰欣生)	第 3 代人源化单抗	竞争性抑制内源性配体与 EGFR 结合	EGFR 阳性的头颈部鳞癌,鼻咽癌/NMPA(2008 年)[14]
贝伐珠单抗(安维汀)	第 3 代人源化单抗	与 VEGF 结合减少内皮细胞增殖和心血管形成来抑制肿瘤转移	各类转移性癌症/FDA(2004 年)[15]
碘[^{131}I]美妥昔单抗注射液(利卡汀)	第 2 代嵌合抗原(鼠人嵌合型)	可与分布在肝癌细胞膜蛋白中的 HAb18G 抗原结合,将其荷载的放射性碘[^{131}I]输送到肿瘤部位,从而产生抗肿瘤作用	不能手术切除或术后复发的原发性肝癌;不适宜作动脉导管化学栓塞(TACE)或经 TACE 治疗后无效、复发的晚期肝癌患者/NMPA(2005 年)[16]
信迪利单抗注射液(达伯舒)	第 3 代为人源化单抗	通过结合 PD-1 并阻断 PD-1 与 PD-L1 和 PD-L2 的结合,解除免疫抑制效应,激活 T 细胞功能,增强 T 细胞对肿瘤的免疫监视能力和杀伤能力,产生肿瘤免疫应答	经典型霍奇金淋巴瘤/NMPA(2018 年 12 月)[17]
特瑞普利单抗注射液(拓益)	第 3 代为人源化单抗	封闭 T 淋巴细胞的 PD-1,阻断其与肿瘤细胞表面 PD-L1 结合,解除肿瘤细胞对免疫细胞的免疫抑制,使免疫细胞重新发挥抗肿瘤细胞免疫作用而杀伤肿瘤细胞	既往标准治疗失败后的局部进展或转移性黑色素瘤/NMPA(2018 年 12 月)[18]
注射用卡瑞利珠单抗(艾立妥)	第 3 代为人源化单抗	与人 PD-1 受体结合并阻断 PD-1/PD-L1 通路,恢复机体的抗肿瘤免疫力,从而形成癌症免疫治疗基础	复发或难治性经典型霍奇金淋巴瘤/NMPA(2019 年 5 月)[19]
替雷利珠单抗注射液(白泽安)	第 3 代为人源化单抗	与人 PD-1 受体结合并阻断 PD-1/PD-L1 通路发挥治疗作用	复发或难治性经典型霍奇金淋巴瘤/NMPA(2019 年 12 月)[20]

2 单抗类药物的质量控制参数

单抗类抗肿瘤药物分子结构复杂,容易发生二聚体和多聚体、末端氨基酸突变等不均一性变化,严重影响临床用药的安全性和有效性。对抗肿瘤类单抗产品的原液和成品进行有效质量控制是确保该类产品安全性和有效性的重要措施。以我国最近批准的 PD-1/PD-L1 抑制剂类单抗为例,原液的质量控制参数主要包括鉴别(等电点、肽图谱)、理化检定(外观、pH、渗透压摩尔浓度)、纯度(单体含量、重链、非糖基化重链和轻链等)、杂质(蛋白质 A 残留量、宿主细胞 DNA 残留量、宿主细胞蛋白残留量)、生物学活性(或效价)、蛋白质含量、细菌内毒素和微生物限度、糖基化分析、聚山梨酯 20 等。PD-1/PD-L1 抑制剂类单抗成品的质量控制的参数包括鉴别(等电点、肽图谱)、理化检定(外观、可见异物、不溶性微粒、装量、pH、渗透压摩尔浓度、复溶时间、水分)、纯度(单体含量、重链、非糖基化重链和轻链等)、生物学活性(或效价)、结合活性、蛋白质含量、无菌和细菌内毒素、异常毒性、聚山梨酯 20、聚山梨酯 80 含量、甘露醇含量等。

3 单抗类抗肿瘤药物参数分析的主要技术

单抗类抗肿瘤产品参数分析的主要技术包括 HPLC 法、ELISA 法、CZE 法、cIEF 法、CE-SDS 法等。

3.1 HPLC 法 用于单抗类抗肿瘤产品的分析的 HPLC 方法主要有反向-超高效液相色谱法(reverse phage-ultra high performance liquid chromatography,RP-UHPLC)、体积排阻色谱(size exclusion high performance liquid chromatography,SEC-HPLC)、阳离子交换高效液相色谱(cation exchange high performance liquid chromatography,CEX-HPLC)、离子交换高效液相色谱(ion exchange-high performance liquid chromatography,IEC-HPLC)和荧光检测器-高效液相色谱仪

(fluorescence detector HPLC,FLD-HPLC)等[21-24]。

肽图谱分析是通过蛋白酶或其他化学物质对蛋白质进行裂解后采用适宜的方法对蛋白质的一级结构的完整性和准确性进行鉴别的手段。胰蛋白酶水解联合 RP-HPLC 或 RP-UHPLC 是《中华人民共和国药典》收载的用于生物制品肽图检查的方法之一,也是抗肿瘤类单抗鉴别的重要参数。另外,高效液相色谱-质谱联用技术鉴定蛋白质一级结构准确度高,也用于分析单抗类产品的肽图。SEC-HPLC 法是分析单抗分子大小异质性的主要手段,能够全面反映单体、单抗聚体和残体等的信息,是单抗类产品纯度和杂质质量控制的重要方法。IEC-HPLC 可用于分析单克隆抗体抗肿瘤药物中不同电荷异构体的比例,与 cIEF 手段结合可有效分析单抗类抗肿瘤药物的酸性峰、碱性峰和主峰。CEX-HPLC 属于离子交换色谱范畴,主要用来分析等电点为弱碱性单抗药物的电荷异质性。有研究发现,CEX-HPLC 可以有效分离重组人源化抗白细胞分化抗原 52(cluster of differentiation 52,CD52)单克隆抗体的酸性、中性及碱性电荷变异体,且专属性、线性、准确性、精密度和耐用性良好[25]。将人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)18 型 L1 抗原用胰蛋白酶水解后的肽段用反向液相色谱(RP-HPLC)法分离得到抗原肽图,并采用 HPLC-MS/MS 肽图特征峰分析可对不同企业生产的 18 型的 HPV L1 抗原进行鉴别与质量控制[26]。郭莎等[27]通过采用 SEC-HPLC 可有效分析单体的峰面积,采用 IEC-HPLC 可有效检测酸性区峰面积、主峰峰面积、碱性区峰面积,并以此建立了抗 PD-L1 单抗的多种质控方法。在建立抗白细胞分化抗原 38(cluster of differentiation 38,CD38)单克隆抗体关键质量属性质控方法时也证实 SEC-HPLC 分析可用于 CD38 纯度控制[28]。采用 HPLC-肽图法对抗人 CD52 单抗的专属性鉴别时也证实辅料制剂和异种抗体对 CD52 单抗的检测结果无干扰,且 HPLC-肽图适于 CD52 单克隆抗体的专属性鉴别、质量控制和产品批放行[29]。同时,在建立 PD-1 单克隆抗体关键质量指标质控方法时也发现 SEC-HPLC 法、RP-HPLC 法及 CEX-HPLC 法可进行 PD-1 单克隆抗体单体的纯度、单体和聚合体含量、电荷变异体分析,这些方法是 PD-1 单克隆抗体制品常规质量控制的有效方法[30]。

3.2 ELISA 法 ELISA 法是继免疫荧光和放射免疫技术之后出现的免疫酶技术,通过将可溶性的抗体或抗原分子结合到固相载体上,然后利用抗原-抗体特异性结合特性的免疫反应进行定性或定量的分析方法[31-32]。在抗肿瘤类单抗药物质量控制过程中,ELISA 法可用于分析蛋白 A 残留、宿主细胞蛋白残留,细胞竞争性或配体竞争性 ELISA 法可用于单抗类药物生物学活性的分析。采用竞争抑制 ELISA 法发现抗血管内皮生长因子 165(VEGF165)单抗 VG2 抑制 VEGF 与受体结合,提示 VG2 单抗能够抑制 VEGF 引起的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的增殖,即竞争抑制 ELISA 方法可作为 VG2 单抗生物学活性质量评价的手段[33]。宋媛媛等[34]成功建立了基于 ELISA 法进行人血清中重组人鼠嵌合型抗 CD20 单克隆抗体注射液(SCT400)和利妥昔单抗免疫原性分析和药物浓度检测方法,并成功运用于临床试验样本的免疫原性检测。另外,采用 ELISA 定量检测方法分析抗 CD52 单克隆抗体中残留蛋白 A 的定量限为 0.16 ng·mL^{-1},蛋白 A 的加标回收率均处于 80% ~120%,即 ELISA 定量检测方法检测抗 CD52 单抗中蛋白 A 残留量的专属性、准确度、精密度和线性均良好[35]。但 ELISA 法用于单抗类抗肿瘤药物质量分析时也存在一定的局限性,如需经过孵育和洗涤等多步操作、容易受到外源或内源性物质的干扰,检测依赖高亲和力和高特异性的高品质单克隆抗体试剂等。已有的证据显示不同的单抗类药物与脱落的蛋白 A 的结合程度不同[36],需要根据不同单抗产品特性进行相关的研究,建立适合于特定单克隆抗体的蛋白 A 残留 ELISA 检测方法。

3.3 CE-SDS 法 十二烷基硫酸钠(SDS)是阴离子表面活性剂,可以断裂蛋白分子分子内和分子间的氢键、破坏其二级结构和三级结构使其伸展。虽与十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)法的电泳原理相同,CE-SDS 是液态胶在毛细管中按照分离量的大小进行蛋白的分离,自动化程度高,分离效率和重复性均优于 SDS-PAGE[37]。在单抗类产品质量控制领域,CE-SDS 法已经基本取代了 SDS-PAGE 法。《中华人民共和国药典》也将 CE-SDS 法作为单抗药物分子大小变异体的分析手段。根据样品处理过程中使用 *N*-乙基顺丁烯二酰亚胺(NEM)或 β 巯基乙醇的不同,CE-SDS 法区分为非还原 CE-SDS 法和还原 CE-SDS 法(使用 β 巯基乙醇、二硫苏糖醇等还原剂进行样品处理)。通过 CE-SDS 法分析可将目标成分和杂质有效分离,且能区分多批重组人源化 PD-1 单抗产品间的细小差异,即

CE-SDS 法适用于 PD-1 单抗产品纯度和相关杂质的质控分析[30]。在应用 CE-SDS 法分析抗 CD52 单抗参比品单体纯度和非糖化重链比例时发现非还原 CE-SDS 法测定单体纯度为 93.57%，还原 CE-SDS 法电泳重链修正峰面积为 66.89%，CE-SDS 法测定抗 CD52 单抗纯度及非糖化重链比例偏差小，结果准确可靠[38]。郭莎等[27]在对抗 PD-L1 单抗的质量控制进行分析时证实还原 CE-SDS 法的轻链与重链峰面积之和为(98.37 ± 0.21)%，非还原 CE-SDS 法主峰峰面积为(96.33 ± 0.15)%，CE-SDS 法可用于抗 PD-L1 单抗纯度的质量控制。在采用 CE-SDS 法分析 HER2 单抗质量时也发现非还原 CE-SDS 法检测的酸性异构体、预洗脱杂质、原液的主峰含量为 90.83%，53.93%，95.83%，小分子杂质含量分别为 9.17%，46.07%，4.17%，还原 CE-SDS 法检测的酸性异构体、预洗脱杂质、原液的轻、重链百分含量分别为 96.80%，78.00%，98.85%，即 CE-SDS 法可用于 HER2 单抗的纯度分析[20]。非糖基化重链是抗体药物质量控制的关键参数，对抗体药物的体内外稳定性、半衰期等生物学活性起关键的作用，而 CE-SDS 法是目前唯一能够将抗体非糖基化重链与重链进行分离和进行准确定量的技术[39]。目前采用 CE-SDS 法分析单抗药物纯度时采用的检测手段主要为紫外检测(UV 和 PDA)和激光诱导的荧光检测。与前者相比，激光诱导的荧光检测灵敏度高，可对痕量的蛋白质进行分析，而紫外检测器可消除背景胶中紫外吸收引起的基线波动，自动积分更准确[40-41]。为保证 CE-SDS 法可靠稳定，研究人员采用了在毛细管两端增加相同的电压、反吸法移取凝胶溶液等手段提高 CE-SDS 法的稳定性，并采用多通道毛细管电泳分析抗体药物纯度以提高检测的通量[42-43]。

3.4 cIEF 法与 iCIEF 法 cIEF 和 iCIEF 均属于毛细管电泳的范畴，在基于电荷的分离技术中其分辨率是最高的[44-45]。根据待分离物质等电点的不同，将其在 pH 梯度内将酸碱两性物进行电泳分离，并最终在与物质等电点相等 pH 值的位置聚集成条带。单抗类产品生产过程中涉及糖基化、末端氨基酸改变、异构化、聚合、分裂等翻译后修饰，而这些修饰均会引起单抗表面电荷的改变，包括直接改变电荷的数目和间接引起构象的改变，即单抗类抗肿瘤药物的电荷异质性。在单抗类抗肿瘤产品质量控制过程中，cIEF 法和 iCIEF法主要用于分析产品的等电点和电荷异质性[46-47]。在对重组抗肿瘤坏死因子 α(TNF-α)全人源单抗分析时发现 cIEF 法和 iCIEF 法可用于主峰与酸性峰的比例分析，但二者检测抗体主峰等电点具有差异性，提示在实际应用时应结合单抗药物的特性和表征选择合适的电荷异质性分析方法[48]。刘振东等[49]建立了 iCIEF 分析血管内皮生长因子受体-抗体 Fc 融合蛋白的电荷异质性，发现 iCIEF 法分离效果明显好于 cIEF 和 IEF，即 iCIEF 法用于重组蛋白类药物电荷异质性及等电点快速、准确、重复性好，能够较好地检测高度糖基化的重组血管内皮生长因子受体-抗体 Fc 融合蛋白产品的电荷异质性，保障了 Fc-融合蛋白类产品生产工艺的稳定性，为该产品质量控制提供了快速、可靠的分析方法。在评价全柱成像毛细管电泳(capillary isoelectric focusing-whole column imaging detection，cIEF-WCID)检测多肽类药物等电点的效果时，证实该方法可快速、准确地分析具有电荷异质性的多肽类产品的等电点，且能够跟踪聚焦过程中样本的迁移特征，对复杂电荷异质性蛋白类药物检测具有较好的分辨率和重复性[50]。美国药典 36 版也收录了 cIEF 作为单抗类药物曲妥珠单抗和利妥昔单抗的电荷异质性分析方法。除了单克隆抗体外，cIEF 也可以对抗体偶联药物(antibody-drug conjugate，ADC)进行电荷异质性的分析[51-52]。

3.5 毛细管凝胶电泳(capillary gel electrophoresis，CGE)法 在毛细管电泳的多种分离模式中，CEZ 法分析主要依靠分子量大小进行分离，cIEF 分析依靠单抗的等电点进行分离，而 CEZ 法是依靠单抗类药物电荷/质量比进行分析，是最简单、最常用的毛细管电泳类型。由于单抗类药物各个变异体之间的质量差别不大，主要变异来自氨基酸的翻译后修饰，具体体现在表面电荷的不同。CEZ 法的分离模式与 cIEF 法相似，但前者比后者更简单、更便捷。CEZ 法与质谱联用后可以依靠后者对毛细管电泳分离的电荷变异体进行结构分析。在对 IgG2 型单抗电荷异质性进行毛细管区带电泳分析时证实 CZE 法可以有效分离 IgG2 单抗电荷异构体，精密度良好，峰面积 RSD < 3.0%，提示 CZE 法可以对该类单克隆抗体的电荷异构体有效分离[53]。在对常用的单克隆抗体电荷异质性分析时证实 IEC 法和 CZE 法在检测的电荷异构体峰面积时结论基本一致，但二者与 CIEF 法和 iCIEF 法检测的抗体主峰等电点存在一定差异[38]。虽然 CEZ 法操作简单便捷，但单抗

类药物的多样性决定了没有任何一个分离条件能对所有的药物实现最佳的分离效果。在采用 CZE 法分析单抗类药物的电荷异质性时,应综合考虑 pH 值、三乙烯四胺(TETA)浓度、羟丙基甲基纤维素(HPMC)或羟丙基纤维素(HPC)等聚合物添加剂等因素。

3.6 定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法及其他 外源性 DNA 是通过病毒感染或基因工程等途径引入靶细胞的其他物种或细胞的 DNA 序列,是单抗类等生物制品质量控制的关键项目[54-55]。现行有效的国际主流药典都对生物制品中外源 DNA 残留做了明确的限度规定。定量 PCR 法、阈值法、荧光染料法及分子杂交等都是分析外源性 DNA 的常用手段,其中定量 PCR 法是目前批准的抗肿瘤类单克隆抗体产品中外源性 DNA 检测的通用方法。最近新上市的信迪利单抗注射液、注射用卡瑞丽珠单抗及特瑞普利单抗注射液等均是来自中国仓鼠卵巢细胞(CHO),经细胞培养、分离和纯化后获得的重组单克隆抗体。目前这类抗肿瘤单抗的质量控制标准中均是采用定量 PCR 法对相应的外源性 DNA 进行分析。

单抗类抗肿瘤产品的原液通常是采用常规法或薄膜过滤法进行微生物限度检查,产品的无菌检查均采用薄膜过滤法进行;蛋白质含量的检测采用紫外分光光度法进行;细菌内毒素检测采用凝胶法进行。支原检查可采用 PCR 法进行初筛和产品放行,但结果存在争议时要以培养法结果为仲裁标准。其他的分析项目,如外观、性状、可见异物、摩尔渗透压、pH 值、装量和不溶性微粒及异常毒性等均采用常规法。

4 问题与展望

单抗类药物已成为制药领域研究的热点和焦点。在全球生物制药领域中,单抗类药物占据了 50% 左右的份额。单抗类抗肿瘤药物是单抗类药物的重要组分,且随着信迪利单抗注射液、特瑞普利单抗注射液、注射用卡瑞利珠单抗和替雷利珠单抗注射液等一系列抗肿瘤单抗的获批,抗肿瘤免疫治疗进入了“中国创新时代”。单抗类抗肿瘤药物为结构复杂的生物大分子,经翻译后修饰容易发生二聚体、多聚体、末端氨基酸突变、糖基化等不均一的变化,严重影响临床用药的安全性和有效性。为确保抗肿瘤类单抗产品安全性和有效性,需对原液和成品进行有效的质量控制。目前单抗类产品质量控制与分析的主要方法包括 HPLC 法、ELISA 法、CZE 法、cIEF 法、iCIEF 法和 CE-SDS 法等。本文对上述的常用分析方法及应用进行了综述,可为相关研究及产品质量控制提供参考。但应当指出的是由于单抗类抗肿瘤药物的迅猛发展,不同的单抗产品质量控制所采用的方法可能与药物的一级结构、二级结构、电荷属性等因素有关。因此,为确保所采用的方法适合于特定的产品,需对产品的理化特性进行分析研究,建立适合于特定单克隆抗体的分析方法。

[参 考 文 献]

[1] TAKAHASHI Y, YASUI T, MINAMI K, *et al*. Radiation enhances the efficacy of antitumor immunotherapy with an immunocomplex of interleukin-2 and its monoclonal antibody[J]. *Anticancer Res*, 2017,37(12):6799-6806.

[2] NAPOLITANO S, MARTINI G, MARTINELLI E, *et al*. Antitumor efficacy of triple monoclonal antibody inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) with MM151 in EGFR-dependent and in cetuximab-resistant human colorectal cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017,8(47):82773-82783.

[3] JUTATHIS K, PONGKITWITOON B, SRITULARAK B, *et al*. Development of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative quality control of derris scandens (roxb.) benth[J]. *J Immunoassay Immunochem*, 2019,40(4):407-418.

[4] NEBIJA D, NOE CR, URBAN E, *et al*. Quality control and stability studies with the monoclonal antibody, trastuzumab: Application of 1D- vs. 2D-gel electrophoresis[J]. *Int J Mol Sci*, 2014,15(4):6399-6411.

[5] KATO Y, OHISHI T, YAMADA S, *et al*. Anti-human epidermal growth factor receptor 2 monoclonal antibody H_2Mab-41 exerts antitumor activity in a mouse xenograft model of colon cancer[J]. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, 2019,38(4):157-161.

[6] 辛中帅,张彦彦,晋小雁,等. 我国已上市治疗用单抗类产品分析[J]. 中国药事,2019,33(9):986-990.

[7] YIN Z, GAO M, CHU S, *et al*. Antitumor activity of a newly developed monoclonal antibody against ROR1 in ovarian cancer cells[J]. *Oncotarget*, 2017,8(55):94210-94222.

[8] THEY L, MICHAUD HA, BECQUART O, *et al*. PD-1 blockade at the time of tumor escape potentiates the immune-mediated antitumor effects of a melanoma-targeting monoclonal antibody[J]. *Oncoimmunology*, 2017,6(10):e1353857.

[9] 朱丹, 李月阳, 宋燕青, 等. PD-1 抑制剂信迪利单抗的临床研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2020,40(1):120-123.

[10] 唐碧霞, 斯璐, 郭军. 特瑞普利单抗治疗黑色素瘤的适应证分析[J]. 中国肿瘤临床, 2019,46(16):857-860.

[11] FADERL S, FERRAJOLI A, WIERDA W, *et al*. Alemtuzumab by continuous intravenous infusion followed by subcutaneous injection plus rituximab in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia recurrence[J]. *Cancer*, 2010,116(10):2360-2365.

[12] DING S, XIONG J, LEI D, *et al*. Recombinant nanocomposites by the clinical drugs of Abraxane® and Herceptin® as sequentially dual-targeting therapeutics for breast cancer[J]. *J Cancer*, 2018,9(3):502-511.

[13] CHEN P, LI X, ZHANG R, *et al*. Combinative treatment of β-elemene and cetuximab is sensitive to KRAS mutant colorectal cancer cells by inducing ferroptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transformation[J]. *Theranostics*, 2020, 10(11):5107-5119.

[14] PATIL VM, NORONHA V, JOSHI A, *et al*. A randomized phase 3 trial comparing nimotuzumab plus cisplatin chemoradiotherapy versus cisplatin chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer[J]. *Cancer*, 2019, 125(18):3184-3197.

[15] YOSHIDA H, KIM YH, SAKAMORI Y, *et al*. A randomized phase II study of maintenance bevacizumab, pemetrexed or bevacizumab plus pemetrexed for advanced non-squamous non-small cell lung cancer[J]. *Anticancer Res*, 2020, 40(5): 2981 - 2987.

[16] LIU J, WANG CY, CAO L, *et al*. Treatment of advanced intrahepatic cholangiocarcinoma with sintilimab combined with tegafur-gimeracil-oteracil potassium capsules (S-1): a case report[J]. *Ann Palliat Med*, 2020, 9(2): 497 - 503.

[17] 国家药品监督管理局. 治疗霍奇金淋巴瘤的首个国产 PD-1 抗体药物信迪利单抗注射液获批上市[EB/OL]. (2018 - 12 - 28). http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2056/334158.html.

[18] 国家药品监督管理局. 首个国产 PD-1 抗体药物特瑞普利单抗注射液获批上市[EB/OL]. (2018 - 12 - 17). http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2094/333924.html.

[19] 国家药品监督管理局. 2020 年 03 月 05 日药品批件发布通知[EB/OL]. (2018 - 3 - 5). http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2455/375293.html.

[20] 国家药品监督管理局. 2020 年 04 月 13 日药品批件发布通知[EB/OL]. (2020 - 4 - 13). http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2455/376455.html.

[21] WANG WH, CHEUNG-LAU J, CHEN Y, *et al*. Specific and high-resolution identification of monoclonal antibody fragments detected by capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate using reversed-phase HPLC with top-down mass spectrometry analysis[J]. *mAbs*, 2019, 11(7): 1233 - 1244.

[22] NAVAS N, HERRERA A, MARTÍNEZ-ORTEGA A, *et al*. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP) HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(29): 9351 - 9363.

[23] GUAN YG, WU XL, MENG HC. Indirect competitive ELISA based on monoclonal antibody for the detection of 5-hydroxymethyl-2-furfural in milk, compared with HPLC[J]. *J Dairy Sci*, 2013, 96(8): 4885 - 4890.

[24] BOND MD, PANEK ME, ZHANG ZR, *et al*. Evaluation of a dual-wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody[J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99(6): 2582 - 2597.

[25] 秦海艳, 安晨, 宋兰兰, 等. 阳离子交换高效液相色谱检测重组人源化抗 CD52 单克隆抗体的电荷异质性[J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(4): 19 - 25.

[26] 柳军凯, 贺鹏飞, 赖燕华,等. 人乳头瘤病毒 18 型 L1 抗原的肽图特征峰分析[J]. 药物分析杂志, 2019,39(10):1836 - 1843.

[27] 郭莎, 王开芹, 武刚, 等. 抗 PD-L1 单抗的质量控制研究[J]. 药物分析杂志, 2019,39(1):13 - 22.

[28] 付志浩, 陈伟, 李萌, 等. 重组抗 CD38 单克隆抗体的质量研究[J]. 药物分析杂志, 2019,39(1):23 - 29.

[29] 乔玉玲, 黄铮, 秦海艳,等. 抗 CD52 单克隆抗体 HPLC-肽图分析方法的建立[J]. 生物技术通报, 2018,34(11):216 - 222.

[30] 郭秋菊, 李雪, 徐志远, 等. 重组人源化抗程序性死亡受体-1 单克隆抗体关键质控方法的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2018,31(4):376 - 382.

[31] ORBEGOZO-MEDINA RA, MARTÍNEZ-SERNÁNDEZ V, PERTEGUER MJ, *et al*. In-plate recapturing of a dual-tagged recombinant *Fasciola* antigen (FhLAP) by a monoclonal antibody (US9) prevents non-specific binding in ELISA[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0211035.

[32] PRASATKAEW W, NANTHANAWAT P, KHONGCHAREONPORN N, *et al*. A monoclonal antibody against lates calcarifer vitellogenin and a competitive ELISA to evaluate vitellogenin induction after exposure to xenoestrogen[J]. *J Environ Sci (China)*, 2019,75(11):325 - 333.

[33] 詹明硕, 刘方杰, 张亚兰. 噬菌体抗体库技术筛选抗 VEGF165 单克隆抗体[J]. 生物技术通讯, 2019,30(3): 348 - 353.

[34] 宋媛媛. 抗肿瘤药物奥希替尼和重组人鼠嵌合型抗 CD20 单克隆抗体的药物浓度分析和药效学研究[D]. 北京协和医学院,2018.

[35] 乔玉玲, 黄峥, 秦海艳, 等. 抗 CD52 单克隆抗体中残留蛋白 AELISA 定量检测方法的验证[J]. 微生物学免疫学进展, 2018,46(1):25 - 29.

[36] 郑逢佳, 贾志君, 谢新遥, 等. 抗体类药物的生物分析方法研究概况[J]. 中国临床药理学与治疗学,2020,25(2):227 - 232.

[37] RUSTANDI RR, WANG Y. Use of CE-SDS gel for characterization of monoclonal antibody hinge region clipping due to copper and high pH stress[J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(21): 3078 - 3084.

[38] 王建锋, 乔玉玲, 秦海燕, 等. 应用 CE-SDS 测定抗 CD52 人源化单克隆抗体参比品单体纯度及非糖化重链比例[J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(15): 2836 - 2840, 2828.

[39] 陈泓序, 屈锋. 毛细管电泳技术在单克隆抗体药物分析中的应用[J]. 色谱, 2018,36(3):195 - 208.

[40] SÄNGER-VAN DE GRIEND CE. CE-SDS method development, validation, and best practice-An overview[J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(18 - 19): 2361 - 2374.

[41] KAHLE J, MAUL KJ, WÄTZIG H. The next generation of capillary electrophoresis instruments: Performance of CE-SDS protein analysis[J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(2): 311 - 325.

[42] ESTERMAN AL, KATIYAR A, KRISHNAMURTHY G. Implementation of USP antibody standard for system suitability in capillary electrophoresis sodium dodecyl sulfate (CE-SDS) for release and stability methods[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 128: 447 - 454.

[43] DADA OO, RAO R, JONES N, *et al*. Comparison of SEC and CE-SDS methods for monitoring hinge fragmentation in IgG1 monoclonal antibodies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 145: 91 - 97.

[44] DAI J, LAMP J, XIA QW, *et al*. Capillary isoelectric focusing-mass spectrometry method for the separation and online characterization of intact monoclonal antibody charge variants[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(3): 2246 - 2254.

[45] HOSKEN BD, LI C, MULLAPPALLY B, *et al*. Isolation and characterization of monoclonal antibody charge variants by free flow isoelectric focusing[J]. *Anal Chem*, 2016, 88(11): 5662 - 5669.

[46] SUBA D, URBÁNYI Z, SALGÓ A. Capillary isoelectric focusing method development and validation for investigation of recombinant therapeutic monoclonal antibody[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 114: 53 - 61.

[47] NICHOLS P, LI L, KUMAR S, *et al*. Rational design of viscosity reducing mutants of a monoclonal antibody: hydrophobic versus electrostatic inter-molecular interactions[J]. *mAbs*, 2015, 7(1): 212 - 230.

[48] 王文波, 武刚, 于传飞, 等. 治疗性单克隆抗体电荷异质性分析方法比较[J]. 药物分析杂志, 2017,37(8):1383 - 1388.

[49] 刘振东, 韩国华, 杨勇, 等. 全柱成像毛细管等电聚焦(iCIEF)技术分析重组人 IgG VEGFR: Fc-融合蛋白电荷异质性[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 539 - 544.

[50] 孟晓光, 甄里, 刘悦玫, 等. 全柱成像毛细管等电聚焦电泳分析蛋白质药物电荷异质性[J]. 分析测试学报, 2017, 36(3): 343 - 348.

[51] LIN J, LAZAR AC. Determination of charge heterogeneity and level of unconjugated antibody by imaged cIEF[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1045: 295 - 302.

[52] ZHU GJ, SUN LL, WOJCIK R, *et al*. A rapid cIEF-ESI-MS/MS method for host cell protein analysis of a recombinant human monoclonal antibody[J]. *Talanta*, 2012, 98: 253 - 256.

[53] 王文波, 于传飞, 张峰, 等. 基于毛细管区带电泳的 IgG2 型单抗电荷异质性分析方法的建立[J]. 中国药学杂志, 2018, 53(8): 627 - 631.

[54] 陈继军, 南建军, 乔玉玲,等. 重组抗 CD52 单克隆抗体亲和层析纯化工艺的优化[J]. 中国生物制品学杂志, 2019,32(4):439 - 444.

[55] 赵祖波, 陈继军, 赵晓瑞,等. 抗 CD52 单克隆抗体外源 DNA 残留量检测方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2017,30(12):1305 - 1310.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 04 - 07