·生物医药前沿·

重组抗白细胞介素 23 单克隆抗体的质量研究

付志浩,武　刚,李　萌,崔永霏,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方法及其标准化重点实验室,北京 102629)

[**摘要**]　**目的**:针对白细胞介素-23 单克隆抗体(抗 IL-23 单抗)的关键质量属性建立质控方法。**方法**:采用基于反向高效液相色谱法(RP-HPLC)的肽图法进行鉴别;采用还原/非还原十二烷基磺酸钠毛细管电泳(CE-SDS)和分子排阻色谱(SEC-HPLC)进行纯度控制;采用成像毛细管等电聚焦电泳(icIEF)测定电荷异质性;采用 RP-HPLC 测定轻链 95 位天冬氨酸异构体(light chain isoAsp95,LC isoAsp95);采用基于 U2OS IL23R/IL12RB1 二聚化分析细胞的化学发光法测定生物学活性。其他各项指标均应符合《中华人民共和国药典》2015 年版以及其他相关要求。**结果**:肽图检测具有特征图谱,起到很好的鉴别作用。还原 CE-SDS 的重链、非糖基化重链(nonglycosylated heavy chain,NGHC)和轻链峰面积之和百分比为(97.84 ± 0.12)%,非还原 CE-SDS 主峰峰面积百分比为(97.23 ± 0.11)%;SEC-HPLC 单体的峰面积百分比为(99.26 ± 0.005)%,总聚集体峰面积百分比为(0.71 ± 0.005)%。icIEF 分析的主峰的峰面积百分比为(73.83 ± 0.29)%,酸性峰的峰面积百分比为(24.03 ± 0.34)%,碱性峰的峰面积百分比为(2.10 ± 0.09)%;供试品 LC isoAsp95 的百分比为(3.37 ± 0.52)%;供试品相对于参比品的相对生物学活性为(102.25 ± 8.47)%。**结论**:针对抗 IL-23 单抗的质量属性,研究建立质控方法并进行质量研究,确保产品的安全有效且质量可控,对抗 IL-23 单抗的质量控制具有借鉴意义。

[**关键词**]　抗白细胞介素 23 单克隆抗体;银屑病;肽图鉴别;纯度测定;生物学活性
[**中图分类号**] R917　　[**文献标志码**] A　　[**文章编号**] 1003 - 3734(2021)19 - 1738 - 08

Quality study of recombinant anti-interleukin-23 monoclonal antibodies

FU Zhi-hao, WU Gang, LI Meng, CUI Yong-fei, WANG Lan
(*Division of Monoclonal Antibodies, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing* 102629, *China*)

[**Abstract**]　**Objective**: To develop quality control methods for recombinant anti-interleukin-23 monoclonal antibodies (anti-IL23 mAb). **Methods**: Peptide map analysis by RP-HPLC was used for identification of an anti-IL-23 mAb. The purity was measured by reduced/non-reduced capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfonate (CE-SDS) and size exclusion-high performance liquid chromatography (SEC-HPLC). Charge heterogeneity was measured by imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis (icIEF). LC isoAsp95 was measured by RP-HPLC. The biological activity was determined on U2OS IL23R/IL12RB1 dimerization cell. Other quality control items complied with corresponding requirements of "Chinese Pharmacopeia" 2015 edition and related guidelines. **Results**: Peptide mapping showed the specific spectrum of the anti-IL23 mAb, which could be adopted for the identification

[**基金项目**]　国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09736008-006):自身免疫疾病治疗的单抗类生物类似药质量评价和国家标准品建立

[**作者简介**]　付志浩,男,副研究员,主要从事单克隆抗体质量控制研究。E-mail:fuzhihao@nifdc.org.cn。共同第一作者:武刚,男,主要从事单克隆抗体质量控制研究。E-mail:wugangcailiao@163.com。
[**通讯作者**]　王兰,女,研究员,主要从事单克隆抗体质量控制研究。E-mail:iamouran@163.com。

test. The area percentage of heavy chain, NGHC and light chain was (97.84 ± 0.12)% as detected by reduced CE-SDS; the area percentage of main peak detected by non-reduced CE-SDS was (97.23 ± 0.11)%. The area percentage of monomer peak and total aggregate peak detected by SEC-HPLC were (99.26 ± 0.005)% and (0.71 ± 0.005)%, respectively. The area percentage of main peak, acid peak and alkaline peak detected by icIEF were (73.83 ± 0.29)%, (24.03 ± 0.34)% and (2.10 ± 0.09)%, respectively. The percentage of LC isoAsp95 was (3.37 ± 0.52)%. The relative biological activity was (102.25 ± 8.47)%. **Conclusion**: A series of quality control methods for anti-IL23 mAbs has been established, which can be adaptable in ensuring the safety, effectiveness and quality controllability for similar biologics. The study is of great significance as a representative quality control reference for anti-IL23 mAbs.

[**Key words**] anti-interleukin-23 monoclonal antibodies; psoriasis; peptide mapping identification; purity determination; biological activity

白细胞介素-23(interleukin-23, IL-23)由 Oppmann 等[1]在 2000 年发现,是 IL-12 家族中重要的促炎性细胞因子,主要由单核巨噬细胞和树突状细胞分泌。IL-23 是由 2 个不同蛋白亚基组成的异二聚体细胞因子,这 2 个亚基根据其分子量(40 和 19 kDa)分别称作 p40 和 p19,其中 p40 也是 IL-12 的共同亚基。IL-23 与受体复合物(IL-23R 和 IL-12RB1)特异性结合后可激活下游的蛋白酪氨酸激酶 2(JAK2),然后转录激活因子 3(STAT3)被 JAK2 磷酸化,最终诱导 IL-17 和 IL-22 生成。在此过程中,还可产生肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α),IL-6, IL-21 等炎性细胞因子[2]。IL-23 在银屑病、类风湿关节炎、强直性脊柱炎和系统性红斑狼疮等自身免疫疾病的发病中起重要作用[3]。

银屑病是一种常见的慢性炎症性多系统疾病,主要表现为皮肤和关节症状,大约 90% 的银屑病患者有斑块状银屑病,其中 20% 患有中重度斑块状银屑病。银屑病的发病机制涉及遗传易感人群中的环境因素和免疫调节异常,目前已发现 20 余种与银屑病发病相关的基因,证实了银屑病发病具有遗传易感性[4]。流行病学调查发现,全世界范围内银屑病的患病率为 2.5%,中国人群中成人患病率为 0.47%[5]。IL-23/IL-17 通路在银屑病的发病机制中发挥重要作用,阻断或抑制该通路中的反应进程,最终可导致 IL-17 等炎性因子减少,从而达到改善银屑病症状或延缓疾病进程的目的[6]。针对这一通路,目前已有多种单克隆抗体药物(以下简称“单抗”)获批上市,使银屑病的治疗进入生物治疗时代[7],其中包括靶向 IL-17 的 secukinumab[8], ixekizumab[9] 和 brodalumab[10],靶向 IL-12/IL-23 的共同亚基 p40 的 ustekinumab[11],靶向 IL-23 p19 亚基的 guselkumab, tildrakizumab 和 risankizumab[12-13]。根据已报道的几项Ⅲ期临床试验结果显示[14-15],在 48 周内,guselkumab 治疗银屑病的效果优于阿达木单抗,同时对阿达木单抗和 ustekinumab 治疗无效的患者也有较好的疗效。在头对头 PKECLIPSE Ⅲ期研究中,guselkumab 与 secukinumab 用于治疗中重度斑块状银屑病,48 周的结果显示,guselkumab 疗效优于 secukinumab。鉴于 guselkumab 显示出治疗银屑病的优异疗效,抗 IL-23 单抗受到广泛的关注,国内亦有企业开展抗 IL-23 单抗的临床前研究。

本研究所用抗 IL-23 单抗是由中国仓鼠卵巢细胞(CHO)表达,经细胞培养、纯化制备获得,是一种新靶点 IgG1 型抗体。为了安全有效地对抗 IL-23 单抗进行质量控制,根据《中华人民共和国药典》及 ICH 等相关指导原则的要求,针对肽图、十二烷基磺酸钠毛细管电泳(CE-SDS)、分子排阻色谱(SEC-HPLC)、成像毛细管等点聚焦电泳(icIEF)、生物学活性等产品的关键质量属性进行探讨,为抗 IL-23 单抗的质量控制提供参考[16]。

材料与方法

1 样品和试剂

抗 IL-23 单抗的参比品和样品均为本实验室留样。生物学活性检测用重组人 IL-23(eBioScience 公司, Cat. No.:34-8239);McCoy's 5A 培养基(Iwakata & Grace 改性, Cat. No.:16600-082)、热灭活胎牛血清(Cat. No.:16140-063)购自 Gibco 公司;潮霉素 B(Cat. No.:30-240-CR)、G418(Cat. No.:30-234-CR)、0.25% 胰蛋白酶/EDTA(Cat. No.:25-053-CI)购自 Corning 公司;牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司, Cat. No.:A7638);PathHunter® FLASH 检测试剂盒(Dis-

coverX 公司,Cat. No. :93-0247),使用时将 Flash 底物和 Flash 细胞检测缓冲液以 4∶1混匀配制 PathHunter® Flash 检测试剂工作溶液;SDS-MW 分析试剂盒含有 SDS 样品缓冲液(SDS-MW Gel Buffer,0.1 mol·L^{-1} 氢氧化钠,0.1 mol·L^{-1}盐酸,Cat. No. :390953);载体两性电解质 Pharmalyte 3 ~ 10(Cat. No. :17-0456-01),Pharmalyte 8 ~ 10.5(Cat. No. :17-0455-01)购自 GE Healthcare 公司;iCE3 试剂盒(包括 0.5% 和 1% 甲基纤维素,阳极及阴极电解液)、涂层毛细管、pI markers 8.18(Cat. No. :102408)和 9.77(Cat. No. 102219)均购自 ProteinSimple 公司;羧肽酶 B(CPB,Sigma 公司,Cat. No. :C9584);Agilent 7100-CMP Scientific EMASS-II-Agilent 6230 TOF,CR3520 cIEF-MS 试剂盒、分离毛细管(CMP Scientific 公司);Lys-C 消化酶(WAKO 公司,Cat. No. :125-05061)。

2 仪器

1260 HPLC 系统(Agilent 公司),包含毛细管 HPLC 泵,MWD 多波长紫外/可见光检测器;Analyt-FC 馏分收集器及 ALS 恒温器(Agilent 公司);G－25 脱盐柱(GE Healthcare 公司,Cat. No. :17-0853-2);Phenomenex Kinetex 色谱柱(150 mm×2.1 mm,2.6 μm,Cat. No. :00F-4462-AN);PA800 plus 毛细管电泳系统(Beckman 公司的系统);PDA 检测器、Beckman 毛细管(31 cm × 50 μm,有效长度 21 cm)均购自 Beckman Coulter 公司;SEC-HPLC 检测采用 Waters 2695 高效液相色谱仪,2487 紫外检测器,色谱柱为 TOSOH TSK-GEL BioAssist G3SWXL(300 mm × 7.8 mm,5 μm,Cat. No. :20026),保护柱为 TOSOH SWX-LPEEK(40 mm × 6 mm,7 μm,Cat. No. :18008);iCE3 毛细管等点聚焦成像仪(ProteinSimple 公司);SpectraMax® M5 多功能酶标仪及 Softmax®分析软件(美国 Molecular Devices 公司)。

3 细胞

U2OS IL23R/IL12RB1 二聚化分析细胞(DiscoverX 公司,Cat. No. : 93-1007C3),2 个受体亚基 IL23R 和 IL12RB1 分别融合表达了 β-gal 酶分子的供体片段和受体片段,IL23 结合受体后可诱导 IL23R 和 IL12RB1 发生二聚化,从而使 β-gal 酶分子的供体和受体相结合恢复 β-gal 酶活性,在底物存在下即可产生化学发光信号。

4 方法

4.1 肽图法

取脱盐干燥后的蛋白 0.25 mg,加入 150 μL 变性缓冲液(6.0 mol·L^{-1} GuHCl,50 mmol·L^{-1} Tris-HCl,5 mmol·L^{-1} Na_2-EDTA,pH 8.0)混匀,然后加入 1 mol·L^{-1}二硫苏糖醇 1.5 μL,混匀后置于 37 ℃水浴 1 h。取出后加入 1 mol·L^{-1}碘乙酰胺 3 μL,室温避光孵育 60 min。然后加入 3.5 μL 1.0 mol·L^{-1} DTT,混合后加入 750 μL 消化缓冲液(50 mmol·L^{-1} Tris-HCl,pH 8.0),混合后加入 16 μL 0.5 mg·mL^{-1} Lys-C 溶液,放入 37 ℃水浴 4 h。加入 4 μL TFA 并混合以灭活 Lys-C。采用 Agilent 1260 HPLC 系统,Phenomenex Kinetex 色谱柱(150 mm×2.1 mm,2.6 μm)分离。检测条件:流动相 A 为 0.% 的 TFA 水溶液,流动相 B 为 0.1% 的 TFA 乙腈溶液,进行梯度洗脱(0 ~ 3 min,0% 流动相 B;3 ~ 7 min,0% →2% 流动相 B;7 ~ 10 min,2% →5% 流动相 B;10 ~ 40 min,5% → 20% 流动相 B;40 ~ 87 min,20% →33% 流动相 B;87 ~ 100 min,33% →3 5% 流动相 B;100 ~ 103 min,35% →70% 流动相 B;103 ~ 106 min,70% →100% 流动相 B;106 ~ 110 min,维持 100% 流动相 B;110 ~ 111 min,100% →0% 流动相 B;111 ~ 117 min,维持 0% 流动相 B);流速 0.3 mL·min^{-1};上样体积 100 μL;样品室温度 4 ℃;柱温 40 ℃;检测波长 214/280 nm,检测时间 117 min。

4.2 CE-SDS 法

用超纯水将样品稀释至 10 mg·mL^{-1},取 30 μL 样品加入 5 倍稀释的巯基乙醇 5 μL 和 SDS 样品缓冲液 161 μL(还原),取 30 μL 样品加入 0.125 mol·L^{-1}*N*-乙基马来酰亚胺 10 μL 和 SDS 样品缓冲液 156 μL(非还原),混匀后 70 ℃水浴 5 min,取 80 μL 置进样瓶中后上机分析。采用 Beckman PA800 plus 毛细管电泳系统,使用无涂层毛细管(总长度 31 cm,有效长度 21 cm)检测。检测条件:分离电压为 15 kV;毛细管温度 25 ℃;样品室温度为 25 ℃;检测波长为 220 nm。计算样品“轻链 + NGHC + 重链”(还原型)及主峰(非还原型)峰面积百分比。

4.3 SEC-HPLC 法

将样品用流动相[0.2 mol·L^{-1}磷酸盐缓冲液,称取 12.8 g $NaH_2PO_4·H_2O$ 和 19.1 g $Na_2HPO_4·2H_2O$ 溶于纯化水中,定容至 1 L,pH (6.8 ±0.1)]稀释至 10 mg·mL^{-1}。采用 Waters 2695 HPLC 系统、2489 紫外检测器、TOSOH TSK-GEL BioAssist G3SWXL(300 mm × 7.8 mm,5 μm)色谱柱进行检测。检测条件:流速为 0.7 mL·min^{-1};进样量 20 μL;进样器温度 4 ℃;柱温为室温;于 280 nm 波长处检测主峰,214 nm

波长处检测其他峰。用波长比系数将 214 nm 处的峰面积校正为 280 nm 处的峰面积,在 280 nm 波长下,通过面积归一化法计算得出所有峰的含量。

4.4 毛细管等点聚焦电泳(cIEF)法

4.4.1 cIEF 法 将 2 μL CPB(5 mg·mL^{-1})加入含 20 μL 样品(10 mg·mL^{-1})的微量离心管中,25 ℃条件下反应 30 min。取 5 与 70 μL 的 1% 甲基纤维素,1 μL 的 pI marker 8.18,1 μL 的 pI marker 9.77,2 μL 的 Pharmalytes 3 ~ 10,6 μL 的 Pharmalytes 8 ~ 10.5 和 115 μL 超纯水混匀。分析条件:聚焦电压 3 kV,持续 5 min。

4.4.2 毛细管电泳串联质谱(cIEF-MS)法 将样品采用 cIEF-MS 试剂盒的缓冲液 C(试剂盒提供)稀释至 0.2 mg·mL^{-1},按 1∶1与试剂盒提供的两性电解质混匀,进样浓度为 0.1 mg·mL^{-1}。毛细管压力进样参数:Flush,20 s,缓冲液 B(试剂盒提供);Flush,45 s,Sample;毛细管电泳分离参数:15 kV,5 mbar;Fragmentor:380 V;Skimmer:300 V;离子源电喷雾参数:2.7 kV,4.0 mm,1.1 mm。

4.5 反相高效液相质谱(RP-HPLC)法分析轻链 95 位天冬氨酸异构体(LC isoAsp95)

样品的前处理同“**4.1**”项,采用 Agilent 1260 HPLC 系统,Phenomenex Kinetex 色谱柱(150 mm × 2.1 mm,2.6 μm)分离。检测条件:流动相 A 为 0.1% 的 TFA 水溶液,流动相 B 为 0.1% 的 TFA 乙腈溶液;进行梯度洗脱(0 ~ 6.7 min,维持 29% 流动相 B;6.7 ~ 36.0 min,29% →36% 流动相 B;36.0 ~ 37.0 min,36% →100% 流动相 B;37.0 ~ 51.0 min,维持 100% 流动相 B;51.0 ~ 52.0 min,100% →0% 流动相 B;52.0 ~ 66.0 min,维持 0% 流动相 B;66.0 ~ 67.0 min,0% →100% 流动相 B;67.0 ~ 80.0 min,维持 100% 流动相 B;80.0 ~ 81.0 min,100% →0% 流动相 B;81.0 ~ 95.0 min,维持 0% 流动相 B;95.0 ~ 96.0 min,0% →100% 流动相 B,96.0 ~ 110.0 min,维持 100% 流动相 B;110.0 ~ 111.0 min,100% →29% 流动相 B;111.0 ~ 125.0 min,维持 29% 流动相 B,流速 0.3 mL·min^{-1});上样体积 100 μL;样品室温度 4 ℃;柱温 40 ℃;检测波长 214/280 nm;检测时间 117 min。

4.6 相对生物学活性测定

取对数生长期的 U2OS IL23R/IL12RB1 细胞,以测定培养基(每升培养基含 900 mL McCoy's 5A 和 100 mL 热灭活胎牛血清)调整细胞为 1.5 × 10^5 个细胞·mL^{-1},取 50 μL 加入到每个平板的所有孔中。在 37 ℃、5% CO_2 的孵箱中培养 30 ~ 120 min。以含 IL-23(20 ng·mL^{-1})的检测培养基将供试品和参比品稀释至起始浓度为 40 000 ng·mL^{-1},然后按照 7 倍系列稀释,共 8 个稀释度。将 50 μL 系列浓度溶液加入到含细胞的 96 孔板适当孔中,置于 37 ℃、5% CO_2 的环境下培养 24 ~ 26 h。取出测定板,并在室温下平衡(30 ± 5) min,每孔中加入 100 μL 的 PathHunter® Flash 检测试剂工作溶液,混匀后于暗处培养 90 ~ 120 min。在 SpectraMax® M5 酶标仪上,采用化学发光模式进行读数,并用 Softmax® 分析软件进行四参数回归,并绘制四参数曲线,根据参比品和样品的半数效应浓度(concentration for 50% of maximal effect,EC_{50}),计算样品的相对生物学活性,计算公式为:样品相对生物学活性/% = 参比品 EC_{50} 值/样品 EC_{50} 值 × 100%。

结 果

1 肽图法

RP-HPLC 肽图检测的代表性图谱见图 1。目视观察,参比品与样品的图谱无明显差异。该方法可对样品进行有效的鉴别。

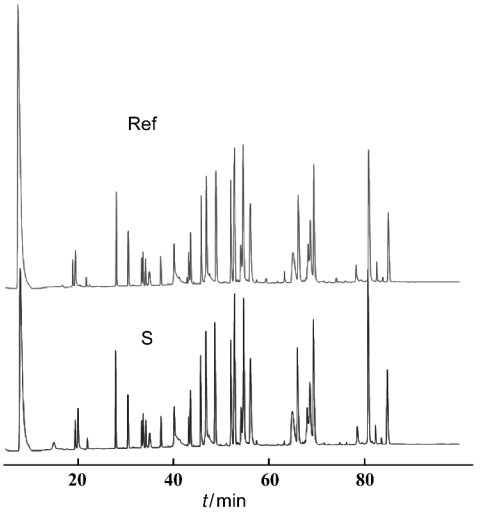


图 1 抗 IL-23 单抗参比品(Ref)与样品(S)的肽图典型图谱

2 还原/非还原型 CE-SDS 法

还原 CE-SDS 检测结果见图 2A,经 6 次测定样品重链 + NGHC + 轻链的峰面积百分比为(97.84 ± 0.12)%,RSD 为 0.12%。非还原 CE-SDS 检测结果见图 2B,经 6 次测定样品主峰峰面积百分比为(97.23 ± 0.11)%,RSD 为 0.11%。

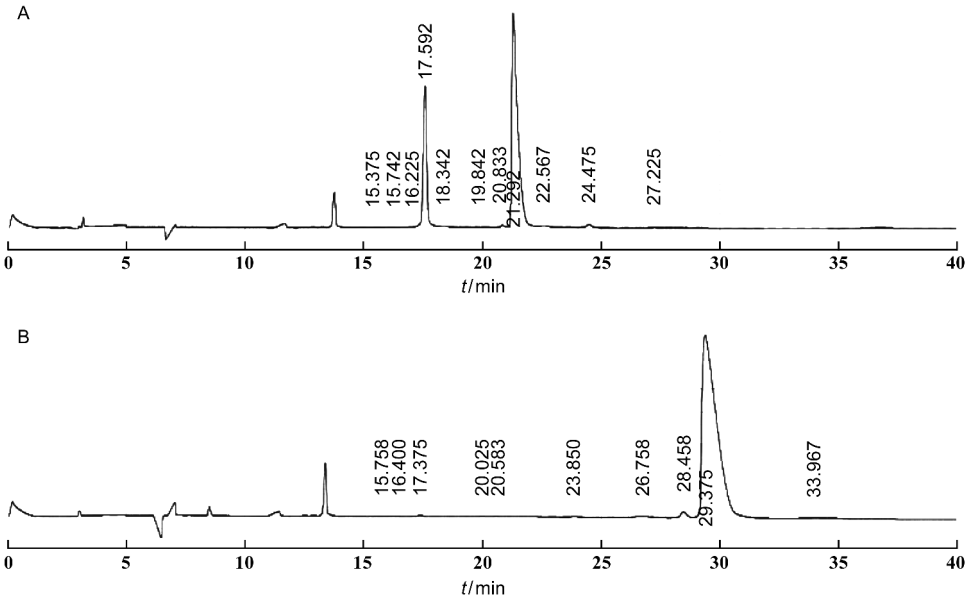


图 2 抗 IL-23 单抗样品的还原 CE-SDS(A)和非还原 CE-SDS(B)代表图谱

3 SEC-HPLC 法

SEC-HPLC 检测结果见图 3,经 6 次测定,10 mg·mL^{-1}供试溶液上样 20 μL(上样量为 200 μg),样品中单体的峰面积百分比为(99.26 ± 0.005)%,RSD 为 0.005%;总聚集体峰面积百分比为(0.71 ± 0.005)%,RSD 为 0.70%。

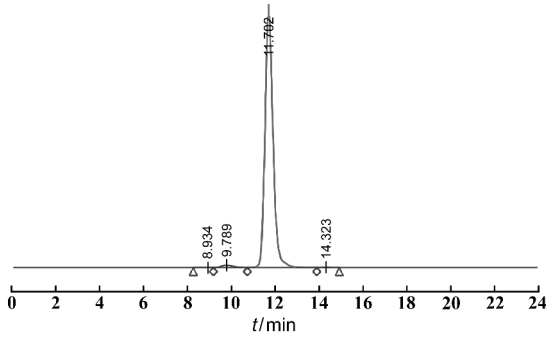


图 3 抗 IL-23 单抗样品的 SEC-HPLC 代表图谱

4 cIEF 分析

4.1 icIEF 分析

样品的 icIEF 代表性图谱见图 4。目视观察,供试品有 1 个主峰(峰 4),酸性峰为等电点小于主峰的所有峰,而碱性峰为等电点大于主峰的所有峰。左侧的酸性峰和右侧的碱性峰得到有效分离。经 6 次测定,主峰的峰面积百分比为(73.83 ± 0.29)%,RSD 为 0.39%;酸性峰的峰面积百分比为(24.03 ± 0.34)%,RSD 为 1.41%;碱性峰的峰面积百分比为(2.10 ± 0.09)%,RSD 为 4.29%。

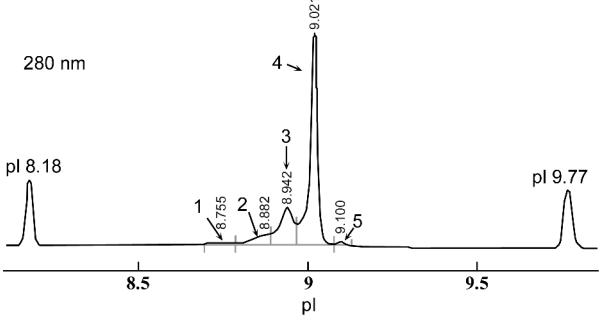
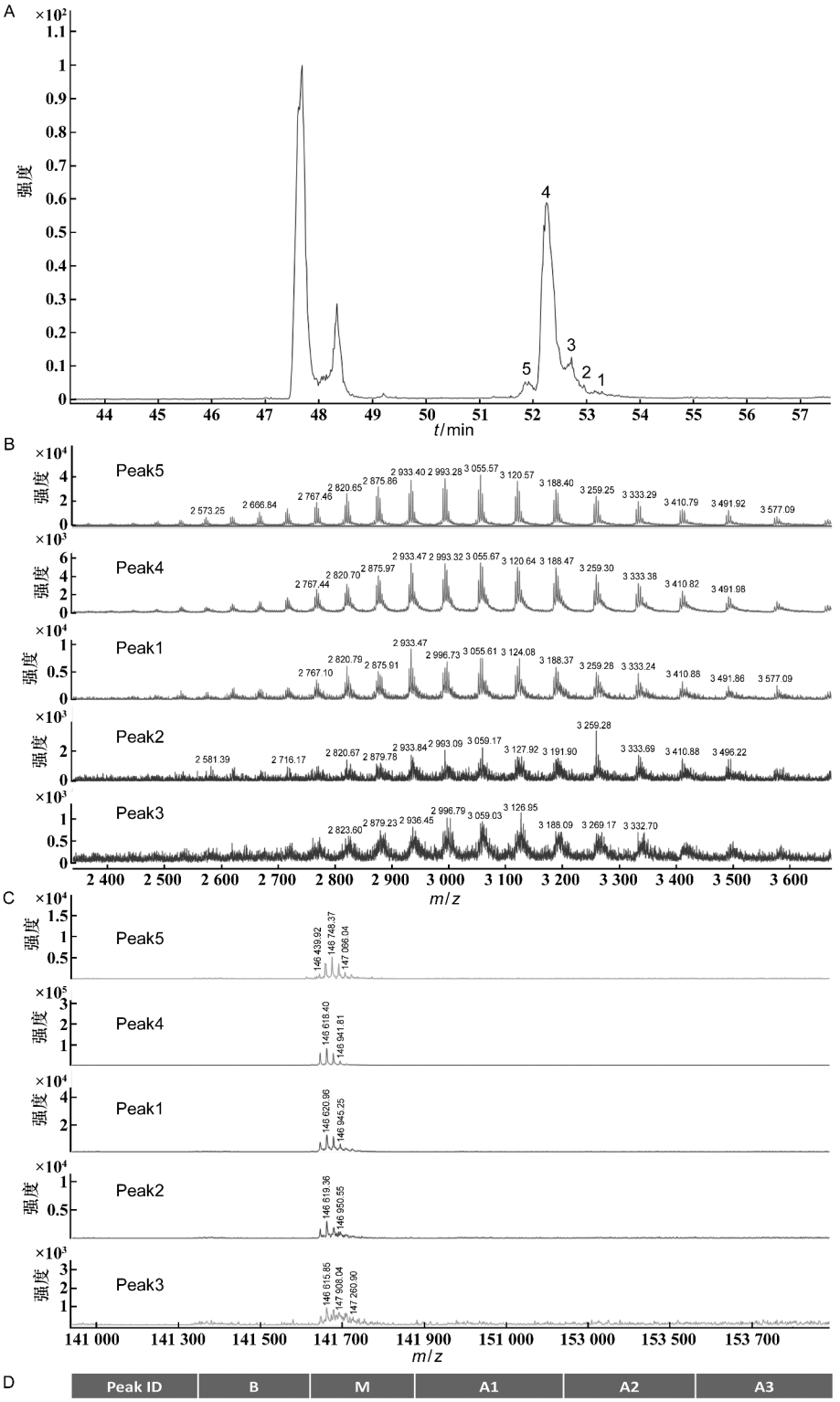


图 4 抗 IL-23 单抗样品的 iCIEF 代表图谱

4.2 cIEF-Mass 定性分析

样品的 cIEF-Mass 分析图谱见图 5,峰型与图 4 中 icIEF 分离得到的图谱基本一致。解卷积后样品的主峰(峰 4)分子量为 146 748.37 Da,酸性峰(峰 1 ~ 3)分子量分别为 146 620.96,146 619.36 和 146 615.85 Da,碱性峰(峰 5)分子量为 146 748.37 Da。根据与主峰分子量差异,推测酸性峰修饰类型主要为脱酰胺引起,碱性峰主要为 C 末端赖氨酸截除不完全引起。



D

Peak ID	B	M	A1	A2	A3
Mass	146748.37	146618.40	146620.96	146619.36	146615.85
ΔM	129.93		2.56	0.96	-2.55
Modification	Lys		3*Deamidation	1*Deamidation	3*Amidation

A：BPE（m/z 2 000～4 000）的 cIEF-MS 分析抗 IL-23 单抗；B：抗 IL-23 单抗电荷变体原始 m/z 质谱；C：抗 IL-23 单抗主要电荷变异体解卷积结果；D：抗 IL-23 单抗主要电荷变异体修饰类型分析

图 5　cIEF-MS 分析抗 IL-23 单抗

5 分析 LC isoAsp95

LC isoAsp95 的 RP-HPLC 代表性图谱见图 6,LC isoAsp95 肽段得到有效分离,经 6 次测定,LC isoAsp95 的百分比为(3.37 ±0.52)%,RSD 为 15.43%。

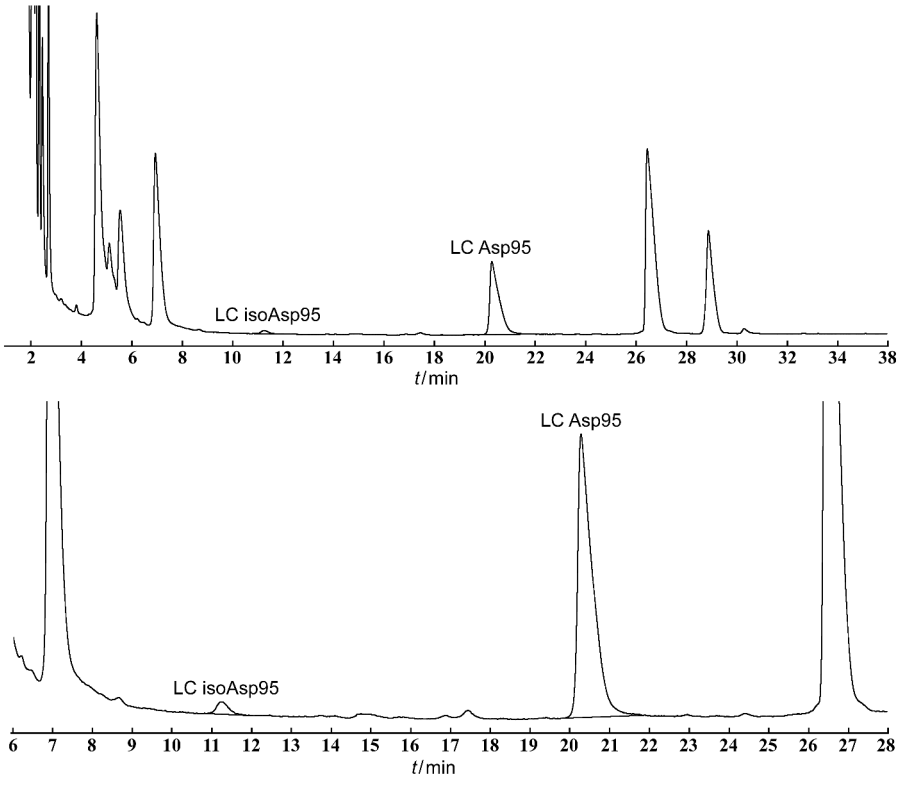


图 6 抗 IL-23 单抗样品的 LC isoAsp95 代表图谱

6 相对生物学活性测定

IL-23 作用于 U2OS IL23R/IL12RB1 二聚化分析细胞,可诱导 IL23R 和 IL12RB1 二聚化,从而使 β-gal 酶分子的供体和受体相结合恢复酶活性,加入底物后可产生化学发光。当不同浓度的抗 IL-23 抗体存在时,可使 IL-23 与受体的结合,抑制受体二聚化程度从而抑制酶活性,如此可建立量效关系以评价样品的生物学活性。经四参数方程拟合,拟合优度 R^2 >0.99。经 6 次测定,与参比品比较,样品相对生物学活性为(102.25 ±8.47)%,RSD 为 8.28%。

讨 论

随着免疫学的发展和对病理机制的深入研究,新的自身免疫病治疗靶点不断出现,除了传统的 TNF 外,IL-17,Blys,IL-23 等靶点的单抗药物相继研发成功上市,使自身免疫疾病的生物治疗领域不断拓展。IL-23 是当前受到广泛关注的一个靶点,特别在银屑病的治疗中显示出良好的效果。国内外许多机构正在开展抗 IL-23 单抗药物的研发工作。鉴于此,开展对其质控方法的研究十分必要。

本研究建立了抗 IL-23 单抗的肽图鉴别方法,肽图检测采用了对脱氨基、甲硫氨酸氧化、C-末端封闭和错误二硫键等结构改变敏感的 Lys-C 肽图,根据供试品和参比品特征图谱的比对进行鉴别。除此之外,还可采用斑点印迹法,从免疫学特性对样品进行鉴别。LC isoAsp95 可能会影响抗体分子的构象,并进而影响其生物学活性,因此需要对其进行控制。本研究基于肽图 RP-HPLC 的分离方法,可以使 LC isoAsp95 得到有效分离,并对其含量进行有效控制。

纯度测定是单抗药物的常规质量控制项目,传统研究单抗大小异质性的方法包括 SDS-PAGE 和 SEC-HPLC。近年来,CE-SDS 由于其高分辨率、自动化、重复性好的优点而得到广泛应用[17]。非还原 CE-SDS 侧重检测不完整抗体;还原 CE-SDS 侧重检测非糖基化重链、断裂片段等。由于重链的糖基化与抗体的 Fc 效应有关,而抗 IL-23 单抗发挥生物效应主要依靠其受体结合活性,因此将非糖基化重链

也纳入活性成分,不进行专门的控制。SEC-HPLC采用温和的条件对 IL-23 单抗进行分离,保持了抗体天然的状态,使得共价和非共价结合的聚体均能与单体进行有效分离。

单抗电荷异质性的评价方法包括平板等点聚焦(IEF)和离子色谱,前者分辨率较差,近年来由于icIEF 的高分辨率、自动化、重复性好等优点,越来越广泛地被应用于单抗等电点和电荷异质性检测。本研究建立了抗 IL-23 单抗的 icIEF 质控方法[18-19],可对样品的酸碱成分进行有效分离和控制。离子交换色谱(IE-HPLC)是常用的电荷异构体控制方法,但针对不同的单抗需要摸索不同的条件,而 icIEF 更易于平台化。与 icIEF 不同,IE-HPLC 的酸碱峰可通过适当手段进行收集,并进一步进行组分鉴别。因此可进一步建立 IE-HPLC 方法评价该产品的电荷异质性,并对各种组分进行功能评价[20]。

抗体药物的活性检测一般包括结合活性和生物学活性,结合活性反映抗体与靶抗原的特异性结合能力,而生物学活性除可反映与靶抗原的特异性结合外,还可反映结合后所产生的生物学效应。本研究建立了基于 U2OS IL23R/IL12RB1 二聚化分析细胞的生物学活性测定方法,可以较好地模拟药物在体内的作用。

本研究针对 IL-23 单抗的质量控制开展研究,针对产品的关键质量属性建立了基于不同原理的质控方法,可用于相关产品的质量评价,以保证产品的安全、有效和质量可控,对我国抗 IL-23 单抗药物的研发具有借鉴意义。

[参 考 文 献]

[1] OPPMANN B, LESLEY R, BLOM B, *et al*. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12[J]. *Immunity*, 2000, 13(5): 715-725.

[2] CAULI A, PIGA M, FLORIS A, *et al*. Current perspective on the role of the interleukin-23/interleukin-17 axis in inflammation and disease (chronic arthritis and psoriasis)[J]. *Immunotargets Ther*, 2015, 4: 185-190.

[3] DUVALLET E, SEMERANO L, ASSIER E, *et al*. Interleukin-23: a key cytokine in inflammatory diseases[J]. *Ann Med*, 2011, 43(7): 503-511.

[4] CAPON F, BARKER JN. The quest for psoriasis susceptibility genes in the postgenome-wide association studies era: charting the road ahead[J]. *Br J Dermatol*, 2012, 166(6): 1173-1175.

[5] TORRES T, ROMANELLI M, CHIRICOZZI A. A revolutionary therapeutic approach for psoriasis: bispecific biological agents[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2016, 25(7): 751-754.

[6] HAWKES JE, YAN BY, CHAN TC, *et al*. Discovery of the IL-23/IL-17 signaling pathway and the treatment of psoriasis[J]. *J Immunol*, 2018, 201(6): 1605-1613.

[7] JEON C, SEKHON S, YAN D, *et al*. Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis[J]. *Hum Vaccines Immunother*, 2017, 13(10): 2247-2259.

[8] ABROUK M, GANDY J, NAKAMURA M, *et al*. Secukinumab in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis: a review of the literature[J]. *Skin Ther Lett*, 2017, 22(4): 1-6.

[9] MAGDALENO-TAPIAL J, CARMENA-RAMÓN R, VALENZUELA-OÑATE C, *et al*. Efficacy and safety of ixekizumab in a real-life practice: a retrospective bicentric study[J]. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*, 2019, 110(7): 585-589.

[10] PUIG L. Brodalumab: The first anti-IL-17 receptor agent for psoriasis[J]. *Drugs Today*, 2017, 53(5): 283.

[11] ELBERDÍN L, FERNÁNDEZ-TORRES R, PARADELA S, *et al*. Ustekinumab treatment for moderate to severe psoriasis. Eight-year real-world follow-up of 61 cases in a tertiary level hospital[J]. *J Dermatol Treat*, 2020, 31(7): 698-701.

[12] BANGERT C, KOPP T. Tildrakizumab for the treatment of psoriasis[J]. *Immunotherapy*, 2018, 10(13): 1105-1122.

[13] MCKEAGE K, DUGGAN S. Risankizumab: first global approval[J]. *Drugs*, 2019, 79(8): 893-900.

[14] NAKAMURA M, LEE K, JEON C, *et al*. Guselkumab for the treatment of psoriasis: a review of phase III trials[J]. *Dermatol Ther (Heidelb)*, 2017, 7(3): 281-292.

[15] LANGLEY RG, TSAI TF, FLAVIN S, *et al*. Efficacy and safety of guselkumab in patients with psoriasis who have an inadequate response to ustekinumab: results of the randomized, double-blind, phase III NAVIGATE trial[J]. *Br J Dermatol*, 2018, 178(1): 114-123.

[16] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2018.

[17] ESPINOSA-DE LA GARZA CE, PERDOMO-ABÚNDEZ FC, PADILLA-CALDERÓN J, *et al*. Analysis of recombinant monoclonal antibodies by capillary zone electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2013, 34(8): 1133-1140.

[18] CAO J, SUN W, GONG F, *et al*. Charge profiling and stability testing of biosimilar by capillary isoelectric focusing[J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(10): 1461-1468.

[19] WU G, YU C, WANG W, *et al*. Interlaboratory method validation of icIEF methodology for analysis of monoclonal antibodies[J]. *Electrophoresis*, 2018, 39(16): 2091-2098.

[20] 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): 578-585.

编辑:刘卓越/接受日期:2021-08-24