

治疗性单克隆抗体类药物分析技术及其应用

陈思颖 孙晓龙

(正大天晴药业集团股份有限公司 江苏 连云港 222000)

[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。单抗类药物发展已经经历了4代。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具体的应用情况进行综述,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;毛细管等电聚焦电泳法;十二烷基硫酸钠-毛细管电泳

[DOI] 10.12252/j.issn.2096-6261.2020.02.1406

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。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。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,采用互补决定区移植体和特异性决定残基(移植体生产,临床应用的不良反应发生率<10%);第4代为人源化单抗,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。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不良反应发生率以及患者的耐受性好而得到广泛应用。

2 分析单抗类抗肿瘤药物参数的主要技术

2.1 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、体积排阻色谱、阳离子交换高效液相色谱、离子交换高效液相色谱和荧光检测器-高效液相色谱仪等。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》记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。

2.2 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。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。

3 抗体药物质量控制

3.1 标准物质的建立

标准物质和检测方法是抗体药物质量控制的两个重要技术支撑点,而性质稳定均一的标准物质是方法学建立中必不可少的重要因素,同时也是后续对抗体药物质量控制的标杆。均一性和稳定性是标准物质最关键的特性。传代细胞系的DNA理论上具有潜在致癌风险,目前残余DNA的检测方法主要包括斑点杂交法、荧光染色法、定量PCR法等。杂交法无需特殊仪器设备,但步骤繁琐,重复性差;荧光染色法虽然简便快捷,但由于抗体药物残余DNA质控标准较高及检测限的原因,荧光染色法通常不适用于抗体药物的DNA残留量控制,所以现在国内厂家基本都采用定量PCR方法进行抗体类药物宿主DNA残留量测定。标准品的建立反映一个国家在制药领域的实力和水平,而建立统一的测定DNA标准品是残留DNA检测方法标准化和规范化前提,WHO和FDA都已经对建立宿主细胞DNA标准品的必要性进行了评价,并准备开展这方面的协作研究工作。

结束语

随着单抗类药物研究的深入及分析技术的发展,质量源于设计(quality by design, QbD)质量控制理念的推广,单抗类药物杂质分析正向自动化、高特异性、高准确度、高灵敏度、微型化及高通量实时快速检测的方向发展,如芯片实验室技术、自动化处理平台技术、高分辨质谱定性定量技术等。这些分析技术的发展正推动着越来越多的新技术、新方法在单抗类药物杂质分析领域得到应用。

参考文献:

- [1]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].中国药理学杂志,2018,53(8):627-631.
- [2]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.