

· 药物研究 ·

一种抗 TNF α 单抗不同粒径级别蛋白聚体监测结果的比较与评价

郭莎, 张峰, 刘春雨, 于传飞, 李萌, 王文波, 付志浩, 俞小娟, 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: 探讨在单克隆抗体(单抗)稳定性研究中, 分子排阻高效液相色谱法(size exclusion-high performance liquid chromatography, SEC-HPLC)、微流数字成像(microflow digital imaging, MDI)技术、澄清度及可见异物检查在不同粒径级别蛋白聚体监测中的交互作用。方法: 分别采用SEC-HPLC、MDI、澄清度及可见异物检查研究肿瘤坏死因子 α (TNF α)靶点单抗在4 $^{\circ}$ C储存6个月、37 $^{\circ}$ C和6000 lx光照条件下储存28 d后, 蛋白聚体、不溶性微粒、澄清度及可见异物的不同变化。结果: SEC-HPLC结果表明, 与样品在4 $^{\circ}$ C储存6个月的结果相比, 抗TNF α 单抗的蛋白聚体含量在37 $^{\circ}$ C和6000 lx照度处理28 d后均增加均不明显。使用MDI技术可见, 抗TNF α 单抗经37 $^{\circ}$ C和6000 lx照度处理28 d后, 1~10 μ m、10 μ m以上、25 μ m及以上粒径的微粒数量比在4 $^{\circ}$ C储存6个月的样品有明显增多, 且增多的微粒主要为蛋白聚体。通过目视法对样品的澄清度和可见异物检查发现, 37 $^{\circ}$ C储存和6000 lx照度处理28 d后的抗TNF α 单抗澄清度低于4 $^{\circ}$ C储存的样品; 各储存条件下的抗TNF α 单抗均未检出可见异物。结论: 在单抗稳定性研究中, 纳米级、微米级蛋白聚体的形成上并不具有一致性, 因此, 应采用多种方法对蛋白聚集情况进行表征和分析, 避免单一方法的局限。

关键词: 单克隆抗体; 稳定性研究; 蛋白聚体; 分子排阻高效液相色谱法; 微流数字成像技术

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2018)08-1073-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2018.08.011

Comparison and Evaluation of Monitoring Results of Protein Aggregates with Different Orders of Magnitude of an Anti-TNF α Monoclonal Antibody

Guo Sha, Zhang Feng, Liu Chunyu, Yu Chuanfei, Li Meng, Wang Wenbo, Fu Zhihao, Yu Xiaojuan, Wang Lan* (Division of Monoclonal Antibody Products, 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 discuss the interaction of following methods in monitoring protein aggregate with different orders of magnitude, such as size exclusion-high performance liquid chromatography (SEC-HPLC), microflow digital imaging (MDI), clarity and visible foreign matter visual examination in the study of the stability of monoclonal antibodies (mAbs). **Methods:** SEC-HPLC MDI and visual examination were used separately to study the difference of protein aggregates, insoluble particles, clarity and visible foreign matter of an anti-tumor

基金项目: 国家科技重大专项 重大新药创制 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(编号 2018ZX09736008-006)

作者简介: 郭莎, 助理研究员; 研究方向: 单克隆抗体质量控制研究; Tel: (010) 53852174; E-mail: guosha@nifdc.org.cn

通信作者: 王兰, 研究员; 研究方向: 单克隆抗体质量控制研究; Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

necrosis factor α (TNF α) mAb after being stored at 4 °C for 6 months or at 37 °C or under 6000 lx illumination for 28 days. **Results:** The results of SEC-HPLC showed that the proportion of protein aggregates of the anti-TNF α monoclonal antibody was not significantly increased after 28 days treatment at 37 °C and under 6000 lx illumination compared with the results of being stored at 4 °C for 6 months. The results of MDI showed that in the anti-TNF α monoclonal antibody after 28 days treatment at 37 °C or under 6000 lx illumination, the numbers in the particles with particle size of 1 to 10 μm , 10 μm and more than 25 μm were significantly higher than those in the samples stored at 4 °C for 6 months. And the increased particles are mainly protein aggregates. The clarity and visible foreign matter inspection of the sample by visual examination revealed that the clarity of the anti-TNF α monoclonal antibody after 28 days treatment at 37 °C or under 6000 lx illumination was less than that in the samples stored at 4 °C. No visible particles were found in anti-TNF α samples under three different storage conditions. **Conclusion:** There was no consistency in the formation of nano-grade and micron-grade protein aggregates in monoclonal antibody stability study. Therefore, various methods should be used to characterize and analyze the protein aggregation in order to avoid limitation of a single method.

Keywords: monoclonal antibody; stability study; protein aggregate; size exclusion-high performance liquid chromatography; microflow digital imaging

单抗稳定性研究贯穿于整个药品研发、临床试验、药品上市及上市后研究的重要内容,是药品储存条件、有效期等的设定依据,也是对产品生产工艺、制剂处方、包装材料等的适用性进行判断的参考,同时也是产品质量标准制订的基础^[1-2]。在单抗稳定性研究中,单抗分子往往会发生聚集,形成由小而大的不同粒径级别的聚体,这些聚体是产品相关杂质,具有潜在的免疫原性^[3-6]。目前,没有一种方法可以将纳米到微米、甚至毫米级别的蛋白聚体全部表征出来,往往需要采用多种方法联合应用,才能全面表征蛋白聚体的形成和分布。

不同检测方法有各自的优劣,SEC-HPLC由于其所使用的流动相温和,能保持抗体的天然构象,常被用于表征单抗二聚体/寡聚体的占比^[7-8],这是从纳米级别表征单抗的纯度及聚体形成情况,不过由于方法本身的操作方法和分辨率等因素,可能会低估蛋白聚体的占比^[9]。MDI技术则是对微米级别的不溶性微粒进行拍摄,并可通过多种参数对微粒的性质进行分析判断,进而提示微粒的来源^[10-11],但该方法只能从形态上对微粒进行分类,并报告不同粒径大小和微粒类别的绝对计数,不能报告其在所有蛋白分子中的占比。通过目视法对澄清度和可见异物进行检查是一种简单的检测手段,对大量蛋白聚体的产生具有一定的提示价值,但灵敏度有限^[11]。本文以抗TNF α 单抗为例,采用上述四种方法对蛋白聚体进行分析,显示了该单抗在稳定性

研究中某一时点的蛋白聚体形成情况,综合分析后判断该样品在稳定性研究中已产生较大的蛋白聚体,避免了仅采用某一方法对样品真实状态的估计不足,降低安全风险。

1 材料和方法

1.1 样品

本文所采用的抗TNF α 单抗为本室留样,规格为40 mg, 0.8 mL,剂型为预充式注射剂。三种储存条件分别为4 °C 6个月, 37 °C和6000 lx光照储存28 d。

1.2 主要仪器

Waters ACQUITY Arc系统;美国Fluid Imaging公司亚可见微粒成像系统FlowCAM[®]VS-1;天大天发科技有限公司YB-2型澄明度检测仪。

1.3 检测方法

1.3.1 SEC-HPLC

采用Waters ACQUITY Arc系统、TSK3000SW^{XL} 7.8 × 300 mm凝胶色谱柱,流动相为0.1 mol · L⁻¹磷酸氢二钠、0.1 mol · L⁻¹磷酸二氢钠、0.1 mol · L⁻¹硫酸钠缓冲液, pH6.7,柱温25 °C ± 0.5 °C,流速为1 mL · min⁻¹,检测波长为214 nm。用流动相将供试品稀释至1 mg · mL⁻¹,并用流动相作为空白对照,上样量为10 μL ,每个样品重复检测3次。

1.3.2 MDI

采用美国Fluid Imaging公司亚可见微粒成像系统FlowCAM[®]VS-1,系统主要参数设定如下:流通

池采用FC100, 物镜放大倍数为10倍, 上样量为200 μL, 测试流速为0.1 mL · min⁻¹, 拍照频率为每秒22帧, 每个样品重复检测3次。

1.3.3 一般检查

澄清度检查时, 将样品分别置于比浊用玻璃管中, 在暗室内垂直置于伞棚灯下, 照度为1000 lx, 从水平方向观察、比较。可见异物检查时将样品转移至洁净透明的玻璃管中, 置伞棚灯遮光板边缘处, 照度为1000 lx, 轻轻旋转和翻转容器使样品中可能存在的可见异物悬浮, 并避免产生气泡, 分别在黑色和白色背景下于明视距离重复观察, 总检查时限为20 s。

2 结果

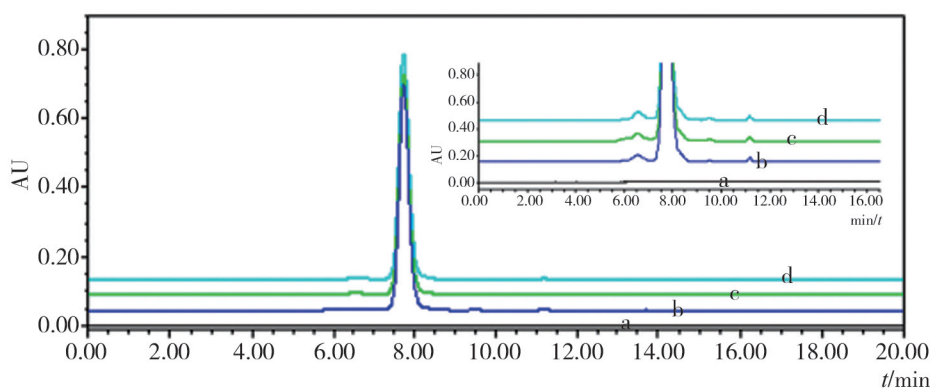
2.1 SEC-HPLC检测结果

SEC-HPLC因方法简便、快捷、重现性好, 常被用于单抗聚体的检测, 反映纳米级别蛋白分子

的大小变异体。采用SEC-HPLC检测在4℃储存6个月, 37℃和6000 lx照度储存28 d后, 抗TNF α单抗其单体、聚体的含量占比情况, 如表1所示。结果与4℃储存6个月的抗TNF α单抗结果相比, 37℃或6000 lx照度储存28 d后, 聚体含量仅有略微增加, 但均不具有显著性差异。图1显示了三种储存条件下抗TNF α单抗的SEC-HPLC代表性图谱。

表1 三种储存条件下抗TNF α单抗的SEC-HPLC检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 储存条件 | 单体 /% | 聚体 /% |
|--------------|--------------|-------------|
| 4℃ 6个月 | 98.02 ± 0.04 | 1.63 ± 0.05 |
| 37℃ 28 d | 97.94 ± 0.01 | 1.70 ± 0.01 |
| 6000 lx 28 d | 97.99 ± 0.01 | 1.65 ± 0.01 |



注: a. 空白对照; b. 4℃ 6个月; c. 37℃ 28 d; d. 6000 lx 照度 28 d

图1 三种储存条件下抗TNF α单抗的SEC-HPLC图谱

2.2 MDI法检测结果

MDI法可检测单抗药物中微米级的不溶性微粒, 它可以将微粒拍摄成像, 进而通过参数分析判断样品中微粒的性质和来源。该方法的检测灵敏度高于《中国药典》(2015年版)不溶性微粒的检测

方法光阻法, 故目前常用于单抗药物的不溶性微粒研究, 也常用于单抗药物的配方筛选及稳定性研究。采用MDI法比较抗TNF α单抗分别在4℃储存6个月, 37℃和6000 lx照度储存28 d后, 总微粒及其中蛋白聚体的产生情况。结果见表2所示。

表2 MDI法检测抗TNF α单抗不同储存条件下不溶性微粒及蛋白聚体 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 直径 | 4℃ 6个月 / (粒 · min ⁻¹) | 37℃ 28d / (粒 · min ⁻¹) | 6000 lx 照度 28d / (粒 · min ⁻¹) |
|-----------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| 1 ~ 10 μm | 14446 ± 2011 | 47198 ± 4962 | 19766 ± 2226 |
| >10 μm | 420 ± 75 | 4810 ± 672 | 2565 ± 483 |
| ≥ 25 μm | 0 | 270 ± 66 | 433 ± 31 |

续表 2

| 直径 | 4℃ 6个月 / (粒·min ⁻¹) | 37℃ 28d/ (粒·min ⁻¹) | 6000 lx 照度 28d/ (粒·min ⁻¹) |
|------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|
| 1 ~ 10 μm (蛋白聚体) | 7685 ± 677 | 40602 ± 3919 | 11100 ± 1481 |
| >10 μm (蛋白聚体) | 232 ± 29 | 4332 ± 596 | 2176 ± 585 |
| ≥ 25 μm (蛋白聚体) | 0 | 239 ± 106 | 415 ± 41 |

从表2中可以看出,抗TNF α 单抗在经37℃储存或6000 lx光照28 d后,1~10 μm、>10 μm及≥25 μm粒径范围内颗粒数量比4℃储存6个月均明显增加。利用Flowcam Visual Spreadsheet 软件去除非蛋白类颗粒,我们发现4℃储存的样品中颗粒数量大大降低,6000 lx光照28 d后的样品中1~10 μm的颗粒数量也大幅减少,说明该条件下的颗粒主要为硅油等非蛋白聚体,对于预充式注射器剂型来说,是一种常见的现象^[12-13]。而经37℃储存28 d的样品,颗粒数量仅略有降低,说明样品中增加的颗粒多为蛋白聚体。更进一步分析发现,6000 lx光照28 d后的样品在1~10 μm、>10 μm 粒径上的蛋白聚体比37℃储存28 d的样品少,而≥25 μm 粒径的微粒则比37℃储存的样品中明显增多,说明37℃储存易导致<25 μm粒径的蛋白聚体产生,光照条件更易在该样品中产生≥25 μm粒径的蛋白聚体,这可能是由于光照使更多硅油从注射器内表面脱落到单抗液体中,作为核心,引发了较大蛋白聚集的产生。

2.3 澄清度和可见异物检查结果

我们还采用目视法对三种储存条件下的抗TNF α 单抗进行了澄清度和可见异物检查。澄清度是单抗药物分子对光的散射特性的反映,它是从纳米至微米级别提示样品中较宽粒径范围的蛋白聚集体的形成。可见异物检查是对50 μm以上的颗粒进行识别的一种检查方法,可发现较大的异物,是单抗药物的一种基本的筛查手段。澄清度检查结果显示,样品在37℃储存和6000 lx光照28 d后澄清度要低于4℃储存6个月的样品。三种储存条件下的抗TNF α 单抗中均未发现可见异物。

2.4 检测结果总结

我们将4种分析方法对三种储存条件下的抗TNF α 单抗检测结果进行了汇总,结果见下表3。

表3 四种分析方法对两种不同储存条件下的抗TNF检测结果汇总

| 检测项目 | 37℃ 28 d | 6000 lx 28 d |
|-----------|----------|--------------|
| SEC-HPLC | - | - |
| MDI(蛋白聚体) | + | + |
| 澄清度 | + | + |
| 可见异物 | - | - |

注:+:表示与4℃储存6个月的结果相比无变化;-表示与4℃储存6个月的结果相比有变化。

3 讨论

SEC-HPLC可高效、快捷地检测单抗药物的聚体含量,已广泛用于单抗等生物制品的质控分析,本试验发现,与4℃储存6个月相比,不管抗TNF α 单抗在37℃储存28 d还是在6000 lx光照条件下储存28 d,其聚体增加都不明显;而MDI方法则显示在两种条件下,均检测到大量微米级蛋白聚体。从这两种方法的检测结果可见,由于不同方法原理不同、各有侧重,所检测到的单抗药物中纳米级蛋白聚体与微米级蛋白聚体的结果并不平行,造成这种结果的原因可能为以下几种:(1)由于蛋白聚体的形成是可逆的,SEC-HPLC检测时对样品进行了前处理,如稀释,导致不稳定的纳米级蛋白聚集体发生了解离。(2)对于该抗TNF α 单抗来讲,可能37℃储存或在6000 lx光照28 d后,已经产生了大量微粒级蛋白聚体,且这些颗粒已达到饱和,故而抑制了纳米级蛋白分子的进一步聚集,也会出现上述结果。(3)较大的蛋白聚体也有可能被截留在色谱柱外或色谱柱的凝胶中,并不能通过该方法得到有效展示^[14]。(4)此外,本试验中的SEC-HPLC采用紫外检测器,该检测器的分辨率有限,可能使聚体得不到有效分离,如果同时采用其他检

测器如动态光散射检测器,则可能显示出更佳的分
离效果^[8,15-16]。鉴于以上发现,由于SEC-HPLC反映
的是纳米级蛋白聚体的百分含量,而MDI反映的是
微米级蛋白聚体的绝对数量,二者的原理和方法均
不相同,结果也不能简单相比,故结合起来分析更
有助于对稳定性研究中样品各粒径级别蛋白聚体真
实状态的全面评估。

本试验还采用目视法对澄清度和可见异物进
行了检查,这两种检查与MDI一样,均为原倍检
测,是对样品原始状态进行分析评价。澄清度是对
样品中蛋白分子的浓度与体积的反映,蛋白浓度越
高,分子体积越大,澄清度越低,不过澄清度检查
并不能对各粒径级别的蛋白聚体分别进行定量。检
测结果显示,37℃储存和6000 lx光照28 d后,样品
的澄清度要低于4℃储存6个月的样品,由于三者蛋
白浓度相同,说明有较多蛋白聚体产生,导致澄清
度下降。这一结果与MDI法所提示的信息相吻合,
说明虽然37℃储存和6000 lx光照28 d产生<25 μm
与≥25 μm的蛋白聚体的能力不同^[17],但这两种粒
径的蛋白聚体均能导致澄清度降低。可见异物检查
是对单抗药物的一项基本检查,可对50 μm以上的
异物进行识别,该检查简单易行,但并不能判断异
物的性质是否为蛋白。检测并未发现三种储存条
件的抗TNFα单抗含有可见异物,说明不管37℃储
存还是在6000 lx光照后的样品,其中的蛋白聚体并
未聚集成50 μm以上的不溶性可见颗粒^[18]。

从上述分析可见在单抗的稳定性研究中,将
不同方法的检测结果结合起来分析是必要的,可以
避免单一方法的局限性,并能相互印证,获得更多
信息^[19-21]。本文以抗TNFα单抗为例,发现尽管用
SEC-HPLC方法并未检出在高温和光照处理后的样
品中检出蛋白聚体的明显增加,但MDI法却检出较
多蛋白聚体,澄清度检查的结果也印证了这一点,
说明该样品对温度和光照较为敏感。稳定性研究过
程中不同时间点的动态监测结果怎样,这些新增的
蛋白聚体是否为可逆聚集,在给药环节能否重新解
聚为单体,是否会降低药物安全性和有效性,值得
我们进一步研究。

参考文献:

[1] Manning MC1, Chou DK, Murphy BM, et al. Stability
of Protein Pharmaceuticals: an Update[J]. Pharm Res,

2010, 27 (4): 544-575.

- [2] Young BL, Khan MA, Chapman TJ, et al. Evaluation of
the Physicochemical and Functional Stability of Diluted
REMSIMA(R) upon Extended Storage--A Study Compliant
with NHS (UK) Guidance[J]. International journal of
pharmaceutics, 2015, 496 (2): 421-431.
- [3] Rosenberg AS. Effects of Protein Aggregates: An
Immunologic Perspective[J]. The AAPS journal, 2006, 8
(3): E501-E7.
- [4] Wang W, Singh Sk Fau, Li N, et al. Immunogenicity of
Protein Aggregates--Concerns and Realities[J]. International
journal of pharmaceutics, 2012, 431 (1-2): 1-11.
- [5] Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, et al. Immunogenicity
of Therapeutic Proteins: Influence of Aggregation[J].
Journal of immunotoxicology, 2014, 11 (2): 99-109.
- [6] Freitag AJ, Shomali M, Michalakis S, et al. Investigation
of the Immunogenicity of Different Types of Aggregates of
a Murine Monoclonal Antibody in Mice[J]. Pharm Res,
2015, 32 (2): 430-444.
- [7] Uversky VN. Use of Fast Protein Size-exclusion liquid
Chromatography to Study the Unfolding of Proteins which
Denature through the Molten Globule[J]. Biochemistry,
1993, 32 (48): 13288-13298.
- [8] Fekete S, Beck A, Veuthey JL, et al. Theory and Practice of
Size Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein
Aggregates[J]. Journal of pharmaceutical and biomedical
analysis, 2014, 101: 161-73.
- [9] Kraus BR, Raso C. Rational Boundaries for SEC Cost-
Benefit Analysis[J]. Social Science Electronic Publishing,
2012, 30: 273-279.
- [10] Sharma DK, King D, Oma P, et al. Micro-flow Imaging:
Flow Microscopy Applied to Sub-visible Particulate
Analysis in Protein Formulations[J]. The AAPS journal,
2010, 12 (3): 455-464.
- [11] Narhi LO, Jiang Y, Cao S, et al. A Critical Review of
Analytical Methods for Subvisible and Visible Particles[J].
Curr Pharm Biotechnol, 2009, 10 (4): 373-381.
- [12] Strehl R, Rombach-Riegraf V, Diez M, et al. Discrimination
between Silicone Oil Droplets and Protein Aggregates in
Biopharmaceuticals: A Novel Multiparametric Image Filter
for Sub-visible Particles in Microflow Imaging Analysis[J].
Pharm Res, 2012, 29 (2): 594-602.

- [13] Gerhardt A, McGraw NR, Schwartz DK, et al. Protein Aggregation and Particle Formation in Prefilled Glass Syringes[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2014, 103 (6) : 1601–1612.
- [14] Telikepalli SN, Kumru OS, Kalonia C, et al. Structural Characterization of LgG1 mAb Aggregates and Particles Generated under Various Stress Conditions[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2014, 103 (3) : 796–809.
- [15] Panchal J, Kotarek J, Marszal E, et al. Analyzing Subvisible Particles in Protein Drug Products: a Comparison of Dynamic Light Scattering (DLS) and Resonant Mass Measurement (RMM)[J]. *The AAPS journal*, 2014, 16 (3) : 440–451.
- [16] Ball S. The Benefits of Multi-Detector SEC for Protein Analysis[J]. *Spectroscopy*, 2015, 11 (3) : 125–127.
- [17] Joubert MK, Luo Q, Nashed-Samuel Y, et al. Classification and Characterization of Therapeutic Antibody Aggregates[J]. *The Journal of biological chemistry*, 2011, 286 (28) : 25118–25133.
- [18] Zolls S, Gregoritz M, Tantipolphan R, et al. How Subvisible Particles Become Invisible—relevance of the Refractive Index for Protein Particle Analysis[J]. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2013, 102 (5) : 1434–1446.
- [19] Yoshino T, Ishikawa T, Ishihara T, et al. Evaluation of the Aggregation States of Monoclonal Antibodies by Diverse and Complementary Methods[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34 (8) : 1273–1278.
- [20] Filipe V, Hawe A, Carpenter JF, et al. Analytical Approaches to Assess the Degradation of Therapeutic Proteins[J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2013, 49 (3) : 118–125.
- [21] Thiagarajan G, Semple A, James JK, et al. A Comparison of Biophysical Characterization Techniques in Predicting Monoclonal Antibody Stability[J]. *mAbs*, 2016, 8 (6) : 1088–1097.

(收稿日期 2018年4月16日 编辑 范玉明)