

基于硼酸亲和色谱 (BAC) 测定单抗糖化比例方法的建立

刘旭梅^{1,2#}, 王文波^{2#}, 武刚², 于传飞², 韩治国³, 王兰^{2*}, 刘万卉^{1*} [1. 烟台大学药学院, 烟台 246005; 2. 中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定及标准化重点实验室, 北京 102629; 3. 安捷伦科技(北京)有限公司, 北京 100102]

摘要 目的: 建立基于硼酸亲和色谱 (BAC) 测定单抗糖化比例分析方法并进行方法学验证。方法: 对硼酸亲和色谱做方法优化和方法学验证, 通过对流动相的盐组成、NaCl和Tris浓度的优化, 建立能够有效定量单抗糖化比例的BAC分析方法, 并对该方法进行方法学验证和应用评价。结果: NaCl和Tris浓度的变化会影响单抗糖化比例的检测, 通过参数优化, 最终确定在NaCl和Tris浓度分别为300 mmol·L⁻¹和25 mmol·L⁻¹时, 可以对单抗糖化比例进行准确定量。根据ICH Q2和《中华人民共和国药典》2020年版对建立的方法进行了方法学验证, 结果表明该方法具有良好的特异性、准确性、精密度和耐用性。单抗糖化比例在2%~90%有良好的线性, R²大于0.99, 回收率在87.04%~115.29%; 非糖化比例在10%~98%具有良好线性, R²大于0.99, 回收率在99.69%~109.79%。精密度结果表明, 该方法整体的RSD值小于18.26%。最后, 利用建立的方法对利妥昔单抗原研药和生物类似药进行了糖化比例检测, 发现同一厂家不同批次利妥昔单抗糖化比例差异较小, 而不同厂家糖化比例存在差异。结论: 建立的BAC糖化比例测定方法具有良好的准确性和精密度, 可用于利妥昔单抗糖化比例的检测。

关键词: 单克隆抗体; 利妥昔单抗; 糖化; 硼酸亲和色谱; 方法学验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)03-0287-11
doi:10.16153/j.1002-7777.2023.03.006

Establishment of Quantitative Method for Determination of Monoclonal Antibody Glycation Level Based on Boronate Affinity Chromatography (BAC)

Liu Xumei^{1,2#}, Wang Wenbo^{2#}, Wu Gang², Yu Chuanfei², Han Zhiguo³, Wang Lan^{2*}, Liu Wanhui^{1*} [1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 246005, China; 2. 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; 3. Agilent Technologies Company Limited, Beijing 100102, China]

Abstract Objective: To establish and validate an analytical method based on boronate affinity chromatography (BAC) for the determination of glycation level of monoclonal antibody. **Methods:** The mobile phase composition, including NaCl and Tris concentrations were optimized, and the established BAC method was systematically

基金项目: 《中国药典》药品标准提高课题项目资助 (编号 2020S08)

作者简介: 刘旭梅 Tel: (010) 53852199; E-mail: idshume@163.com

共同第一作者: 王文波 Tel: (010) 53852177; E-mail: qinghaiminhe@163.com

通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

刘万卉 Tel: (0535) 3808288; E-mail: wanhuiliu@ytu.edu.cn

validated and used for the evaluation of glycation level of rituximab. **Results:** The change of the concentration of NaCl and Tris affected the determination of glycation level of monoclonal antibody. Through parameter optimization, it was finally determined that when the NaCl and Tris concentrations in mobile phase were set to 300 mmol·L⁻¹ and 25 mmol·L⁻¹ respectively, the glycation level could be quantified accurately. The established BAC method was validated according to ICH Q2 guideline and 2020 editions of the Chinese Pharmacopoeia. This method demonstrated good specificity, accuracy, precision, and robustness. Glycation level between 2% and 90% showed good linearity with $R^2 > 0.99$, and the recovery rate was between 87.04% and 115.29%. For non-glycation level between 10% and 98% showed good linearity with $R^2 > 0.99$, and the recovery rate was between 99.69% and 109.79%. The precision results showed that the overall RSD value of the method was $< 18.26\%$. Finally, we also evaluated the glycation level of rituximab original drugs and its biosimilars by using the established BAC method, and found that the level of glycation was comparable among different batches from the same manufacturer, but varied in different manufacturers. **Conclusion:** The established BAC method showed good accuracy and precision, and can be used for glycation level quantitation of rituximab.

Keywords: monoclonal antibody; rituximab; glycation; boronate affinity chromatography; methodology validation

糖化反应是一种非酶促反应,自发产生,无需酶调控。在葡萄糖、果糖、半乳糖等还原糖存在的条件下,这些游离糖会共价结合到蛋白质的氨基酸残基上(主要为赖氨酸),最终形成晚期糖化终末产物(Advanced Glycation End Products, AGEs)^[1-2],从而降低蛋白的稳定性和功能活性。常见的糖尿病、骨关节炎、衰老、血管并发症等^[1]都与糖化反应密切相关。

由于葡萄糖在单抗发酵生产时的细胞培养基中被普遍使用,同时一些单抗终产品的制剂配方中也会添加还原型的糖或者常见的蔗糖也会水解成为还原型的糖^[3],因此,糖化修饰在单抗中较为常见。即使在通常认为比较稳定的冻干剂型中也会发生糖化^[4-5]。单抗的糖化受多种因素影响,细胞发酵时培养基的pH、培养基温度、培养时间以及离子强度均会影响单抗糖化的程度和糖化速率^[5-7],而单抗在存贮阶段的制剂配方组成、存贮温度和湿度,以及存储时间也会影响其糖化程度和速率^[5]。

单抗的糖化会影响其电荷异质性、安全性、稳定性、多聚体产生,某些位点上的糖化还会影响其生物学活性^[8],因此,有必要对单抗的糖化位点的表征和比例进行测定。目前,抗体糖化比例测定方法主要有硼酸亲和色谱(BAC)、基于电荷差异分离的方法(如离子交换色谱等)、硝基四氮唑蓝还原试验(NBT Reduction Assay)和LC-MS等^[9]。其中BAC法因操作简便、无需样品前处理等特点,

成为抗体糖化比例测定、糖化单抗组分分离和纯化最常用的方法。BAC是一种分离和富集顺式二醇化合物的技术,可定量单抗总糖化水平。在碱性条件下,固定相上的硼酸官能团可以形成四面体阴离子,与糖分子上的顺式1,2-二醇阵列相互作用^[10],再利用山梨醇中的羟基竞争性结合到固定相上,将糖化组分置换下来,达到分离目的。BAC法可用于治疗用单克隆抗体^[11]、肽^[12]、牛血清白蛋白^[13]、脂蛋白ApoA-I^[14]、糖尿病大鼠肾脏的线粒体蛋白^[15]等的糖化分析,对糖化蛋白进行定量^[4]、纯化和富集,监测糖化水平的变化。本研究通过优化建立了基于BAC的单抗糖化比例分析方法,并对目前已上市的3家利妥昔单抗进行检测。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters 2695高效液相色谱仪,2487紫外检测器;色谱柱:TSK Boronate-5PW Column(7.5 mm × 75 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany); NanoDrop OneC微量紫外-可见分光光度计; Agilent 1260 Infinity II; Agilent 6230 TOF; 酸度计(METTLER TOLEDO, 型号S470K)。

1.2 材料

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, Bbilibio-Bio Basic公司,货号:TB0195-500 g);山梨醇(Sigma公司,货号:85529-250 G);氯化钠(NaCl, 国药集团化学试剂有限公司,货号:

10019318)；羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES, Sigma公司, 货号: H3375-250 G)；4-羟乙基哌嗪丙磺酸(EPPS, Sigma公司, 货号: V900345-25G)；磷酸钠(Sigma公司, 货号: 342483-25G)；磷酸盐缓冲生理氯化钠(PBS, Gibco公司, pH 7.4, 货号: 70011-044)；超滤离心管(Merk公司, 货号: UFC5030BK)；0.22 μm滤膜(Millipore, 货号: SLGV004SL)；D(+)-葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司, 货号: 63005518-500G)；Pierce™ 甲酸(LC-MS级, ThermoFisher公司, 货号: 28905)；Pierce™ 乙腈(LC-MS级, ThermoFisher公司, 货号: 51101)；利妥昔单抗(罗氏公司, RBP)共6批；利妥昔单抗生物类似药(SBP-1和SBP-2)各3批。

2 方法与结果

2.1 样品制备

称取90.06 g D(+)-葡萄糖, 用500 mL PBS溶解, 配制成1 mol·L⁻¹葡萄糖溶液, 再用0.22 μm滤膜过滤除菌。将10 g·L⁻¹利妥昔单抗溶液与1 mol·L⁻¹葡萄糖溶液1:1混合, 得到5 g·L⁻¹糖化利妥昔溶液, 于37℃孵箱中放置10 d。

2.2 硼酸亲和色谱(BAC)条件与测定

柱温: 40℃; 流速: 1 mL·min⁻¹; UV波长: 280 nm; 流动相A: 100 mmol·L⁻¹ HEPES, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 25 mmol·L⁻¹ Tris, pH 8.5;

流动相B: 500 mmol·L⁻¹山梨醇; 100 mmol·L⁻¹ HEPES, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 25 mmol·L⁻¹ Tris, pH 8.5; 梯度洗脱(0~20 min, 0% B; 20~25 min, 0%~100% B; 25~30 min, 100% B; 30~31 min, 100%~0% B; 31~40 min, 0% B); 进样量: 100 μg; 运行时间: 40 min。

取已加速糖化10 d的样品稀释到2 g·L⁻¹, 进样100 μg, BAC检测, 分别手动收集糖化和未糖化单抗组分。

2.3 方法学验证

2.3.1 准确性(Accuracy)

分别用PBS稀释已收集的未糖化样品和糖化样品到2 g·L⁻¹, 通过不同配比[V_(糖化): V_(未糖化)=1:49、1:9、1:3、1:1、3:1、9:1], 制备成2%、10%、25%、50%、75%、90%糖化样品, 即98%、90%、75%、50%、25%、10%未糖化样品。6个不同配比的样品重复检测3次; 并分别计算糖化组分和未糖化组分的回收率: 糖化组分的回收率=(检测的糖化比例值/理论的糖化比例值)×100%, 未糖化组分的回收率=(检测的未糖化比例值/理论的未糖化比例值)×100%。通过对回收率的计算, 评价方法的准确性。结果见表1, 不同糖化比例样品的回收率在87.04%~115.29%, 不同未糖化比例样品的回收率在99.69%~109.79%, 本方法准确性良好。

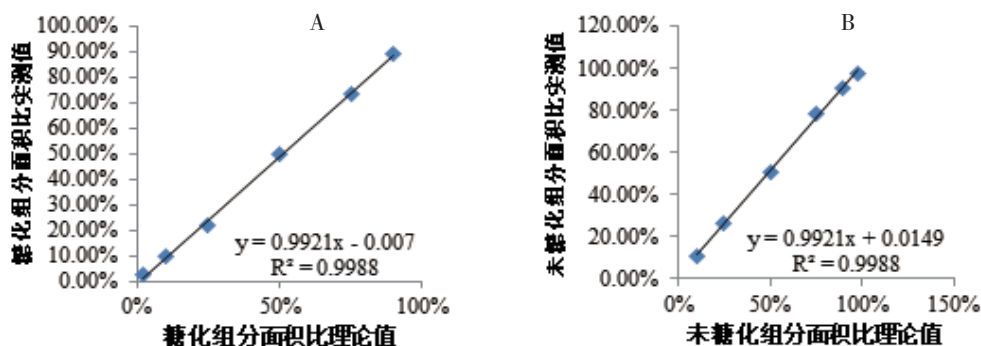
表1 方法的准确性分析(n=3)

糖化峰理论值 /%	糖化峰实测值 /%		回收率 /%		未糖化峰理论值 /%	未糖化实测值 /%		回收率 /%	
	$\bar{X} \pm SD$	RSD	$\bar{X} \pm SD$	RSD		$\bar{X} \pm SD$	RSD	$\bar{X} \pm SD$	RSD
2	2.31 ± 0.06	2.45	115.29 ± 2.83	2.45	98	97.69 ± 0.06	0.06	99.69 ± 0.06	0.06
10	9.67 ± 0.02	0.17	96.7 ± 0.16	0.17	90	90.33 ± 0.02	0.02	100.37 ± 0.02	0.02
25	21.76 ± 0.06	0.26	87.04 ± 0.23	0.26	75	78.24 ± 0.06	0.07	104.32 ± 0.08	0.07
50	49.68 ± 0.10	0.21	99.36 ± 0.21	0.21	50	50.32 ± 0.10	0.21	100.64 ± 0.21	0.21
75	73.36 ± 0.04	0.06	97.81 ± 0.06	0.06	25	26.64 ± 0.04	0.16	106.58 ± 0.17	0.16
90	89.02 ± 0.07	0.08	98.91 ± 0.07	0.08	10	10.98 ± 0.07	0.61	109.79 ± 0.67	0.61

2.3.2 线性 (Linearity)

对“2.3.1”项中不同配比制备的样品进行检测,以糖化/未糖化组分峰面积百分比的理论值对其相应的实测值分别进行线性回归,利用拟合曲线

的 R^2 评价线性。结果如图1所示,糖化组分的相关系数为0.9988,未糖化组分相关系数为0.9988,本方法的线性良好。



A. 糖化组分的线性分析; B. 未糖化组分的线性分析。

图1 方法的线性分析

2.3.3 精密度 (Precision)

(1) 重复性: 同一分析人员在同一天对利妥昔单抗及50%和100%糖化配比的样品在相同条件下分别重复检测3次,并测定结果的RSD值。

(2) 中间精密度: 2名分析人员在同一天对利妥昔单抗及糖化比例为50%和100%糖化配比的样品在相同条件下分别重复检测3次,并测定结果的RSD值。

(3) 重现性: 同一分析人员连续3天对利妥昔单抗及50%和100%糖化配比的样品在相同条件下分别重复检测3次,并测定结果的RSD值。

对利妥昔单抗和50%、100%糖化配比的样品,2人每天分别重复检测3次,连续检测3天。结果见表2和表3,精密度整体RSD值小于18.26%,说明该方法的重复性、中间精密度和重现性较好。

表2 方法的重复性和重现性分析 ($n=3$)

利妥昔的糖化比例	天数	糖化峰面积百分比		日间		未糖化峰面积百分比		日间	
		$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%
利妥昔单抗	Day1	2.94 ± 0.07	2.36	3.24 ± 0.38	11.73	97.06 ± 0.07	0.07	96.76 ± 0.38	0.39
	Day2	3.12 ± 0.03	1.01			96.88 ± 0.03	0.03		
	Day3	3.67 ± 0.03	0.95			96.33 ± 0.03	0.04		
50%	Day1	49.68 ± 0.10	11.73	50.15 ± 0.41	0.81	50.32 ± 0.10	0.21	49.85 ± 0.41	0.81
	Day2	50.36 ± 0.14	11.73			49.64 ± 0.14	0.27		
	Day3	50.40 ± 0.06	11.73			49.60 ± 0.06	0.12		
100%	Day1	99.87 ± 0.00	0.00	99.86 ± 0.02	0.02	0.13 ± 0.00	0.02	0.14 ± 0.02	18.26
	Day2	99.88 ± 0.01	0.01			0.12 ± 0.01	5.57		
	Day3	99.84 ± 0.01	0.01			0.16 ± 0.01	3.83		

表3 方法的中间精密度分析 (n=3)

利妥昔的糖化比例	不同人员	糖化峰面积百分比		不同人间		未糖化峰面积百分比		不同人间	
		$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%
利妥昔单抗	Person 1	3.67 ± 0.03	0.95	3.68 ± 0.01	0.38	96.33 ± 0.03	0.04	96.32 ± 0.01	0.01
	Person 2	3.69 ± 0.04	0.98			96.31 ± 0.04	0.04		
50%	Person 1	50.40 ± 0.06	0.12	50.58 ± 0.25	0.49	49.60 ± 0.06	0.12	49.43 ± 0.25	0.50
	Person 2	50.75 ± 0.28	0.55			49.25 ± 0.28	0.57		
100%	Person 1	99.84 ± 0.01	0.01	99.85 ± 0.01	0.01	0.16 ± 0.01	3.83	0.16 ± 0.01	4.56
	Person 2	99.85 ± 0.01	0.01			0.15 ± 0.01	4.02		

2.3.4 定量限 (LOQ)

用PBS稀释已收集的未糖化样品和糖化样品到 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $V_{(\text{糖化})} : V_{(\text{未糖化})} = 1 : 99$ 制备得到1%糖化样品, 然后1 : 1梯度稀释, 最终得到糖化比例分别为1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.0625%、0.03125%样品; $V_{(\text{糖化})} : V_{(\text{未糖化})} = 99 : 1$ 制备得到1%未糖化样品, 然后1 : 1梯度稀释, 最终得到未糖化比例为1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.0625%、0.03125%样品, 每个样品重复检测3次。分别计算信噪比 (S/N) 约等于10的糖化色谱峰和未糖化色谱峰所占峰面积百分比, 即为方法的定量限。对1%、0.5%、0.25%、0.125%、0.0625%、0.03125%的糖化/未糖化样品做BAC检测, 分析样品中信噪比在10左右的糖化峰和未糖化峰, 糖化组分与未糖化组分的定量限为0.125%。

2.3.5 耐用性 (Robustness)

分别用柱温 (38、40、42 °C)、HEPES浓度 (90、100、110 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 以及山梨醇浓度 (450、500、550 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 这3个参数考察该方法的耐用性。

改变柱温、HEPES浓度和山梨醇浓度, 分别对利妥昔单抗检测2次, 结果见表4、5和6。在38、40、42 °C 三种不同柱温时, 利妥昔单抗糖化和未糖化峰面积百分比的RSD值分别小于12.33%和0.56%; 当HEPES浓度为90、100、110 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 利妥昔单抗糖化和未糖化峰面积百分比的RSD值分别小于10.92% 和0.58%; 当山梨醇浓度为450、500、550 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 利妥昔单抗糖化和未糖化峰面积百分比的RSD值分别小于9.64%和0.43%。

表4 方法的耐用性分析 (柱温)

柱温	糖化峰百分比		不同柱温间		未糖化峰百分比		不同柱温间	
	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%
38 °C	3.82 ± 0.11	2.94	4.32 ± 0.53	12.33	96.18 ± 0.11	0.12	95.68 ± 0.53	0.56
40 °C	4.27 ± 0.03	0.65			95.73 ± 0.03	0.03		
42 °C	4.88 ± 0.06	1.27			95.12 ± 0.06	0.07		

表5 方法的耐用性分析 (HEPES)

HEPES 浓度	糖化峰百分比		不同浓度间		未糖化峰百分比		不同浓度间	
	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%
90 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.86 ± 0.14	3.64	4.27 ± 0.55	10.92	96.14 ± 0.14	0.15	94.95 ± 0.55	0.58
100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	4.69 ± 0.04	0.86			95.31 ± 0.04	0.04		
110 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	4.26 ± 0.09	2.06			95.74 ± 0.09	0.09		

表6 方法的耐用性分析(山梨醇)

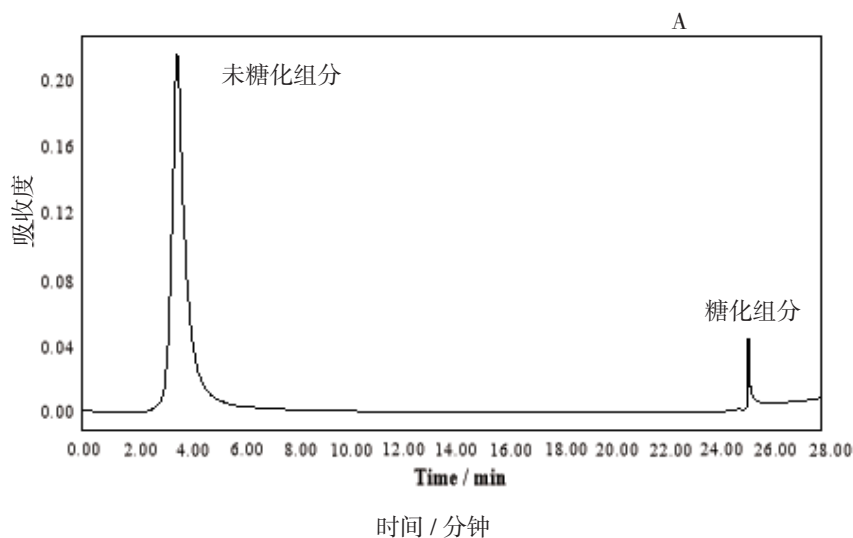
山梨醇浓度	糖化峰百分比		不同浓度间		未糖化峰百分比		不同浓度间	
	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%	$\bar{X} \pm SD/\%$	RSD/%
450 mmol · L ⁻¹	5.68 ± 0.08	1.45	5.05 ± 0.41	9.64	94.32 ± 0.08	0.09	95.73 ± 0.41	0.43
500 mmol · L ⁻¹	4.77 ± 0.13	2.79			95.23 ± 0.13	0.14		
550 mmol · L ⁻¹	4.69 ± 0.03	0.71			95.31 ± 0.03	0.03		

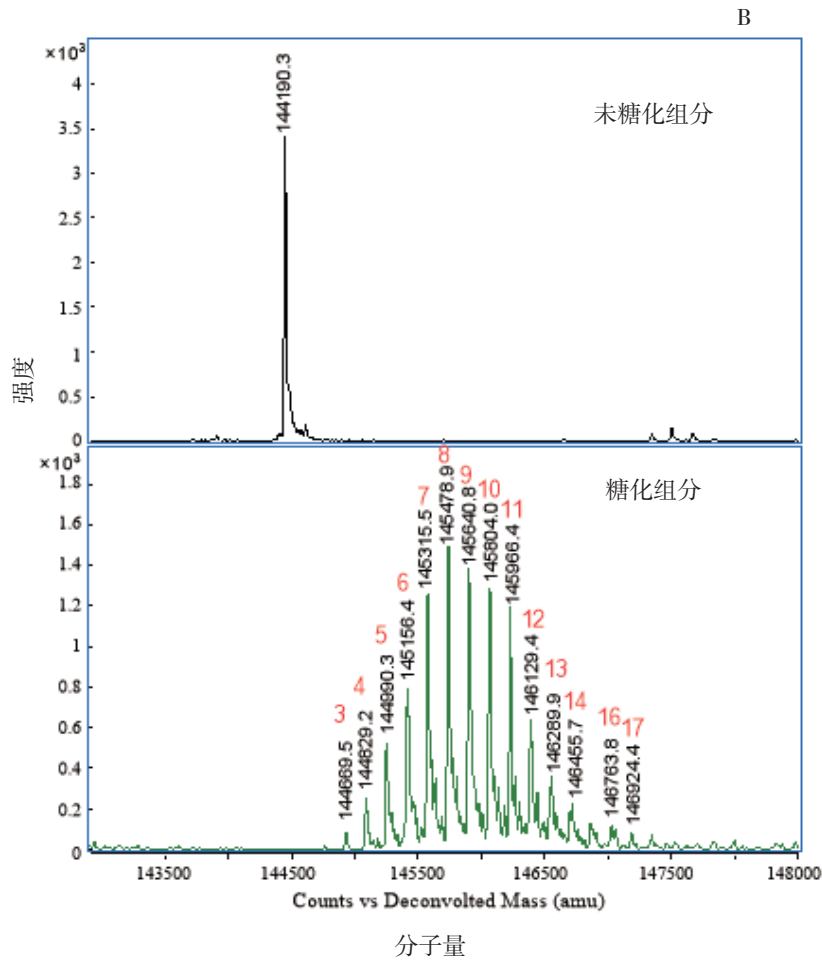
2.4 LC/MS鉴定

液相: Agilent 1260 Infinity II; 流速: 0.25 mL · min⁻¹; 色谱柱: PLRP-S 1000A; 柱温: 70 °C; 流动相A: 甲酸-水(1:1000, v/v), 流动相B: 甲酸-乙腈(1:1000, v/v); 梯度洗脱(0~1 min, 5% B; 1~4 min, 5%~95% B; 4~5 min, 95% B; 5~5.5 min, 95%~5% B; 5.5~7 min, 5% B); 进样量: 1 μg。

质谱: Agilent 6230 TOF(模式: G6230B); 离子源: Dual ESI; 正离子扫描范围: m/z 1500~6000; Scan Rate(spectra/sec) 1; 干燥气温度: 350 °C; 干燥气流速: 12 L · min⁻¹; 雾化器压力: 30 psi; 电离电压: 4000 V; 喷嘴电压: 1000 V; 碎裂电压: 380 V; 锥孔电压: 300 V; 八级杆射频电压: 750 V; 分辨率: 20000。

通过上述条件优化, 本研究确定了以下条件用于利妥昔单抗的糖化检测: 流动相A: 100 mmol · L⁻¹ HEPES, 300 mmol · L⁻¹ NaCl, 25 mmol · L⁻¹ Tris, pH 8.5; 流动相B: 500 mmol · L⁻¹ 山梨醇, 100 mmol · L⁻¹ HEPES, 300 mmol · L⁻¹ NaCl, 25 mmol · L⁻¹ Tris。利妥昔单抗糖化检测典型图谱如图2A所示, 对该方法检测的未糖化和糖化峰, 通过N糖酶切处理后进一步进行了质谱鉴定, 结果如图2B所示, 未糖化利妥昔单抗的 m/z 为144190.3, 不含糖化组分, 而糖化峰的 m/z 在144669.5~146924.4, 糖化峰与未糖化峰 m/z 的差值为162的整数倍(162为增加一个糖化修饰的分子量), 即糖化位点的数量分布在3~17。表明建立的BAC方法可有效对利妥昔单抗的糖化和未糖化组分进行有效分离和准确定量。





A. 利妥昔的BAC分析图谱；B. 利妥昔质谱分析。

图2 BAC结果分析图谱

3 讨论

BAC检测流动相中常用的盐成分主要有HEPES、EPPS、NaCl和Tris等。其中HEPES和EPPS常用于维持缓冲液的酸碱度，通常当流动相pH大于8.1时，色谱柱上的硼酸盐可生成四面体阴离子，与检测蛋白赖氨酸残基上糖分子中的顺1,2-二醇生成硼酸酯，这种作用使糖化蛋白结合在色谱柱上，然后通过流动相中增加山梨醇（500 mmol·L⁻¹），可有效取代糖分子中的羟基，使糖化蛋白从色谱柱上洗脱下来^[16]。在BAC分析过程中还存在二次相互作用，比如硼酸盐配体中的苯环与糖化蛋白中的芳香氨基酸残基之间存在疏水相互作用，以及硼酸盐配体的负电荷与蛋白所带正电荷之间的离子相互作用，均会影响糖化蛋白与硼酸盐的结合。NaCl可以消除蛋白与硼酸盐之间的非特异性吸附，Tris则抑制二次相互作用^[12, 17-18]。

3.1 流动相的筛选

本研究首先选择了4种常用的BAC流动相组成（表7），对利妥昔单抗进行了检测。结果如图3，4种流动相对利妥昔单抗糖化峰的分​​离效果存在差异，同时部分流动相组成在空白样品处存在干扰峰，综合来看，流动相II（A相：100 mmol·L⁻¹ HEPES，200 mmol·L⁻¹ NaCl，25 mmol·L⁻¹ Tris，pH 8.5；B相：500 mmol·L⁻¹ 山梨醇，100 mmol·L⁻¹ HEPES，200 mmol·L⁻¹ NaCl，25 mmol·L⁻¹ Tris，pH 8.5）对糖化组分的分离效果最好，且无干扰峰存在。接下来，在此流动相基础上进一步对NaCl和Tris的浓度进行了优化。

3.2 NaCl浓度的优化

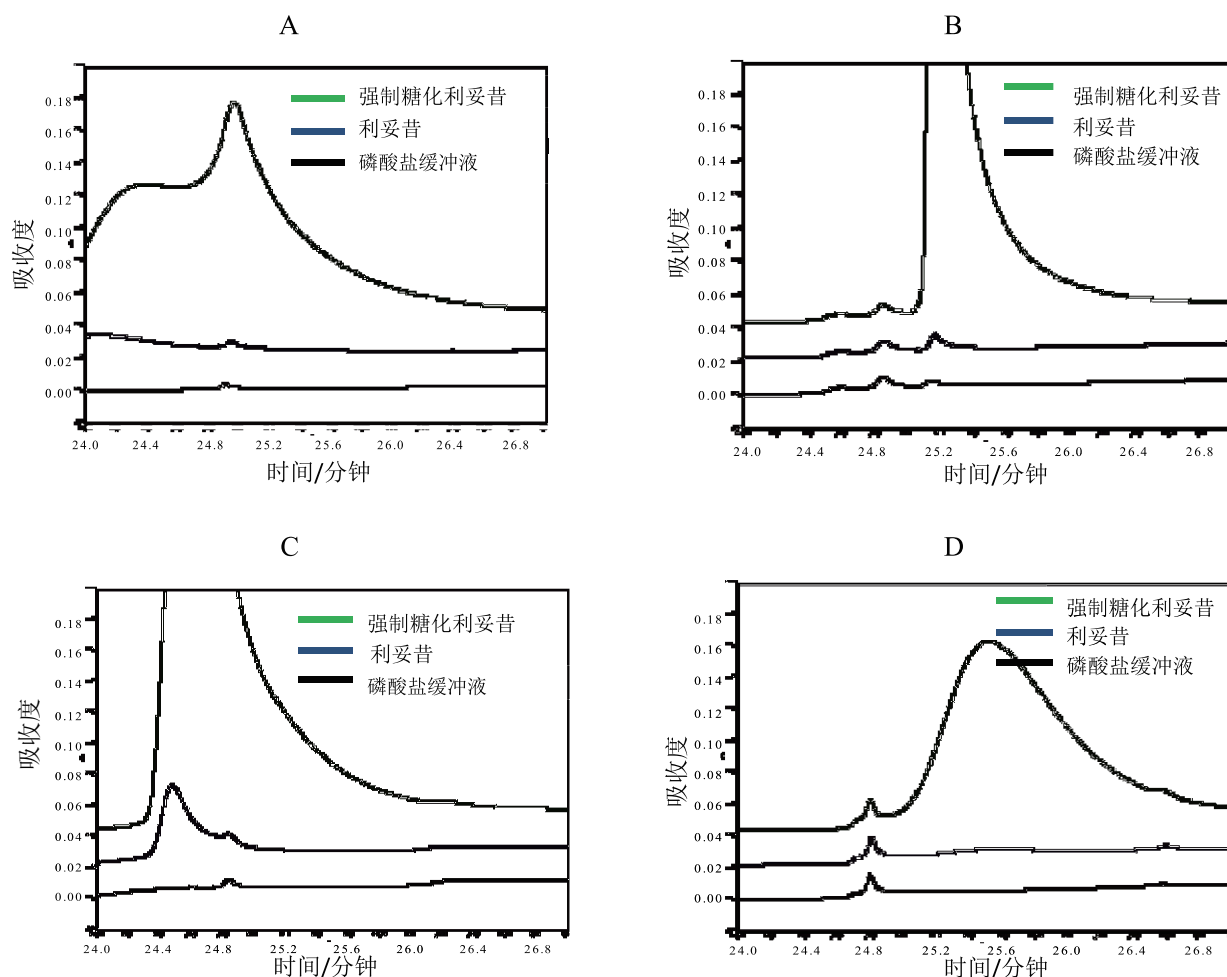
分别配制了0、50、100、200、250、300、350、400、500 mol·L⁻¹共9种浓度NaCl的流动相，分别对空白对照PBS、利妥昔单抗及利妥昔强制糖

化样品进行了BAC检测。结果如图4A所示, 利妥昔单抗糖化比例随着流动相中NaCl浓度的增加而不断降低, 当NaCl浓度大于 $300 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 糖化比

例保持稳定不再变化, 表明 $300 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$ 可完全抑制利妥昔单抗与色谱柱的非特异性静电吸附。

表7 分离糖化蛋白的4种流动相

流动相类型	A相/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)						B相/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)						
	HEPES	EPPS	磷酸钠	NaCl	Tris	pH	HEPES	EPPS	磷酸钠	NaCl	Tris	pH	山梨醇
I ^[5]	20	/	/	150	/	8.5	20	/	/	150	/	8.5	500
II ^[19]	100	/	/	200	25	8.5	100	/	/	200	25	8.5	500
III ^[9]	/	/	100	400	/	8.6	/	/	100	400	/	8.6	500
IV ^[20]	/	50	/	200	10	8.7	/	50	/	200	10	8.7	500



A. I类流动相; B. II类流动相; C. III类流动相; D. IV类流动相。

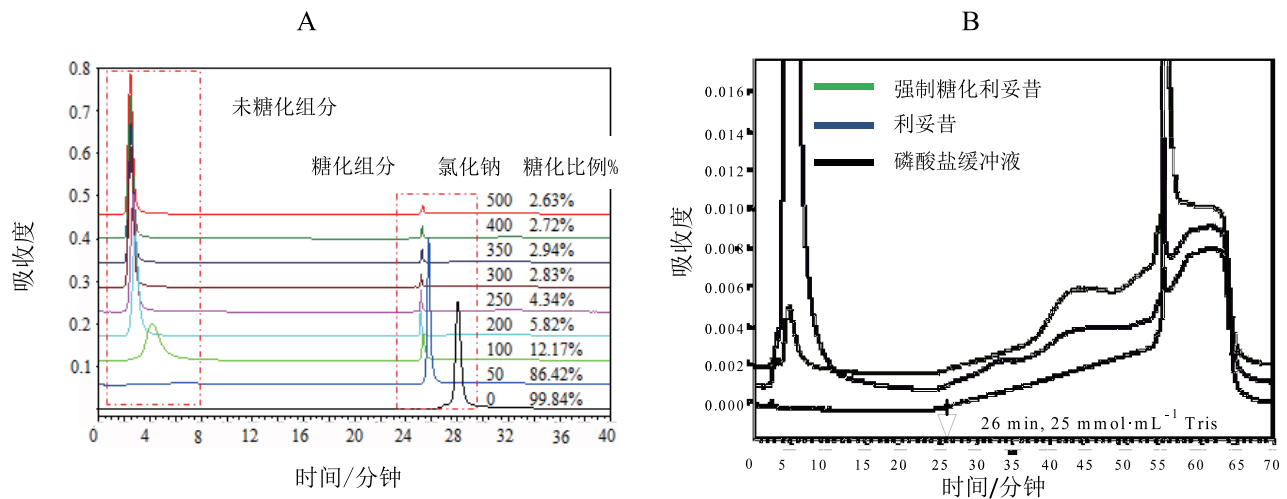
图3 4种流动相检测利妥昔单抗色谱图

3.3 Tris浓度的优化

Tris浓度的改变会引起糖化峰面积百分比的变化, 浓度较低不足以抑制非特异性作用, 浓度过高会使得糖化比例偏低^[16]。因此, 通过Tris浓度线性变化梯度来设定最优的浓度, 既抑制二次相互作用, 又不影响糖蛋白与硼酸盐配体之间的强相互作用。分别配制流动相A: 100 mmol · L⁻¹ HEPES, 300 mmol · L⁻¹ NaCl, 125 mmol · L⁻¹ Tris; 流动相B: 100 mmol · L⁻¹ HEPES, 300 mmol · L⁻¹ NaCl; 流动相C: 500 mmol · L⁻¹ 山梨醇, 100 mmol · L⁻¹ HEPES, 300 mmol · L⁻¹ NaCl, 125 mmol · L⁻¹ Tris。梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 100% B; 20 ~ 50 min,

0% ~ 100% A, 100% ~ 0% B; 50 ~ 55 min, 100% ~ 0% A, 0% ~ 100% C; 55 ~ 60 min, 100% C; 60 ~ 61 min, 100% B, 100% ~ 0% C; 61 ~ 70 min, 100% B)。

在Tris线性梯度洗脱时, 洗脱时间 (20 ~ 50 min) 与Tris浓度 (0 ~ 125 mmol · L⁻¹) 的变化呈线性关系。如图4B所示, 在26 min时, Tris浓度可以消除非特异性静电吸附, 但是不影响糖化蛋白与色谱柱中硼酸盐配体之间的作用^[16], 之后随着Tris浓度的增加, 单个糖化组分和多糖化组分依次洗脱, 最终Tris浓度定为26 min时的25 mmol · L⁻¹。



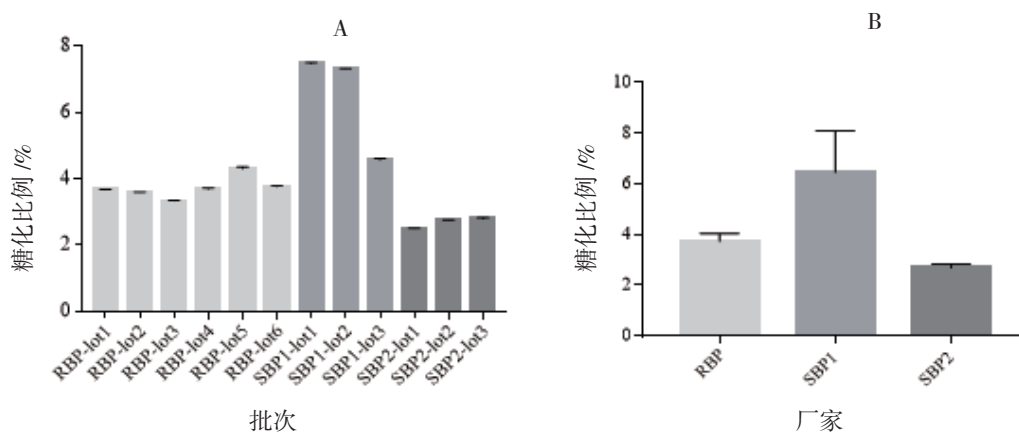
A. 不同 NaCl 浓度下糖化峰面积百分比对比图; B. Tris 优化图谱。

图 4 流动相条件优化结果图谱

糖化反应会影响单克隆抗体的异质性、安全性、稳定性, 某些关键位点如互补决定区 (Complementarity Determining Region, CDR) 上的糖化还可能会影响其生物学活性^[8,21]。因此, 在单抗研发阶段对抗体糖化进行表征以及在可比性研究和质控放行中进行检测是十分必要的。

本研究通过方法优化和验证建立了基于BAC的单抗糖化分析方法, 该方法具有良好的准确性和精密密度, 可以对单抗糖化比例进行准确定量。基于其分离原理, 同样可以对果糖、半乳糖等糖化的单抗

进行分离和定量。利用该方法, 对多批次利妥昔单抗抗原研药和2家已上市的生物类似药的糖化比例进行了检测。结果发现, 如图5, 同一厂家生产的利妥昔单抗不同批次间的糖化比例较为一致, 而不同厂家间却存在一定的差异, 表明各厂家利妥昔单抗生产工艺较为稳定、批间一致性良好; 尽管糖化比例不高, 但利妥昔单抗抗原研药和生物类似药之间还是存在一定的差异。对于糖化是否会影响利妥昔单抗的功能活性以及稳定性, 将进一步开展研究。



A. 不同批次间的糖化峰面积百分比; B. 不同厂家间的糖化峰面积百分比。

图5 利妥昔单抗糖化比例结果分析

单抗类药物作为结构功能复杂的生物大分子,具有复杂的修饰和异质性,对其结构表征和质控评价非常依赖于分析方法,本研究建立的BAC分析方法可用于单抗糖化比例的检测和组分的收集。对于单抗的糖化研究,通常被忽视。建议在单抗研发期间,采用合适的分析方法如LC-MS、BAC等表征和定量方法,对候选单抗上糖化修饰对单抗功能活性、稳定性、异质性以及免疫原性等方面的影响开展相关研究和评价,以明确糖化修饰是否为关键质量属性,并进一步通过发酵工艺和制剂配方研究使之控制在合理的范围内。

参考文献:

- [1] Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular injury[J]. *Circulation*, 2006, 114 (6): 597-605.
- [2] Monnier VM, Sell DR, Genuth S. Glycation Products as Markers and Predictors of the Progression of Diabetic Complications[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1043: 567-581.
- [3] Gadgil HS, Bondarenko PV, Pipes G, et al. The LC/MS Analysis of Glycation of IgG Molecules in Sucrose Containing Formulations[J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96 (10): 2607-2621.
- [4] Fischer S, Hoemschemeyer J, Mahler H C. Glycation during Storage and Administration of Monoclonal Antibody Formulations[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 70 (1): 42-50.
- [5] Awotwe-Otoo D, Agarabi C, Read EK, et al. Product and Process Understanding to Relate the Effect of Freezing Method on Glycation and Aggregation of Lyophilized Monoclonal Antibody Formulations[J]. *Int J Pharm*, 2015, 490 (1-2): 341-350.
- [6] Agarwal N, Mason A, Pradhan R, et al. Kinetic Modeling as a Tool to Understand the Influence of Cell Culture Process Parameters on the Glycation of Monoclonal Antibody Biotherapeutics[J]. *Biotechnol Prog*, 2019, 35 (5): e2865.
- [7] Jacobitz AW, Dykstra AB, Spahr C, et al. Effects of Buffer Composition on Site-Specific Glycation of Lysine Residues in Monoclonal Antibodies[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 109 (1): 293-300.
- [8] Mo J, Jin R, Yan Q, et al. Quantitative Analysis of Glycation and Its Impact on Antigen Binding[J]. *MAbs*, 2018, 10 (3): 406-415.
- [9] Brady LJ, Martinez T, Balland A. Characterization of Nonenzymatic Glycation on a Monoclonal Antibody[J]. *Anal Chem*, 2007, 79 (24): 9403-9413.
- [10] Priego Capote F, Sanchez JC. Strategies for Proteomic Analysis of Non-Enzymatically Glycated Proteins[J]. *Mass Spectrom Rev*, 2009, 28 (1): 135-146.
- [11] Wei B, Berning K, Quan C, et al. Glycation of Antibodies: Modification, Methods and Potential Effects on Biological Functions[J]. *MAbs*, 2017, 9 (4): 586-594.
- [12] Zhang Q, Schepmoes AA, Brock JW, et al. Improved

- Methods for the Enrichment and Analysis of Glycated Peptides[J]. *Anal Chem*, 2008, 80 (24) : 9822-9829.
- [13] Miksik I, Deyl Z. Post-translational Non-enzymatic Modification of Proteins. II. Separation of Selected Protein Species after Glycation and Other Carbonyl-Mediated Modifications[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 699 (1-2) : 311-345.
- [14] Lapolla A, Brioschi M, Banfi C, et al. Nonenzymatically Glycated Lipoprotein ApoA-I in Plasma of Diabetic and Nephropathic Patients[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1126: 295-9.
- [15] Rosca MG, Mustata TG, Kinter MT, et al. Glycation of Mitochondrial Proteins from Diabetic Rat Kidney is Associated with Excess Superoxide Formation[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289 (2) : F420-430.
- [16] Viski K, Gengeliczki Z, Lenkey K, et al. Parallel Development of Chromatographic and Mass-Spectrometric Methods for Quantitative Analysis of Glycation on an IgG1 Monoclonal Antibody[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1032: 198-204.
- [17] Zhang B, Mathewson S, Chen H. Two-dimensional Liquid Chromatographic Methods to Examine Phenylboronate Interactions with Recombinant Antibodies[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216 (30) : 5676-5686.
- [18] Takatsy A, Boddi K, Nagy L, et al. Enrichment of Amadori Products Derived from the Nonenzymatic Glycation of Proteins Using Microscale Boronate Affinity Chromatography[J]. *Anal Biochem*, 2009, 393 (1) : 8-22.
- [19] Quan C, Alcalá E, Petkovska I, et al. A study in Glycation of a Therapeutic Recombinant Humanized Monoclonal Antibody: Where It is, How It Got There, and How It Affects Charge-Based Behavior[J]. *Anal Biochem*, 2008, 373 (2) : 179-191.
- [20] Zhang B, Yang Y, Yuk I, et al. Unveiling a Glycation Hot Spot in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody[J]. *Anal Chem*, 2008, 80 (7) : 2379-2390.
- [21] Vlasak J, Ionescu R. Heterogeneity of Monoclonal Antibodies Revealed by Charge-Sensitive Methods[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9 (6) : 468-481.

(收稿日期 2022年3月7日 编辑 王雅雯)