

· 重大新药创制专项巡礼 ·

## 重组抗体药物的质量控制

高 凯 陶 磊 王军志

(中国食品药品检定研究院重组技术产品室,北京 100050)

**[摘要]** 重组抗体药物是生物工程关键技术的前沿成果,在肿瘤、自身免疫、器官移植和感染性疾病的治疗中均取得了显著疗效,在生物技术药物市场中的比重也在迅速攀升。作为生物技术产业化领域最成功的产品之一,如何通过质量控制确保抗体药物的安全有效一直是本领域的关注热点。文中就重组抗体药物质量控制的关键环节、进展及未来需要进一步开展的工作作一简要综述。

**[关键词]** 生物技术药物;重组抗体;质量控制

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2011)19-1848-08

## Quality control for recombinant therapeutic antibodies

GAO Kai, TAO Lei, WANG Jun-zhi

(Division of Biopharmaceuticals, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** Recombinant therapeutic antibodies are one of the great achievements of modern biotechnology. There is no doubt that the uses of recombinant therapeutic antibodies were successful in treating various life-threatening and chronic diseases, including cancer, autoimmunity, transplantation and infectious diseases. Its share in the global biopharmaceutical market also increased rapidly in recent years. Meanwhile, as one of the most successful outcome biotherapeutics, how to ensure the safety and efficacy of recombinant antibody products through well established quality control system is always the focus of attention from both the views of regulatory authorities and industries. This article briefly reviewed the key points, research progress for the control of recombinant antibodies, as well as raised further work on quality control issues.

**[Key words]** biopharmaceutics; recombinant therapeutic antibodies; quality control

药品的质量源于设计,而非依赖终产品的检测<sup>[1]</sup>,重组抗体药物也不例外。广义的质量控制包括生产过程控制、终产品质量控制等环节。抗体由两条重链和轻链以链间二硫键形成连接,结构复杂、相对分子质量大,采用哺乳动物细胞表达体系制备通常含有翻译后修饰,与原核体系制备的生物技术产品相比,其质量控制难度相对较大。重组抗体药

物的生产过程包括工程细胞的构建及传代扩增、细胞培养、抗体的纯化、产品分装保存等。因此生产单位需遵循药品生产质量管理规范(GMP)的总体要求建立质量体系,并通过质量保证部门对生产过程实施全程监控才能确保终产品的安全有效。鉴于抗体药物生产过程与其他生物技术药物类似,本文未对抗体药物生产的过程控制进行阐述(相关内容可参见国家食品药品监督管理局与ICH指导原则等),而主要侧重于介绍重组抗体药物生产细胞、质控用标准物质、产品质量控制方面的研究进展。

### 1 生产细胞的质量控制

重组单抗的生产细胞应来自于共同的原始细胞,具有相同的遗传和生物学特征,经全面检测无病原微生物污染,在特定的培养条件下,可以稳定持续地表达结构正确并具有生物学活性的抗体<sup>[2]</sup>。

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09307-001);国家高技术研究发展计划(863计划)(2007AA021601, 2007AA021204)

**[作者简介]** 高凯,男,博士,副研究员,主要从事生物技术药物质量控制研究。联系电话:(010)67095684, E-mail: gaokai@nicpbp.org.cn。

**[通讯作者]** 王军志,男,研究员,博士生导师,主要从事生物技术药物的质量控制和质量标准研究。联系电话:(010)67095380, E-mail: wangjz@nicpbp.org.cn。

## 1.1 工程细胞的构建

首先应清楚所采用细胞系的来源及培养历史等有关背景资料,包括细胞种属及地域来源、病原体检测结果、最初分离培养和建系信息、采用的方法与原材料等。在构建中应说明构建和筛选的手段与步骤、克隆基因的序列、插入载体目的基因编码区和相关侧翼序列,说明载体引入细胞的方法及载体在细胞内的状态与拷贝数,并应提供宿主和载体结合后的遗传稳定性资料。同时还应明确细胞的生长特征、培养条件、培养液组成、导入目的基因的表达水平等<sup>[3-4]</sup>。

## 1.2 细胞库的建立

细胞库的建立可为重组抗体药物提供质量稳定以及能持续传代的细胞种子,从而确保抗体药物生产的批间一致。与其他生物技术药物的要求类似,抗体生产的细胞库为三级管理,即原始细胞库、主细胞库及工作细胞库<sup>[5]</sup>。

原始细胞库是由一个原始细胞群体发展成传代稳定的细胞群体或经过克隆选择而形成的均一细胞群体。主细胞库、工作细胞库则分别由原始细胞库和主细胞库经传代后均匀混合而成。其中主细胞库最多不得超过2个细胞代次,同时限定工作细胞库代次。工作库冻存时细胞的传代水平须确保复苏后传代增殖的细胞量能满足生产一批制品。复苏后细胞的传代水平不应超过批准用于生产的最高限定代次。细胞库的管理要求建立台账,每支细胞有明确标记,包括名称、代次、批号、冻存日期等。主库和工作库应分别存放,非生产用细胞应与生产用细胞严格分开存放。上述各级种子库的细胞应按照特定的要求经过全面检定合格后方可使用。

## 1.3 细胞检定

抗体药物的生产细胞检定包括鉴别、病原微生物、致瘤性等检查,同时以基因工程技术构建的重组抗体生产细胞,还应包括特异的鉴别试验与细胞基质稳定性内容<sup>[6]</sup>。

### 1.3.1 细胞鉴别

细胞鉴别可通过形态、生化方法(同工酶等)、免疫学检测(组织相容性抗原等)、遗传学检测(染色体核型等)<sup>[7]</sup>、遗传标志检测(DNA指纹图谱等)等方法,并应采用不同方法进行联合检测。抗体基因或其表达产物可通过PCR、限制性内切酶谱、Southern杂交以及免疫印迹等方法进行鉴别。建库后应对主库和生产终末细胞进行全检,同时新建的工作库细胞也需按规定要求进行检定。

### 1.3.2 病原微生物检测

该项检测包括无菌、支原体、细胞内、外源病毒因子检查。其中病毒检测的种类及方法须根据细胞的种属来源及细胞特性决定<sup>[8]</sup>。通常病毒因子可通过细胞形态观察、红细胞吸附试验、不同细胞传代培养法及接种动物和鸡胚法检测,其中,《中华人民共和国药典》2010年版三部中新增规定:用不同细胞传代培养法检测病毒因子时,应设立可观察细胞病变的病毒阳性对照及血吸附阳性对照。对于重组工程细胞来说,还应当对细胞裂解物或收获液进行外源因子检测<sup>[9]</sup>。

对于逆转录病毒及其他内源性病毒或病毒核酸的检测,可采用逆转录酶活性测定、透射电镜以及感染性试验方法。根据待检细胞系的种属及组织来源,还应进行特殊外源病毒因子的检测。如鼠源细胞系,需检测出血热病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、呼肠孤病毒等;如为人源细胞系,应检测鼻咽癌病毒、巨细胞病毒、乙型、丙型肝炎病毒等。

### 1.3.3 致瘤性检查

致瘤性检查可通过裸鼠和新生小鼠体内试验以及软琼脂克隆形成等体外方法进行。目前重组抗体生产的CHO等细胞株已证明具有致瘤性,通常不再要求进行该项检查,但也有观点认为插入抗体等特定基因序列的重组工程细胞应当被视为全新细胞,须进行致瘤性检查,并在传代/扩增过程中进行试验对比,观察致瘤性特征的改变。基于安全性考虑,还需要优化抗体药物的纯化工艺,并在终产品的放行中严格限量控制残余DNA等具有潜在致瘤性风险的组分。

### 1.3.4 细胞基质的稳定性

作为经DNA重组技术获得的含有特定基因序列的重组抗体生产细胞,生产者还须具有细胞基质的稳定性资料,包括重组细胞的遗传稳定性、目的基因表达稳定性、目标产品持续生产的稳定性,以及在保存时细胞生产抗体产品能力的稳定性等资料<sup>[9]</sup>。

## 2 质量控制标准物质

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。包括抗体在内的生物大分子的结构决定其功能,因此其质控标准物质也包括理化对照品及活性标准品。

### 2.1 标准物质的制备

标准物质的均一、稳定至关重要。因此原料需进行全面的质量分析,甚至在部分关键质控项目上

的标准应高于产品。原料的选择应遵循与供试品相同的原则,其配方研究要在基于不干扰测定结果的前提下,尽可能提高稳定性。理化对照品在经过全面的分析和鉴定后,主要在常规质控中用于结构和翻译后修饰的确证。活性标准品则通过协作标定进行赋值。安瓿分装冻干后熔封的制备方式因其良好的气密性是标准物质制备的首选<sup>[10]</sup>。标准品的分装应在洁净环境下进行,在保持条件一致的前提下,于分装前、中、后阶段以相同时间间隔抽样进行分装精度控制( $\leq 1.0\%$ ),冻干后还应进行无菌、水分等检测,通常标准物质的残留水分应 $\leq 3.0\%$ <sup>[11]</sup>,但该指标与稳定性相关,因此应尽量降低标准物质中水分的残留量。

抗体质控标准物质一般进行冷藏或低温冷冻保存,其有效期需根据稳定性评价确定。

稳定性研究包括热加速试验、期间核查及长期稳定性试验。热加速试验是通过在不同温度条件下加速样品的化学降解或物理变化,通过热动力学参数与数学模型分析预测标准物质在既定储存温度下的活性、含量变化。长期试验则是指在既定的保存条件下进行的实时稳定性监测。为反映出标准物质稳定性特征的全貌,应设定多个指标进行评价,如效价、纯度、含量等<sup>[12]</sup>。

## 2.2 理化对照品

正确的结构是重组抗体发挥其生物学功能的基础。理化对照品不仅是建立抗体药物物质控标准的前提和基础,而且还可简化常规质控方法,无需涉及质谱等大型分析仪器,通过产品与理化对照的比对分析,即可发现产品结构是否存在异常。理化对照品结构的全面鉴定一般包括质谱相对分子质量测定、末端氨基酸序列测定、液质肽图或肽指纹图谱分析、二硫键配对方式以及代表翻译后修饰的糖基化分析等<sup>[13]</sup>。

### 2.2.1 质谱相对分子质量测定

抗体由4条肽链组成,且Fc段具有糖基化修饰,可直接测定完整抗体的相对分子质量,也可以用糖苷酶切除糖基后再测定抗体蛋白部分的相对分子质量,或者以还原剂将二硫键打开后分别测定抗体轻、重链相对分子质量。目前质谱相对分子质量测定主要采用电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)及基质辅助激光解析离子化(matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI)等离子源。蛋白离子化后,通过质量分析器测定其质荷比计算相对分子质量,并与理论相对分子质量进行比较,以初步验

证抗体结构是否正常。

### 2.2.2 末端氨基酸序列测定

末端氨基酸序列测定也是抗体一级结构鉴定的方式之一。通常N-末端氨基酸测定以Edman降解法最为常用。由于抗体的特殊结构,测序时须首先将二硫键还原,并以适当的方法将轻、重链分离后再测定。如果抗体的N-末端存在封闭,则需针对封闭类型,采用相应方法去封闭后再按上述程序进行测定<sup>[14]</sup>。常见封闭形式及去封闭方法见表1。

表1 常见N-末端封闭形式及去封闭方法

封闭基团	修饰残基	去封闭方法
甲酰基	甘氨酸、蛋氨酸	酸水解, 胍解
乙酰基	丝氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、甘氨酸、 谷氨酸、苏氨酸、缬氨酸、脯氨酸	酸水解, 胍解
焦谷氨酰	谷氨酸、谷氨酰胺	焦谷氨酰酶水解

目前C-末端氨基酸序列测定可采用酶法或化学法收集C-末端肽后,再以N-末端测序方法进行;也可以直接对收集的C-末端肽段进行串联质谱分析。此外,还可通过质谱仪测定被羧肽酶酶解后获得的C-末端长短不一肽段的相对分子质量,并根据相邻相对分子质量的差值确定C-末端序列<sup>[15-16]</sup>。

### 2.2.3 液质肽图或肽质量指纹图谱分析

为了进一步鉴定重组抗体的一级结构,可进行液质肽图或肽质量指纹图谱分析。液质肽图是将抗体用蛋白酶酶解为肽段后,先经色谱分离后再以质谱检测,通过相对分子质量测定结果与蛋白酶酶解特性的综合分析来确定各肽段的序列<sup>[17]</sup>。而将酶解所得肽段直接进行质谱检测则称为肽质量指纹图谱。液质肽图的优势在于各肽段经过液相分离后,在质谱相对分子质量测定时相互之间的干扰较弱,但耗时较长;而后者则适宜高通量分析。

### 2.2.4 二硫键分析

IgG1型抗体中,共有16条二硫键,正确配对的链内、链间二硫键是维持重组抗体空间结构和发挥生物学功能的重要保障。二硫键的确定方式可采用液质肽图或肽质量指纹图谱法。即在非还原条件下,将重组抗体直接进行蛋白酶酶切,酶切后有些肽段仍通过二硫键连接在一起,通过对这些肽段进行质谱鉴定即可验证抗体的二硫键配对方式<sup>[18]</sup>。为确保抗体的完全酶解,必要时可分别采用两种或以上的蛋白酶进行酶切,并通过综合分析对抗体二硫键配对的方式进行鉴定。

### 2.2.5 糖基化分析

糖链在维持抗体正常结构及与其他蛋白的相互作用中均发挥了重要作用<sup>[19-20]</sup>,抗体Fc段的糖链改造可显著改变其生物学活性<sup>[21-22]</sup>。因此在抗体的质量控制中,翻译后糖基化修饰的分析是十分必要的。目前主要包括寡糖图谱、糖基化位点分析及糖链结构分析等<sup>[23]</sup>。

寡糖图谱是对重组抗体药物中不同修饰形式的寡糖链所占比例的分析。即将糖苷酶从抗体上切下的糖链衍生、纯化后,再以液相色谱分析确定各寡糖链所占的比例。寡糖多样性形式的进一步分析,可结合文献资料并采用相应的寡糖参考品进行综合比对。

抗体的糖基化主要有N-糖与O-糖两种,位于N-糖还原端的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)与抗体中的天冬酰胺(Asn)的酰胺氮以 $\beta$ 1,4糖苷键相连,且糖基化位点处有特殊的序列子结构“Asn-X-Ser/Thr”,其中“X”为除脯氨酸(Pro)外的任意氨基酸,只有该序列子中的Asn才有可能发生N-糖基化。O-糖虽无特殊序列子结构,但可与抗体中丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)的羟基相连<sup>[24]</sup>。糖基化位点可通过切除糖链前、后的液质肽图或肽质量指纹图谱的方法确定,通过对图谱中相对分子质量的差异肽段进行分析,即可确定糖基化位点。

糖链结构分析目前有多种方法:可通过测定糖链的相对分子质量结合已有的文献资料对糖链结构进行预测<sup>[25]</sup>;也可通过串联质谱的方法测定糖链结构<sup>[26]</sup>;或结合多种糖苷酶对糖链进行分步酶切测定单糖的连接方式<sup>[26]</sup>等。

### 2.3 生物学活性测定标准品

活性测定是抗体质量控制的重要环节。生物学活性测定标准品同样需要遵从材料均匀、性质稳定的要求,同时还需要进行准确的赋值。重组抗体质控用活性标准品的制备、稳定性评价同上所述。通常其冻干制备过程中需要添加稳定剂或赋形剂等辅料,但可通过提高活性成分的分装量,并在梯度稀释进行活性测定前,以提高预稀释倍数的方式将辅料对活性测定的干扰降至最低。虽然目前大多数抗体生物学活性测定是通过供试品与活性标准品 $EC_{50}$ 值的比较确定的相对活性,即没有对生物学活性测定标准品进行赋值,但如果在储存过程中供试品、活性标准生物学活性降低的速率和趋势一致时,以百分含量表示的相对生物学活性是无法客观反应样品有效性的变化的,因此其标准品赋值可借鉴其他生

物技术药物活性测定标准品的方式,即在确定的实验条件下,将其 $EC_{50}$ 值对应的重量单位定义为一个生物学活性单位,并通过协作标定研究进行赋值。

协作标定一般至少选择3家以上实验室参与,被邀请单位需要具备相关的实践经验,不包括预试验在内,每家单位应能提供符合要求、不同日期进行的至少3次独立试验结果。协作标定需按统一的方法进行,方法应包括样品复溶、稀释、样品排列顺序等具体的操作步骤,按统一的方式计算后,借助统计学方法合并处理结果并对活性测定标准品进行赋值<sup>[27]</sup>。

### 3 重组抗体产品的质量控

重组抗体产品的质量控根据相关法规、指导原则的要求及产品自身特性,其原液检定主要包括各种理化分析、活性测定、残留杂质分析等,成品除包括含量与活性测定外,还需要对安全性和注射剂的常规项目进行质控<sup>[28-30]</sup>。

#### 3.1 理化分析

##### 3.1.1 结构确证

抗体药物批检验的常规质控中,针对结构的理化分析主要包括N-末端氨基酸序列、肽图、糖基化分析等测定等,并通过引入已全面分析的理化对照品进行比对,因此在常规批检验质控中,将简化结构鉴定的工作量。N-末端氨基酸测定同理化对照品。在肽图分析中,由于抗体的空间结构复杂、紧密,导致蛋白酶酶解的效果不理想,因此在蛋白酶酶解前,一般先采用化学或物理方法将抗体变性后,再以二巯苏糖醇等还原剂打开二硫键,并对还原后的游离巯基进行烷基化保护,按上述相同条件制备的样品与理化对照品酶解将更完全,同时后续的HPLC分离也将获得较理想肽图。为避免糖链对肽图测定的影响,有时还需要在酶解前先将其切除。糖基化分析根据抗体药物自身的理化特性,结合理化对照品并通过唾液酸含量、寡糖图谱分析等方式进行控制,并可依据供试品唾液酸、各寡糖峰面积与对照品的相应比例进行判定。通过N-末端氨基酸序列、肽图、糖基化分析等测定,结合与理化对照品的比对,可以有效确保生产工艺的稳定及抗体药物的批间一致。

##### 3.1.2 纯度分析

抗体药物的纯度直接反应了纯化工艺水平及产品质量的优劣。为避免一种检测方法在蛋白纯度检测中的偏差,一般选用至少两种不同原理的方法进行检测,以尽可能地分离相关杂质并得到相对准确的纯度结果。测定抗体纯度的常用方法包括SDS-

PAGE 法及毛细管电泳等方法,以及反相、分子排阻和离子交换等高效液相色谱法。还原型 SDS-PAGE 电泳是较常用的方法,标准一般规定轻、重链条带含量之和 $\geq 95.0\%$ 。液相色谱法进行纯度测定时应选择合适的色谱柱及流动相,避免在分析过程中抗体蛋白沉淀挂柱;在正式分析之前应充分平衡色谱柱并做空白对照,空白对照中应无杂峰出现;按面积归一化法计算主峰面积,一般不应低于总面积的 $95.0\%$ 。

### 3.1.3 蛋白含量测定

蛋白含量测定目前常用的方法主要包括分光光度法、Lowry 法、Bradford 法、BCA 法、凯氏定氮法等。除凯氏定氮法以外,其余方法的原理均与蛋白结构和氨基酸组成相关,并且所需含量测定对照品要和供试品一致<sup>[31]</sup>。目前绝大多数重组抗体的含量测定采用的是分光光度法。其消光系数是根据 Edelhoch 研究建立的色氨酸、酪氨酸、半胱氨酸模型化合物在 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸胍条件下,可被用于同等变性条件下对其他非折叠蛋白消光系数进行估算的原理所确定。结合该变性消光系数,再通过与不同浓度天然蛋白、变性蛋白吸光值的校正计算即可获得该目标蛋白的消光系数<sup>[32]</sup>,但该消光系数是通过模型化合物以及与变性蛋白的比对分析估算获得。目前国外生物技术产品含量测定中,已多采用与供试品具有相同结构的标准物质进行含量测定,但均无公开的含量溯源资料。凯氏定氮通过含氮量分析进行蛋白含量测定,反应中消耗的标准酸滴定液可溯源至恒重无水碳酸钠的重量<sup>[33]</sup>,因此无需其他蛋白标准物质,可作为含量标准品溯源的方法,同时氨基酸组成分析也是可供选择的手段之一。

### 3.1.4 其他理化特性分析

此类质控主要包括相对分子质量和等电点等指标。相对分子质量也主要采用还原型 SDS-PAGE 电泳的方法,标准一般规定为理论相对分子质量 $\pm 10\%$ 以内,并通过与理化对照的迁移率进行校正。等电聚焦电泳是重组抗体等电点测定的常用方法,其 pH 梯度主要由两性电解质建立。由于溶媒中存在的盐会破坏 pH 梯度,因此可采用透析、超滤、过柱等方法进行脱盐。测定重组抗体的等电点时,由于其糖基化的不均一使抗体所带电荷不同,测定结果中会出现多个电泳条带,因此重组抗体的等电点测定结果通常为一个 pH 范围,并且应与已全面分析的理化对照品一致。

## 3.2 生物学活性

生物学活性测定是确保重组抗体有效性的重要

质控指标。抗体与其特异的靶点结合后,通过细胞因子信号的阻断、补体系统的活化、耦联毒素杀伤等生物学作用发挥重组抗体的治疗功效,其生物学活性测定主要是在体外建立相应的细胞评价模型,模拟其作用机制产生客观的全程量效反应,并通过与活性标准品的比较对其生物学活性进行评价。根据其作用机制主要分为补体依赖的细胞毒法、细胞/生长因子信号通路阻断后产生的杀伤活性中和或细胞增殖抑制法、报告基因测定等方法。如无法建立特异的细胞学量效反应模型,也可以测定重组抗体与其作用靶点的结合能力作为其功能性的评价指标,主要测定方法包括 ELISA 法、流式细胞仪法和基于表面等离子共振技术(surface plasmon resonance, SPR)的生物分子相互作用分析法(biomolecular interaction analysis, BIA)等。

### 3.2.1 重组抗体的生物学活性测定

3.2.1.1 补体依赖的细胞毒(complement dependent cytotoxicity, CDC)法 重组抗 CD20 单抗的活性测定即采用该方法。将重组抗体进行系列稀释后与表达 CD20 的效应细胞结合,重组抗体与细胞表面抗原形成抗原抗体复合物的过程中,使抗体空间结构发生变化并暴露 Fc 段的补体结合位点;通过与补体的孵育及其级联激活,完成攻膜复合物的装配并在细胞表面打孔,最终导致细胞溶解。细胞染色后,以抗体浓度对吸光度作图,并以 4 参数方程拟合曲线可得到全程反应的“反 S 形”曲线,通过供试品与活性标准品  $EC_{50}$  值的比较即可对重组抗体的相对活性进行计算和评价。

3.2.1.2 信号通路阻断法 细胞因子等激动剂需要与细胞膜上的受体结合、激活相应的信号通路后才能发挥其生物学效应。以此类细胞/生长因子或其受体为靶点的重组抗体的生物学活性可基于这一特点建立相应的生物学活性测定方法,主要包括杀伤中和活性或特异的细胞增殖抑制活性等。

以抗肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )单抗为例,该重组单抗能特异识别结合 TNF- $\alpha$ ,并通过阻断 TNF- $\alpha$ 与受体结合而拮抗 TNF- $\alpha$ 的细胞毒性,使其免受 TNF- $\alpha$ 诱导的凋亡。该抗体活性测定采用对 TNF- $\alpha$ 杀伤敏感的细胞系,将抗体做系列稀释后与 TNF- $\alpha$ 共孵育,使抗体与 TNF- $\alpha$ 结合。待孵育结束后加入对 TNF- $\alpha$ 杀伤敏感的细胞进行培养,未被中和的 TNF- $\alpha$ 将与细胞膜上的受体结合并诱导凋亡。通过对存活细胞的染色、测定其吸光度值,将抗体浓度与

存活细胞的量效关系进行 4 参数拟合后,计算其  $EC_{50}$ ,并与标准品比较后即可评价抗体的相对活性。而表皮生长因子受体(EGFR)单抗的生物学活性测定则是采用细胞增殖抑制方式,即通过特异结合并封闭表皮生长因子受体,有效抑制肿瘤细胞生长,并通过供试品与标准品的梯度稀释获得增殖抑制的量效曲线,并计算重组抗体的生物学活性。

**3.2.1.3 报告基因法** 报告基因法也是通过重组抗体与相应靶点结合后,测定信号通路变化效应的活性评价方式。一般在细胞株难于获得,以及杀伤中和或增殖抑制法产生量效曲线的信噪比不理想时,可基于对该通路的现有了解,将携带抗体作用靶点反应元件与报告基因的质粒稳定转染细胞后,通过重组抗体与相应靶点的作用,启动报告基因的表达来检测重组抗体的生物学活性。如在 VEGF 单抗的活性测定中,将携带 VEGF 受体和萤光素酶报告基因的质粒共转染 293 细胞,筛选后得到稳定携带上述质粒的细胞。当 VEGF 与该重组细胞膜上的受体结合后,可通过胞内结构域的变构与相应信号通路的作用,活化萤光素酶报告基因的表达。将系列梯度稀释的供试品与标准品与一定浓度的 VEGF 孵育后,与该重组细胞共培养即可获得 VEGF 单抗的活性量效曲线。IL-1 $\beta$  单抗也采用了携带类似报告基因的细胞株进行活性测定。

### 3.2.2 重组抗体的结合活性测定

**3.2.2.1 ELISA 法** 竞争 ELISA 是最常用的重组抗体结合活性测定方法。首先将制备的可溶性抗原包被后,将系列梯度稀释的供试品、标准品与一定浓度的酶标抗体竞争结合包被抗原,将抗体浓度与吸光值的量效关系进行 4 参数拟合后,计算供试品、标准品的  $EC_{50}$  值评价重组抗体的结合活性。

**3.2.2.2 流式细胞仪法** 该方法原理与竞争 ELISA 相同,只是以带有特异结合位点或膜表面标记分子的细胞替代了包被的可溶性抗原或受体,通过流式细胞仪测定阳性细胞率来检测竞争结合的效果。该方法避免了相应抗原的制备过程,对难于获得可溶性抗原的重组抗体可采用该方法进行结合活性测定,同时细胞表面抗原的空间结构近乎于天然存在形式,其测定结果应更加客观。

**3.2.2.3 BIA 法**<sup>[34-35]</sup> 基于 SPR 的 BIA 法测定周期短、待测样品消耗量少,该方法在测定抗原抗体结合活性时无需标记,避免了标记对分子结构的影响,可更加真实地反映抗原抗体的结合情况。其检测芯

片可固化可溶性的抗原和细胞,待测抗体通过微液流系统流经芯片时,一旦与固化抗原结合,芯片表面的蛋白浓度就会增加,进而引起芯片表面液体折射率的变化而被检测到。BIA 技术的优势还在于能实时动态监测抗原抗体的结合反应,并测定亲和常数等反应参数。

### 3.3 残留杂质

重组抗体一般由哺乳动物细胞表达生产,因此需要对制品中来自表达体系及纯化过程中可能存在的外源组分进行限量控制。根据其生产工艺,相关杂质的限量控制主要包括残余 DNA、残余宿主细胞蛋白、残留蛋白 A 等。其中针对宿主细胞蛋白、蛋白 A(亲和纯化柱的配基)的残留限量检测主要采用夹心 ELISA 的方法。

传代细胞系的 DNA 理论上具有致瘤性的潜在风险, FDA 将生物制品可以允许的残余 DNA 限度规定为每剂量不超过 100 pg<sup>[30]</sup>,我国也规定须用敏感的方法测定来源于宿主细胞(包括转化的哺乳动物传代细胞)的残余 DNA 含量<sup>[36]</sup>,其限量规定为每剂量小于 100 pg。目前残余 DNA 的检测方法主要包括杂交、荧光染色、定量 PCR 等方法<sup>[37-40]</sup>。杂交法主要采用地高辛等非放射性材料标记核酸探针,无需特殊仪器设备,但在实际工作中通常需要对供试品及 DNA 标准进行蛋白酶消化等同步处理,会造成检测灵敏度的降低。荧光染料法采用 PicoGreen 等可特异与双链 DNA 形成复合物的荧光染料<sup>[41]</sup>,以荧光酶标仪检测,根据标准曲线与供试品的荧光强度,计算 DNA 残留量。该方法简便快捷,但由于抗体药物残余 DNA 质控标准较高和检测限的原因,荧光染色法通常不适用于抗体药物的 DNA 残留控制。

### 3.4 重组抗体药物的成品质控

重组抗体药物的成品除含量、生物学活性及必要的理化特性检测外,还应该按照注射剂的要求,进行其他常规项目的检测,包括鉴别试验、外观、可见异物、装量、水分、pH 值、无菌检查、细菌内毒素检查、异常毒性检查等,具体测定方法参见现行《中华人民共和国药典》及其他相关技术文件。

## 4 重组抗体药物未来需要开展的工作

我国重组抗体药物的质量控制技术随着抗体药物研发的深入也在不断的发展和完善。未来抗体药物物质控仍需进一步关注以下几个主要方面。

### 4.1 生产细胞的质量控制

目前现行版药典关于细胞库管理和检定要求,经多年的实践证明可以保障重组抗体等生物技术药



物生产细胞株的总体质量,但作为逆转录病毒检测常用方法的逆转录酶活性测定仍有待进一步完善,即需建立均一、稳定的 RNA 模板和逆转录酶活性标准品,并采用诸如定量 PCR 等方法进行酶活性定量。

#### 4.2 重组抗体结构分析

质谱仪、毛细管电泳仪、新型高效液相系统等新型仪器的应用,可有效提升抗体质控中结构分析的水平。例如国外研发单位在重组抗体理化对照品充分研究、鉴定的基础上,已在重组抗体肽图的质控中,将质控标准从对翻译后修饰肽段的定性分析提高为定量检测,而由于各种条件的制约,目前我国重组抗体物质控理化对照品的研究还不够详尽,并且质控标准中肽图分析结果仅要求与对照品一致。同时重组抗体翻译后修饰的糖链十分复杂,并且其结构与生物学功能相关,因此糖基化分析十分具有挑战性,因此也是抗体质量控制的重点和难点。目前虽然可以采用质谱等分析手段对唾液酸、寡糖图谱和糖基化位点进行分析,并反映一定的糖基化信息,但目前没有一种简便易行的方法,能快速地对糖链的结构进行全面的分析和鉴定。

#### 4.3 重组抗体生物学活性检测

抗体活性检测方法因其功能各异而具有多样性,通常于体外采用细胞评价模型模拟其作用机制产生量效反应进行,但在实际工作中,有些活性检测周期较长,步骤繁琐、影响因素多,重复性不理想,并且有些重组抗体药物无法找到合适的细胞株进行活性测定,进而采用抗体结合活性作为其功能性评价指标。针对上述有待进一步完善的环节,可基于对胞内信号传导通路的了解,构建相应的转基因细胞,以期建立更加准确、耐用和便捷的活性测定方法。另一方面,目前抗体生物学活性测定标准主要是以相对于标准品活性的百分含量体现的,即是一个相对生物学活性结果,如能够借鉴其他生物学技术物质控经验,对重组抗体药物的生物学活性单位进行科学的赋值和定义,并加强标准物质稳定性的研究,将可以更加客观有效地评价重组抗体产品的有效性,同时也便于类似抗体产品之间的比对研究。

#### 4.4 重组抗体残留杂质分析

在重组抗体质控中,需要对宿主细胞蛋白、蛋白 A 残留进行限量控制。虽然抗体生产中主要采用 CHO 细胞和蛋白 A,但各单位细胞株、生产工艺均非一致,因此研发单位应根据各自的生产工艺制备相应的残量控制对照品、抗体,并建立相应检测方

法。如采用商用试剂盒,其专属性、检测限、回收率等参数需经验证通过后方可使用。

由于重组抗体药物剂量大,杂交法、荧光染色法虽然可以通过增加标准品回收率、待检样品中核酸富集等前处理步骤,对制品中的核酸残量进行控制,但由于方法的局限性仍需进一步完善。而定量 PCR 方法在特异性、灵敏度、准确性方面具有独特的优势,可比较客观地对残余 DNA 定量,并且反映片段的相对分子质量分布。但该方法仍需要对引物设计、标准品等做进一步的优化与规范。同时残余 DNA 的检测也需要结合工艺验证来综合控制。

#### 5 结语

如何更加科学有效地对重组抗体药物的质量进行控制,还需要结合临床评价及上市后的安全性监测,进一步对质控方法学、相关标准物质开展深入研究。本文对国内外有关重组抗体药物的质量控制研究进展和亟待解决的问题进行综述,旨在抛砖引玉,引发大家对相关问题的关注和讨论。

志谢:感谢中国食品药品检定研究院重组技术产品室饶春明研究员对于本文提供的相关资料及修改意见。

#### [参 考 文 献]

- [1] RATHORE AS, MHATRE R. Quality by design for biopharmaceuticals: principles and case studies [M]. John Wiley & Sons, 2009: 1.
- [2] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 重组制品生产用哺乳动物细胞质量控制技术评价一般原则 [EB/OL]. [2006-10]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=59>.
- [3] Derivation and characterization of cell substrates used for production of biotechnological/biological products [EB/OL]. [1997-07-16]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5D/Step4/Q5D_Guideline.pdf).
- [4] Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research: Bethesda. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals [S]. MD, USA: 1987.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部) [S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社 2010: 15.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部) [S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社 2010: 16-17.
- [7] 张岩锐, 段丽娟, 苟凝虹, 等. 重组 CHO-C28 细胞染色体鉴定方法的研究 [J]. 微生物学免疫学进展 2006, 34(4): 40-43.
- [8] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 生物组织提取制品和真核细胞表达制品的病毒安全性评价技术审评一般原则 [EB/OL]. [2005-12]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=53>.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部) [S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社 2010: 19.
- [10] 周海钧. 药品生物检定 [M]. 北京:人民卫生出版社 2005: 163-172.

- [11] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 第2版. 北京: 科学出版社 2007: 138 - 140.
- [12] Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products [EB/OL]. [1995 - 11 - 30]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf).
- [13] 陶磊 饶春明 高凯 等. 重组嵌合抗 CD20 IgG1 型单克隆抗体的结构验证[J]. 药学学报 2010 45(6): 752 - 755.
- [14] HIRANO H ,KOMATSU S ,KAJIWARA H *et al.* Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by western blotting[J]. *Electrophoresis* ,1993 ,14(9): 839 - 846.
- [15] HAMBERG A ,KEMPKA M ,SJÖDAHL J *et al.* C-terminal ladder sequencing of peptides using an alternative nucleophile in carboxypeptidase Y digests [J]. *Anal Biochem* ,2006 ,357(2): 167 - 172.
- [16] PATTERSON DH ,TARR GE ,REGNIER FE *et al.* C-terminal ladder sequencing via matrix-assisted laser desorption mass spectrometry coupled with carboxypeptidase Y time-dependent and concentration-dependent digestions [J]. *Anal Chem* ,1995 ,67(21): 3971 - 3978.
- [17] REHDER DS ,DILLON TM ,PIPES GD *et al.* Reversed-phase liquid chromatography/mass spectrometry analysis of reduced monoclonal antibodies in pharmaceuticals [J]. *J Chromatogr A* , 2006 ,1102(1-2): 164 - 175.
- [18] 饶春明 陶磊 史新昌 等. 重组人干扰素  $\alpha 1b$  质量肽图分析及二硫键定位[J]. 药物分析杂志 ,2007 ,27(10): 1505 - 1510.
- [19] JONES AJ ,PAPAC DI ,CHIN EH *et al.* Selective clearance of glycoforms of a complex glycoprotein pharmaceutical caused by terminal N-acetylglucosamine is similar in humans and cynomolgus monkeys [J]. *Glycobiology* 2007 ,17(5): 529 - 540.
- [20] NIMMERJAHN F ,ANTHONY RM ,RAVETCH JV. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for *in vivo* activity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ,104(20): 8433 - 8437.
- [21] DAVIES J ,JIANG L ,PAN LZ *et al.* Expression of GnTIII in a recombinant anti-CD20 CHO production cell line: Expression of antibodies with altered glycoforms leads to an increase in ADCC through higher affinity for FC gamma RIII [J]. *Biotechnol Bioeng* 2001 ,74(4): 288 - 294.
- [22] SHINKAWA T ,NAKAMURA K ,YAMANE N *et al.* The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity [J]. *J Biol Chem* 2003 ,278(5): 3466 - 3473.
- [23] STADLMANN J ,PABST M ,KOLARICH D *et al.* Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides [J]. *Proteomics* 2008 ,8(14): 2858 - 2871.
- [24] COOPER CA ,PACKER NH ,REDMOND JW. The elimination of O-linked glycans from glycoproteins under non-reducing conditions [J]. *Glycoconj J* ,1994 ,11(2): 163 - 167.
- [25] BECK A ,BUSSAT MC ,ZORN N *et al.* Characterization by liquid chromatography combined with mass spectrometry of monoclonal anti-IGF-1 receptor antibodies produced in CHO and NSO cells [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005 , 819(2): 203 - 218.
- [26] QIAN J ,LIU T ,YANG L *et al.* Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion [J]. *Anal Biochem* 2007 ,364(1): 8 - 18.
- [27] 王军志. 生物技术药物研究开发和质量控制[M]. 第2版. 北京: 科学出版社 2007: 142 - 147.
- [28] Specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products [EB/OL]. [1999 - 03 - 10]. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q6B/Step4/Q6B_Guideline.pdf).
- [29] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 人用单克隆抗体质量控制技术指导原则 [EB/OL]. [2003 - 03 - 20]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=39>.
- [30] U. S. Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in the manufacture and testing of monoclonal antibody products for human use (1997) [J]. *J Immunother* ,1997 ,20(3): 214 - 243.
- [31] SAPAN CV ,LUNDBLAD RL ,PRICE NC. Colorimetric protein assay techniques [J]. *Biotechnol Appl Biochem* ,1999 ,29(2): 99 - 108.
- [32] GILL SC ,VON HIPPEL PH. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data [J]. *Anal Biochem* , 1989 ,182(2): 319 - 326.
- [33] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部) [S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 附录 34.
- [34] ABDICHE YN ,MALASHOCK DS ,PONS J. Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab ,a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody ,using a repertoire of biosensors [J]. *Protein Sci* 2008 ,17(8): 1326 - 1335.
- [35] MURPHY M ,JASON-MOLLER L ,BRUNO J. Using Biacore to measure the binding kinetics of an antibody-antigen interaction [J]. *Curr Protoc Protein Sci* 2006 ,Chapter 19: Unit 19. 14.
- [36] 国家食品药品监督管理局药品审评中心. 人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则 [EB/OL]. [2003 - 03 - 20]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=41>.
- [37] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(三部) [S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社 2010: 附录 60 - 61.
- [38] 饶春明 赵阳 李永红 等. 应用荧光法测定重组细胞因子中残余 DNA 含量 [J]. 药物分析杂志 2005 25(12): 1417 - 1419.
- [39] 王兰 高凯 毕华 等. 荧光法和 DNA 杂交法检测重组技术产品中残余 DNA 的比较 [J]. 药物分析杂志 ,2009 ,29(7): 1063 - 1066.
- [40] 王兰 李永红 饶春明. 实时定量 PCR 检测重组技术产品中宿主基因组 DNA 残留 [J]. 药物分析杂志 ,2009 ,29(10): 1593 - 1596.
- [41] SINGER VL ,JONES LJ ,YUE ST *et al.* Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation [J]. *Anal Biochem* , 1997 ,249(2): 228 - 238.

编辑: 周卓/接受日期: 2011 - 06 - 20

