

利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的电荷异构体及聚集体分析



作者

Bian Yulan
全球解决方案开发中心
全球实验室解决方案营销部 (LSS)
安捷伦科技新加坡 (销售) 私人
有限公司

摘要

单克隆抗体是用于治疗各种疾病的一类重要的生物分子。生物仿制药是创新药物分子的复制品，需要详细表征其关键质量属性 (CQA)，例如聚集体和电荷异构体。与创新药物相比，这些属性必须处于一定范围内才可获得监管机构批准。本研究采用基于 Agilent 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱和 Agilent AdvancedBio 色谱柱的两种分析工作流程，对不同制造商生产的两种利妥昔单抗生物仿制药与创新药物的聚集体和电荷异构体图谱进行了比较。结果显示了创新药物与生物仿制药在聚集体和电荷异构体图谱方面的相似性或差异性。生物仿制药 1 与创新药物在聚集体和电荷异构体方面的相似性高于生物仿制药 2。方法表现出优异的日内和日间重现性。Agilent OpenLab CDS 软件的 Peak Explorer 功能使数据审查一目了然。本研究是一系列利妥昔单抗生物相似性研究的一部分。

前言

单克隆抗体 (mAb) 药物是制药市场上增长最快的生物治疗药物之一。大多数 mAb 用于治疗癌症^[1]。mAb 创新药物在发现、开发、生产和临床试验方面投资巨大，这也导致患者接受创新药物治疗的费用通常很高。因此，创新药物的廉价仿制药（称为“生物仿制药”）的需求量很大。第一款生物仿制药于 2006 年获准进入欧洲市场，进入美国市场则是在九年后，此时美国已于 2010 年 3 月实施《平价医疗法案》。由于创新药物分子专利到期，生物仿制药的开发越来越受关注。

为了使生物仿制药获得监管机构批准，制造商需要证明其生物制剂与对照品之间在安全性、纯度和效价方面不存在具有临床意义的差异^[2]。在这一过程中，关键在于开展广泛的比较分析研究，以了解创新药物与生物仿制药之间的理化相似性。

聚集体、截短体和其他修饰形式（脱酰胺、异构化等）是在生产过程或储存过程中产生的与产品相关的杂质。药物中存在这些杂质时，会影响药物的稳定性、活性和有效性。因此，它们通常被视为 CQA，并且在整个生产过程中受到密切监控和检测^[3]。

本应用简报使用两种分析工作流程展示了两种利妥昔单抗生物仿制药与其创新药物之间在聚集体和异构体方面的比较结果。众所周知，利妥昔单抗是一种生物治疗药物，用于治疗类风湿性关节炎、狼疮、血管炎和皮炎。两种生物仿制药来自两家位于不同地理位置的制造商。两种工作流程均基于配备 AdvancedBio 色谱柱和 OpenLab CDS 的 1260 Infinity II 生物惰性液相色谱系统。在弱阳离子交换 (WCX) 色谱柱上分离电荷异构体，在体积排阻 (SEC) 色谱柱上分离聚集体。图 1 详细展示了两种工作流程。日内结果和日间结果具有良好的重现性，确保了工作流程的可靠性，并清晰地展示了创新药物与生物仿制药之间的相似性和差异性。

实验部分

仪器

该系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性泵 (G5654A)
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性 Multisampler (G5668A)，配备样品冷却装置
- Agilent 1260 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116A)，配备生物惰性热交换器
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备生物惰性流通池
- Agilent 1260 Infinity II 生物惰性多检测器套装 (MDS) (G7805A)，配备双角度静态和动态光散射 (DLS) 检测器 (G7809A)

色谱柱

- Agilent Bio mAb 非多孔色谱柱，2.1 × 250 mm, 5 μm HPLC, PEEK (部件号 5190-2411)，用于电荷异构体分析
- Agilent AdvanceBio SEC 300Å, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm (部件号 PL1180-5301)，用于聚集体分析

软件

- Agilent OpenLab CDS 2.3 版
- 安捷伦缓冲液顾问软件 A.01.01 [009]
- Agilent Bio-SEC 软件，版本 A.02.01 Build 9.34851[21]

使用 Agilent OpenLab CDS 2.3 版软件进行液相色谱仪控制和液相色谱数据分析。它提供了直观的用户界面，并具有可采用拖放式模板创建的定制化交互式报告功能。利用该软件的 Peak Explorer 功能比较创新药物与生物仿制药的分析结果。

化学品和样品

所有溶剂均为液相色谱级。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipak) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠和氯化钠购自 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, USA)。mAb 药物（包括创新药物和两种生物仿制药）购自当地经销商。在 DLS 系统中进行分析之前，用 0.1 μm 亲水性 PTFE 滤膜 (Merck Millipore) 将流动相过滤三次。

从原装容器中取出样品，在 13000 g 下离心 2 分钟。将上清液分装到液相色谱样品瓶中进行分析。



图 1. 用于分析利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的电荷异构体和聚集体分析工作流程

实验方法

电荷异构体: 表 1 列出了用于利妥昔单抗创新药物和生物仿制药离子交换色谱分析的色谱参数。该研究中所用的梯度由缓冲液顾问软件计算得出。将样品直接进样, 无需稀释 (10 mg/mL)。利用保留时间 (RT)、峰面积和峰面积百分比计算相对标准偏差 (RSD %) 值。利用相对峰面积百分比对 mAb 的电荷异构体进行定量。

聚集体分析: 表 2 列出了用于利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的聚集体分析的色谱参数。将样品直接进样, 无需稀释 (10 mg/mL)。利用 RT、峰面积和峰面积百分比计算 RSD% 值。利用相对峰面积百分比对样品中的高分子量物质 (HMWS) 和低分子量物质 (LMWS) 进行定量。通过 DLS 分析获得利妥昔单抗的平均分子量和流体动力学半径。

结果与讨论

电荷异构体 (IEX)

图 2 所示为使用 BioMAb PEEK 色谱柱得到的创新药物和生物仿制药的电荷异构体图谱, 表明电荷异构体在 16 分钟内实现了高分离度分离。利妥昔单抗创新药物和生物仿制药重复测定六次得到的叠加图表现出优异的重现性。主峰和异构体峰的 RT 和峰面积的 RSD 分别在 0.3% 和 1% 以内。

表 1. IEX 色谱条件

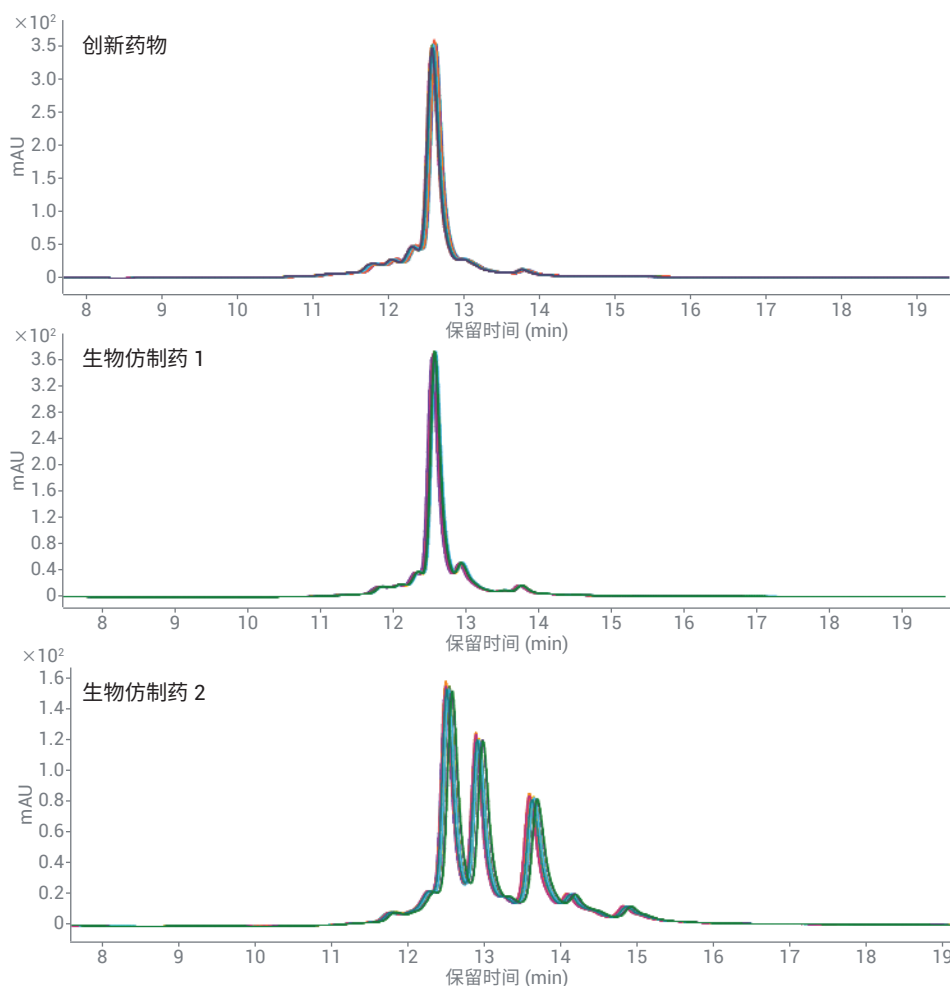
参数	值				
	时间 (min)	A) 水	B) NaCl (1000 mmol/L)	C) NaH ₂ PO ₄ (55 mmol/L)	D) Na ₂ HPO ₄ (50 mmol/L)
盐梯度 0–200 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH 6.8	0.0	43.1	0.0	31.0	25.9
	30.0	22.3	20.0	22.7	35.0
	35.0	22.3	20.0	22.7	35.0
停止时间	35 min				
后运行时间	30 min				
流速	0.25 mL/min				
进样量	2 µL				
进样器温度	10 °C				
柱温	25 °C				
DAD	280 nm/4 nm, 参比波长: 关闭				
峰宽	> 0.025 min (10 Hz)				

表 2. 聚集体分析色谱条件

参数	值
流动相	100 mmol/L 磷酸钠缓冲液 + 150 mmol/L NaCl, pH 7.0
流速	0.8 mL/min
停止时间	20 min
进样量	10 µL (用于 UV) / 25 µL (用于 DLS)
进样器温度	10 °C
柱温	25 °C
DAD	280 nm/4 nm, 参比波长: 关闭
峰宽	> 0.05 min (1.0 秒响应时间) (5 Hz)
LS 检测器	25 °C
DLS 操作参数	
相关器运行时间	5 s
相关器功能片段时间 (Clip Time)	10 µs
R ²	0.80
洗脱液粘度	0.0079 (30 °C 下水的粘度)
洗脱液折射率	1.333 (水的折射率)

图 3 显示了用于比较创新药物和生物仿制药的叠加色谱图。约 12.5 分钟处的峰归属于主峰, 而主峰左侧和右侧的峰则分别归属于酸性和碱性电荷异构体。创新药物与生物仿制药 1 之间的酸性异构体图

谱相似, 而生物仿制药 2 则略有不同。主要由赖氨酸截短产生的碱性异构体的图谱显示, 由于赖氨酸截短不完全, 生物仿制药 2 与创新药物之间存在巨大差异^[4]。



创新药物	日内 (n = 6)		日间 (n = 6)	
	RT %RSD	峰面积 RSD%	RT %RSD	峰面积 RSD%
酸性异构体	0.12	0.42	0.31	0.68
主峰	0.10	0.15	0.29	0.50
碱性异构体	0.10	0.90	0.28	1.91

生物仿制药 1	日内 (n = 6)		日间 (n = 6)	
	RT %RSD	峰面积 RSD%	RT %RSD	峰面积 RSD%
酸性异构体	0.08	0.60	0.16	1.07
主峰	0.07	0.32	0.15	0.85
碱性异构体	0.07	0.75	0.14	1.05

生物仿制药 2	日内 (n = 6)		日间 (n = 6)	
	RT %RSD	峰面积 RSD%	RT %RSD	峰面积 RSD%
酸性异构体	0.20	0.19	0.26	0.80
主峰	0.21	0.52	0.25	0.89
碱性异构体	0.22	0.32	0.26	0.70

图 2. 采用配备 Agilent Bio Mab, 2.1 × 250 mm, 5 μm, PEEK 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统对利妥昔单抗创新药物和生物仿制药样品进行六次重复测定所得到的叠加图。图中表格显示了主峰和电荷异构体的保留时间和峰面积的精密性, n = 6

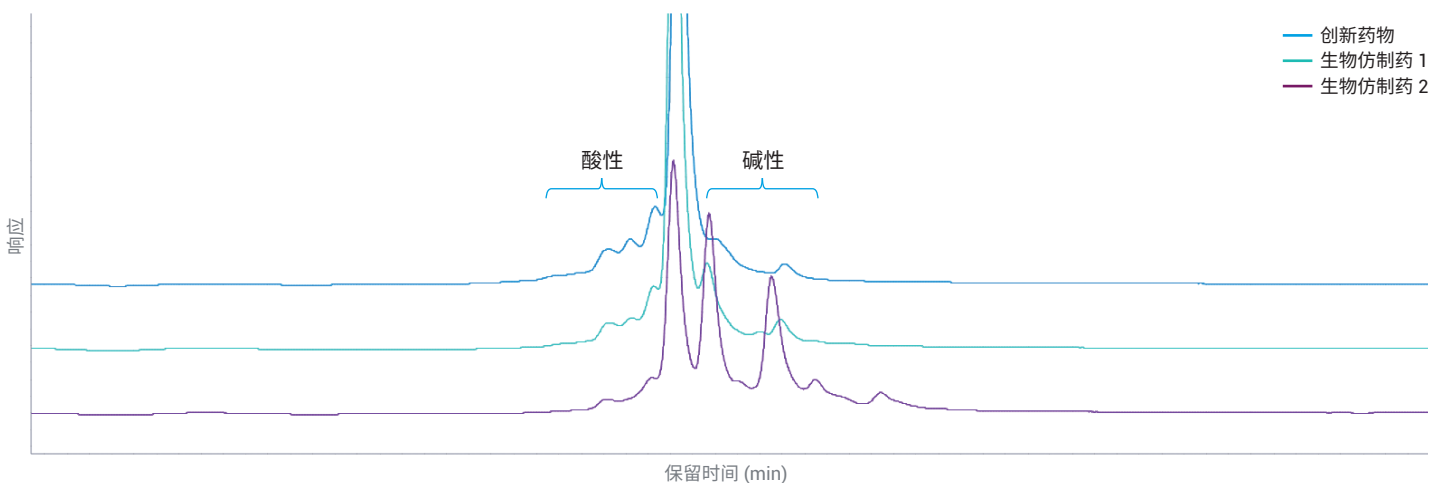


图 3. 利妥昔单抗创新药物和生物仿制药的电荷异构体图谱比较的放大图

图 4 显示了创新药物和生物仿制药之间的电荷异构体和主要形式分布。结果表明，利妥昔单抗创新药物中的主要形式占 $65.35\% \pm 0.27\%$ ，生物仿制药 1 中的主要形式占 $65.14\% \pm 0.10\%$ ，但是在生物仿制药 2 中仅占 $28.8\% \pm 0.07\%$ 。与创新药物 ($12.97\% \pm 0.23\%$) 相比，利妥昔单抗生物仿制药 2 的主要电荷异构体为碱性异构体，占 $62.99\% \pm 0.06\%$ 。创新药物与生物仿制药 1 的电荷异构体图谱相似，不同之处仅在于生物仿制药 1 表现出的碱性异构体略多一些 ($20.11\% \pm 0.12\%$ vs. $12.97\% \pm 0.23\%$)，而酸性异构体则较少一些 ($14.53\% \pm 0.09\%$ vs. $21.68\% \pm 0.13\%$)。

OpenLab CDS 中另一种有用的数据分析功能是 Peak Explorer。该功能实现了大数据集的可视化，可以发现变化趋势、保留时间漂移、异常值和伪峰等，从而加快复杂样品的数据审查。利用 Peak Explorer 查看电荷异构体数据，并对创新药物和生物仿制药进行比较。图 5 显示了利用 Peak Explorer 对创新药物和生物仿制药的比较结果。各个气泡对应于酸性和碱性异构体以及主峰。气泡的大小代表异构体的峰面积百分比。Peak Explorer 所示的比较结果与图 4 的结论一致。

聚集体分析

图 6 所示为创新药物和生物仿制药的聚集体图谱，表明在 20 分钟内实现了聚集体的高分离度分离。创新药物和生物仿制药重复测定六次得到的叠加图表现出优异的重现性。主峰和异构体峰的 RT 和峰面积的 RSD 分别在 0.1% 和 2% 以内。

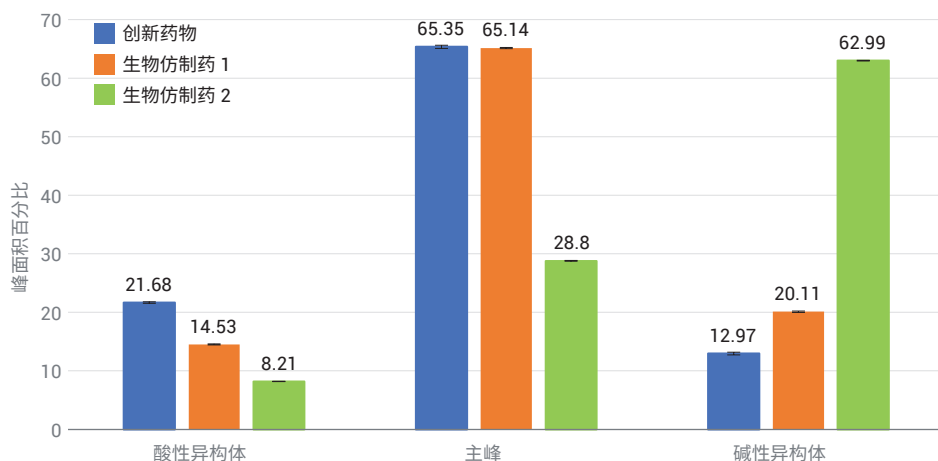


图 4. 创新药物与生物仿制药之间电荷异构体（酸性异构体、主峰和碱性异构体）峰面积百分比的比较

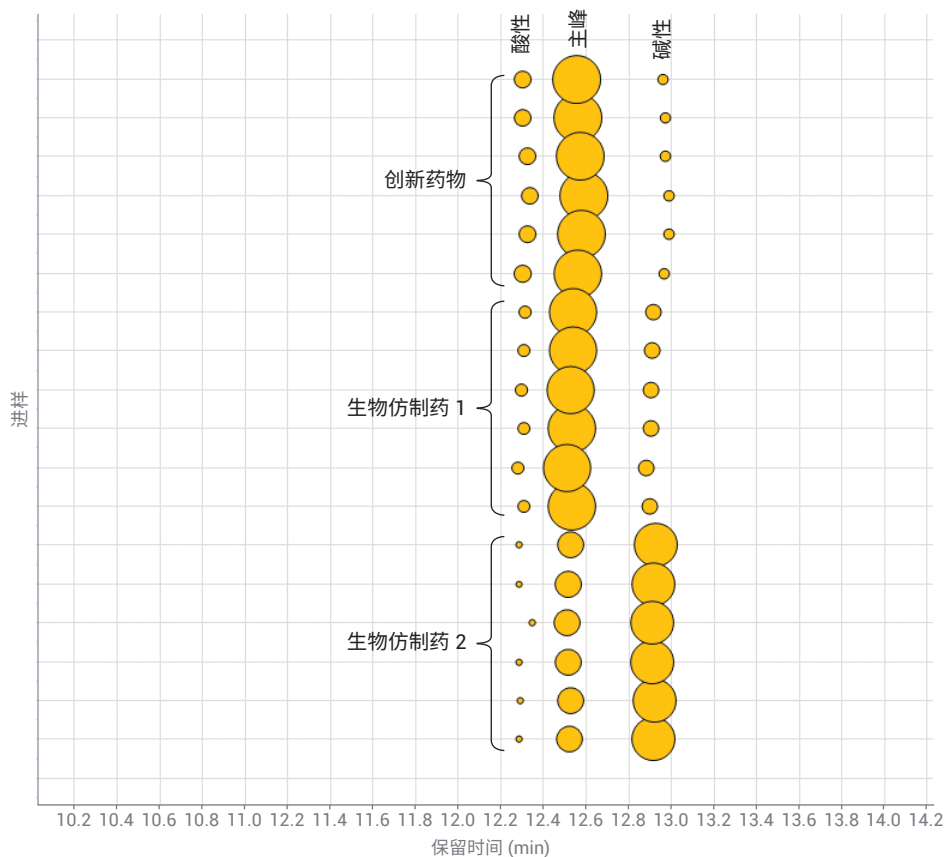
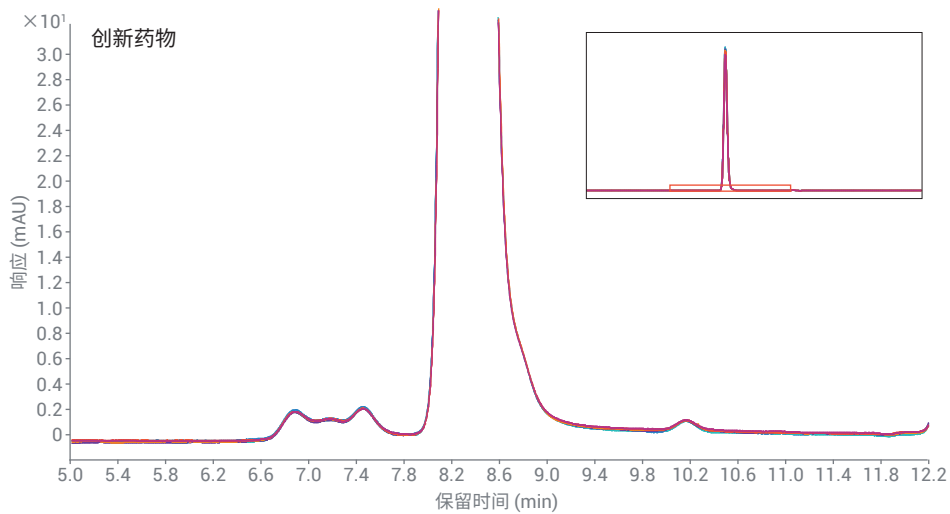
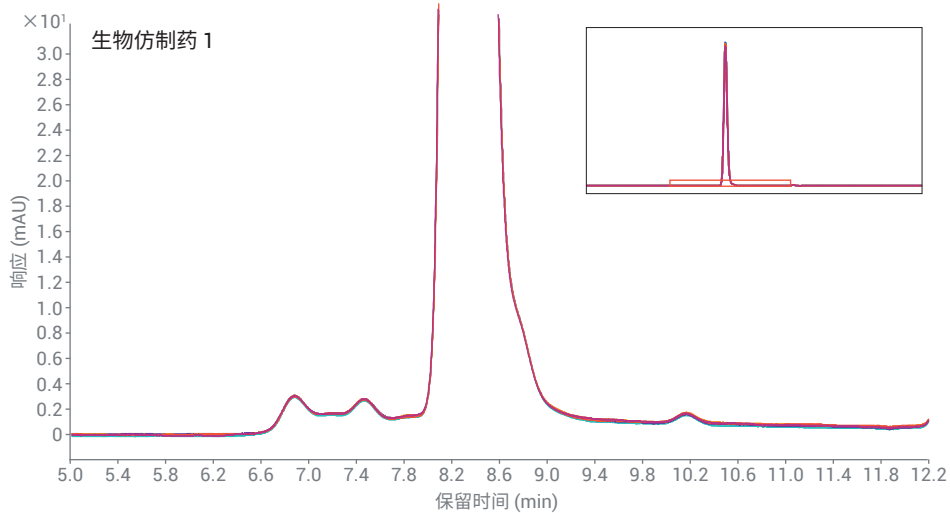


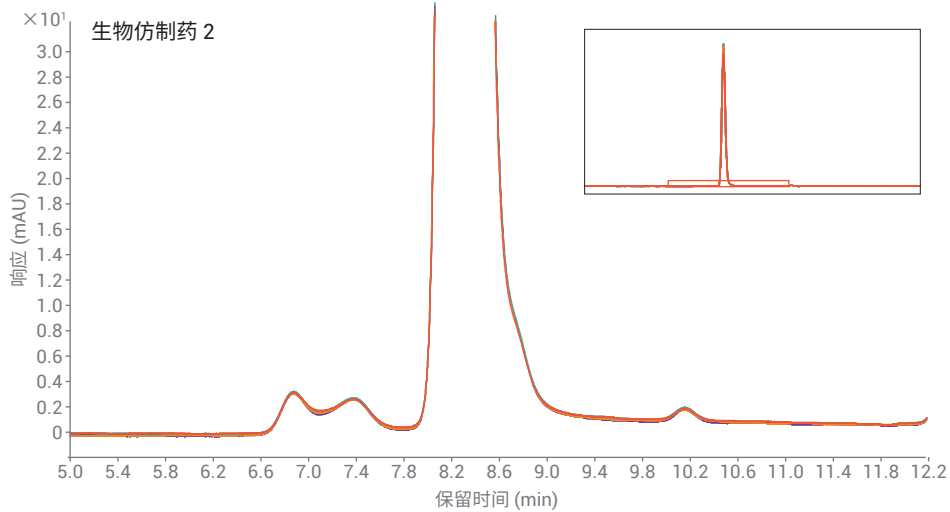
图 5. Peak Explorer 数据显示快照。X 轴为保留时间，Y 轴为所加载数据集中的进样编号。每个气泡代表各个异构体和主峰。气泡大小代表峰面积百分比



创新药物	日内 (n = 6)		日间 (n = 6)	
	RT %RSD	峰面积 RSD%	RT %RSD	峰面积 RSD%
HMWS	0.05	0.35	0.05	0.56
单体峰	0.02	0.91	0.04	0.86
LMWS	0.03	1.12	0.06	1.77



生物仿制药 1	日内 (n = 6)		日间 (n = 6)	
	RT %RSD	峰面积 RSD%	RT %RSD	峰面积 RSD%
HMWS	0.04	0.72	0.08	1.29
单体峰	0.00	0.68	0.02	0.62
LMWS	0.04	1.75	0.04	2.25



生物仿制药 2	日内 (n = 6)		日间 (n = 6)	
	RT %RSD	峰面积 RSD%	RT %RSD	峰面积 RSD%
HMWS	0.04	0.66	0.04	0.63
单体峰	0.01	0.51	0.01	0.61
LMWS	0.02	2.11	0.05	2.29

图 6. 采用配备 Agilent AdvancedBio SEC, 7.8 × 300 mm, 2.7 μm 色谱柱的 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统对利妥昔单抗创新药物和生物仿制药样品进行六次重复测定所得到的叠加图。表中显示了 HMWS、单体和 LMWS 的保留时间和峰面积的精密度, n = 6

图 7 显示了用于比较创新药物和生物仿制药的叠加色谱图。约 8.4 分钟处的峰归属于单体，而主峰左侧和右侧的峰则分别归属于 HMWS 和 LMWS。如图所示，各个样品中的 LMWS 峰面积百分比相似

(分别为 0.08%、0.08% 和 0.11%)，而 HMWS 则表现出不同的情况；创新药物与生物仿制药 2 之间的差异比起与生物仿制药 1 的差异更突出。

图 8 显示了样品中 HMWS、LMWS 和单体的分布。所有三个样品中的单体峰均占 98%–99%。在两种生物仿制药中，观察到的 HMWS 水平略高一些（分别为 $0.93\pm 0.01\%$ 和 $0.94\pm 0.01\%$ ）。

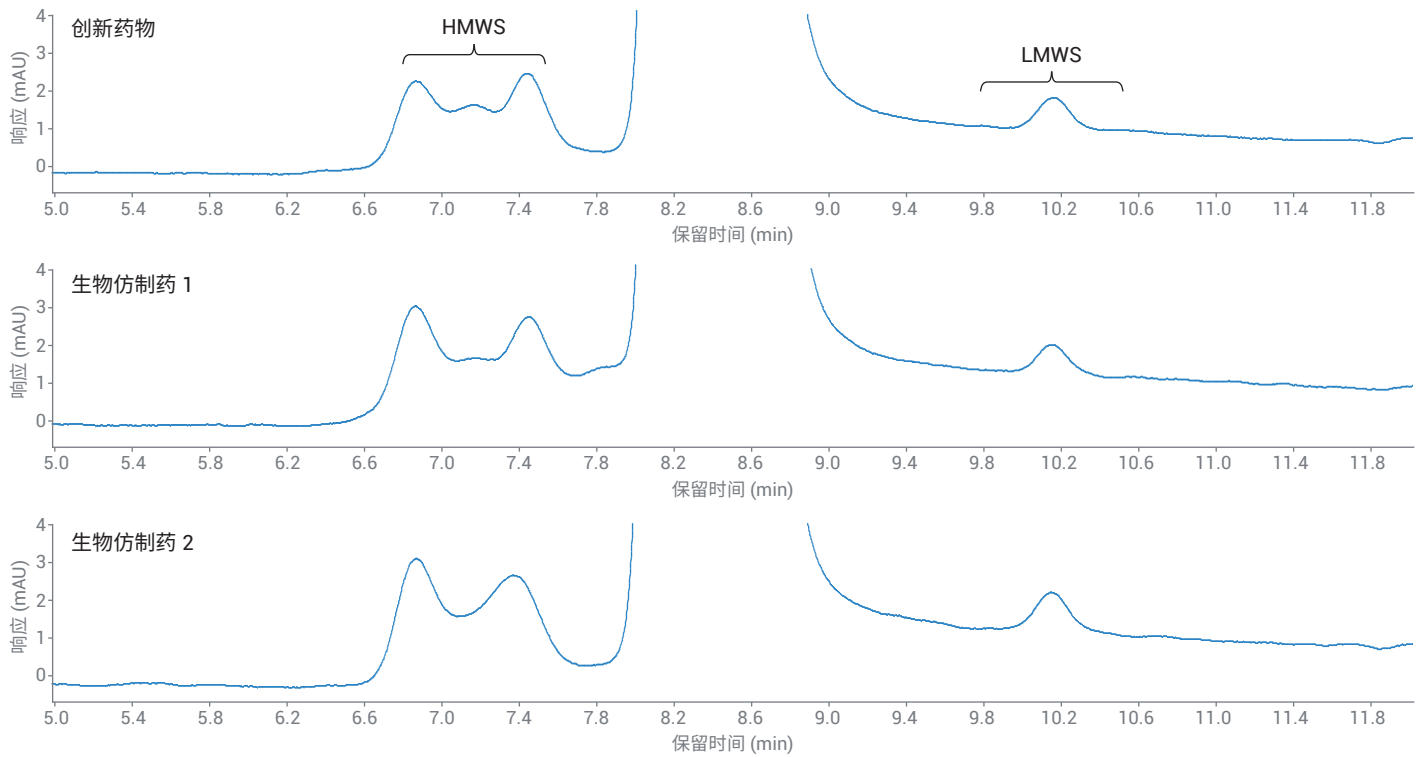


图 7. 创新药物与生物仿制药的聚集图谱的放大图对比

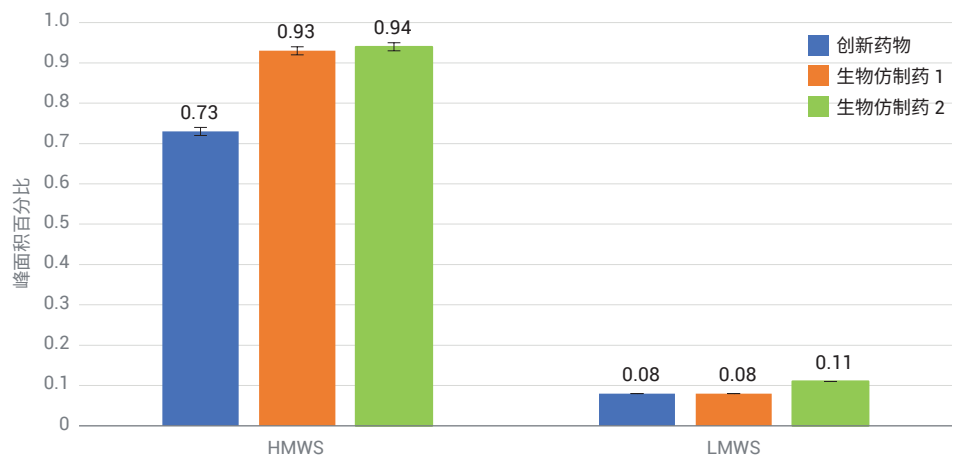


图 8. 比较创新药物与生物仿制药的 HMWS 和 LMWS 峰面积百分比

而且，与创新药物 (0.08%) 和生物仿制药 1 (0.08%) 相比，生物仿制药 2 表现出更高的 LMWS 水平 (0.11%)。但是，所有差异都非常小。

图 9 展示了利用配备 DLS 检测器的 bio-MDS 系统获得的结果。mAb 单体的绝对平均分子量与流体动力学半径 (Rh) 都可以直接从结果中读取。结果表明，DLS 分析具有良好的重现性，并且能够准确测定分子量和 Rh 值。

都可以直接从结果中读取。结果表明，DLS 分析具有良好的重现性，并且能够准确测定分子量和 Rh 值。

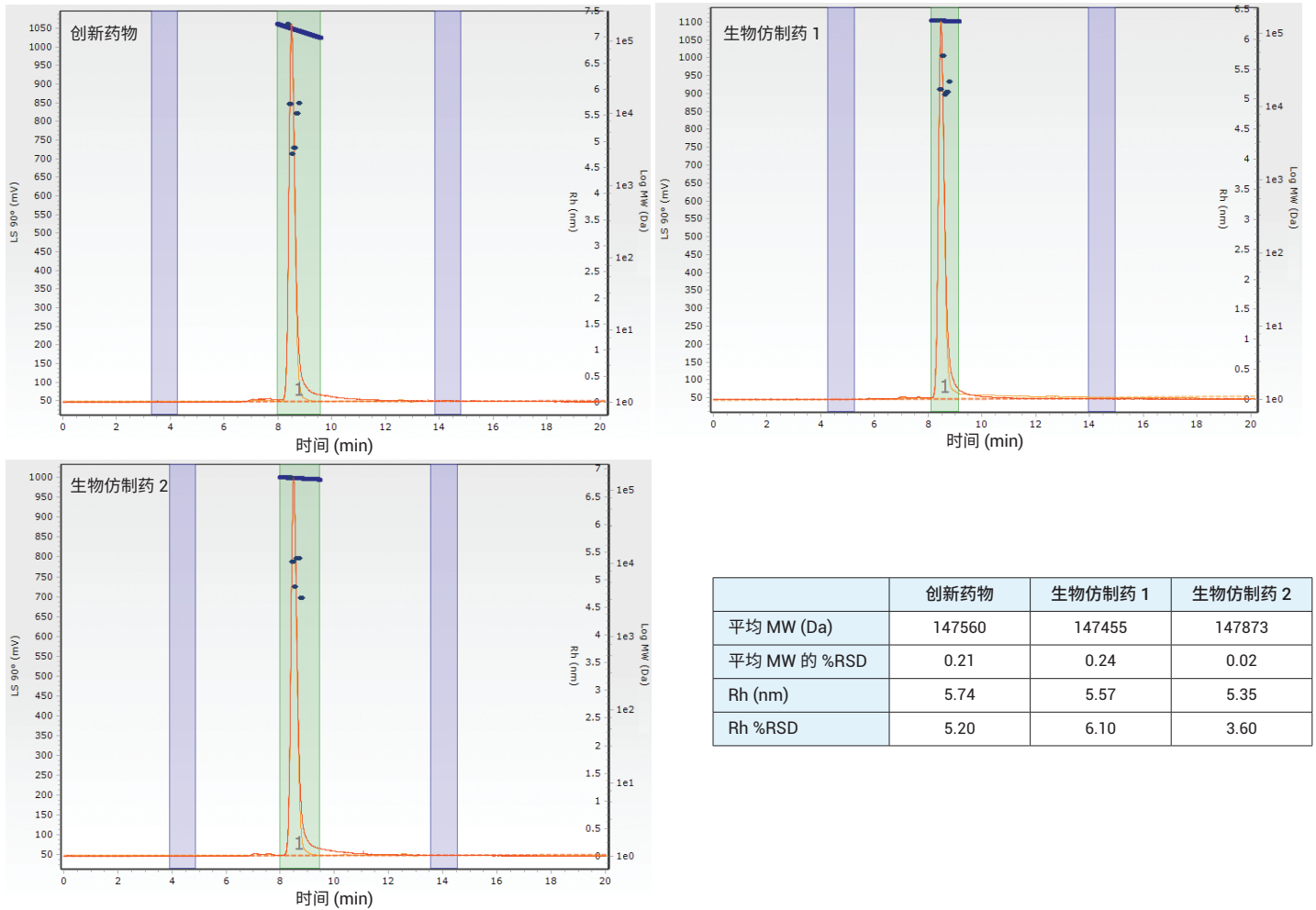


图 9. 通过 DLS 分析得到的创新药物和生物仿制药之间的平均分子量和 Rh 的比较

结论

本应用简报展示了两种用于分析利妥昔单抗创新药物及其两种生物仿制药的分析工作流程，即电荷异构体和聚集体分析。在两种工作流程中，RT 和峰面积均获得了良好的重现性。电荷异构体分析结果表明，生物仿制药 2 样品存在明显差异，其中较高百分比的碱性异构体被认为是赖氨酸截短异构体。聚集体分析结果表明，生物仿制药 2 的 HMWS 图谱与创新药物略有不同。在药物样品的电荷异构体和聚集体异构体特性方面，生物仿制药 1 与创新药物具有更高的相似度。这些结果与已发表的利妥昔单抗表征数据相吻合^[5]，表明安捷伦电荷异构体和聚集体分析工作流程在生物仿制药相似性研究中表现可靠。为便于以批处理模式轻松审查数据并提高分析效率，Agilent Openlab CDS 软件提供了 Peak Explore 等功能。

参考文献

1. Dübel, S.; Reichert, J. M. Handbook of Therapeutic Antibodies, second edition
2. U.S. Public Health Service Act section 351(k)
3. ICH Harmonized Tripartite Guideline Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products Q6B
4. Suresh Babu, C. V. Charge Heterogeneity Analysis of Rituximab Innovator and Biosimilar mAbs (利妥昔单抗创新药物和生物仿制药 mAb 的电荷异质性分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5557EN
5. Lee, K. H. et al. Analytical Similarity Assessment of Rituximab Biosimilar CT-P10 to Reference Medicinal Product. *Mabs* **2018**, 10(3), 380–396

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019 年 10 月 28 日，中国出版
5994-1496ZHCN
DE.0897222222

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

