

亲水相互作用超高效液相色谱法分析单抗 N 糖谱的方法学联合验证

王文波, 武刚, 于传飞, 张峰, 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 102629)

摘要:目的 对亲水相互作用超高效液相色谱法检测单抗 N 糖谱进行多家实验室的联合验证。方法 依据 ICH_Q2_R1 指导原则和 2015 年版《中国药典》通则 9101, 开展方法学验证。评价指标包括: 特异性、线性、准确性、精密性、定量限、范围和耐用性。结果 验证数据表明, 该方法具有良好的特异性、准确性、精密性和耐用性。在 100 ~ 400 μg 蛋白范围内具有良好的线性, r^2 大于 0.98, 且回收率在 86% ~ 117% 内。精密性评价结果显示, 该方法整体的 RSD 值小于 10%。该方法的定量限为 0.040%, 可对在 0.040% ~ 78.751% 内的单个色谱峰进行准确定量分析。同时多个条件下的耐用性评价结果表明, 该方法具有耐用性, 峰面积百分比的 RSD 小于 5%, 保留时间的 RSD 小于 1%。结论 组织开展的基于亲水相互作用超高效液相色谱法 (HILIC-UPLC) 的检测单抗 N 糖谱的方法学联合验证, 为《中国药典》标准提高提供方法学验证依据。

关键词: 单克隆抗体; N 糖基化修饰; 方法学验证; 中国药典; 亲水相互作用色谱

doi:10.11669/cpj.2019.24.005 中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2019)24-2028-06

Interlaboratory Validation of HILIC-UPLC Method for N-glycan Profile Analysis of Monoclonal Antibodies

WANG Wen-bo, WU Gang, YU Chuan-fei, ZHANG Feng, WANG Lan* (Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To validate the HILIC-UPLC method for N-glycan profile analysis of therapeutic antibodies. **METHODS** The interlaboratory method validation was performed according to ICH_Q2_R1 guideline and general principles of China Pharmacopoeia (2015 edition) 9101. The validation items included specificity, linearity, accuracy, precision, quantitation limit, range and robustness. **RESULTS** The method showed good specificity, accuracy, precision and robustness, and showed a good linearity at a protein range from 100 to 400 μg . The r^2 of linear regression equation was above 0.98, and the recoveries were between 86% and 117%. Both the RSDs of peak area percentage and retention time were below 10%, which indicated good precision. The lower quantitation limit of the method was 0.040%, and the range was from 0.040% to 78.751%, which means that single peak at this range could be quantified accurately. Furthermore, robustness evaluation under a series of conditions showed that this method was robust, where the RSD of peak area percentage was below 5% and RSD of retention time was below 1%. **CONCLUSION** Interlaboratory validation of HILIC-UPLC provides a methodological verification basis for the improvement of Chinese Pharmacopoeia standards.

KEY WORDS: monoclonal antibody; N-linked glycosylation; method validation; Chinese Pharmacopoeia; hydrophilic interaction liquid chromatography

N 糖基化修饰是单抗最为常见和复杂的翻译化修饰之一^[1], 与单抗活性、药代以及免疫原性密切相关^[2-4], 同时 N 糖基化修饰也是单抗上游生产工艺稳定性的重要指征。因此, 对于单抗尤其是具有 Fc 效应子功能的单抗进行 N 糖分析和控制十分必要。

单抗 N 糖谱的检测通常由 N 糖链的酶切、标记衍生、纯化以及分离检测等步骤组成, 基于不同种类的糖苷酶、衍生试剂、纯化类型以及不同原理的分离

检测技术, 单抗 N 糖谱分析方法种类繁多^[5]。其中最为常用的方法为通过糖苷酶 F (PNGase F) 进行 N 糖的酶切释放, 然后对游离的 N 糖用 2-氨基苯甲酰胺 (2-AB) 进行标记衍生, 最后通过亲水相互作用超高效液相色谱法 (HILIC-UPLC) 进行分离检测。该方法具有分离度高、平台化、可直接串联质谱进行糖型鉴定等特点, 已广泛应用单抗 N 糖谱的质控检测和表征分析当中, 但各家方法也不尽相同。

目前《美国药典》(USP) 和《欧洲药典》(EP) 均

基金项目:《中国药典》药品标准提高课题项目资助(445)

作者简介: 王文波, 男, 副研究员 研究方向: 单克隆抗体质量控制研究
Tel: (010)53852159 E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

*** 通讯作者:** 王兰, 女, 研究员 研究方向: 单克隆抗体质量控制

收录了 N 糖的质控策略和通用分析方法,然而我国药典尚未收录单抗制品的 N 糖谱检测方法。近年来,我国治疗性单抗产业发展迅猛,为了配合 2020 年版《中国药典》的修订工作,节省企业在方法开发和验证中的成本,本实验组织国内 4 家企业开展了基于 2-AB 标记衍生、HILIC-UPLC 分离检测的 N 糖分析方法的联合验证工作。

1 材料和方法

1.1 材料

方法学验证分析用单抗为 CHO 细胞表达的重组单克隆抗体,空白对照为不含单抗蛋白的配方缓冲液, PNGase F (Prozyme 公司), 2-AB (Sigma 公司), 氰基硼氢化钠 (Sigma 公司), N 糖纯化小柱 (GlycoClean™ S Cartridges, Prozyme 公司), 超滤离心管 (30×10^3 截留相对分子质量, Millipore 公司), 色谱柱 (ACQUITY UPLC BEH Glycan column, $1.7 \mu\text{m}$, $2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, Waters 公司), 超高液相色谱仪 (Waters 公司 UPLC H-class Bio 或 Agilent 公司 1290, 荧光检测器)。

1.2 方法

1.2.1 2-AB 标记 N 糖的制备 单抗 N 糖的酶切释放: 准备 30×10^3 的超滤离心管, 加入 $150 \mu\text{L}$ 的超纯水, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min (舍弃残留有大体积液体的超滤管, 并处理新的超滤管)。加入 $200 \mu\text{L}$ $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品至超滤管中, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 丢弃下层液体。向上层截留样品中加入 $400 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH 7.4) 缓冲液, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min , 重复 2 次, 吸取全部上层截留样品转移至离心管中, 吸取 $150 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 润洗上层超滤管, 并转移至对应的 EP 管中 (以上步骤为样品缓冲液置换)。取 $25 \mu\text{L}$ 置换缓冲液后的样品, 加入 $5 \mu\text{L}$ PNGase F 和 $70 \mu\text{L}$ $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS, 总体积为 $100 \mu\text{L}$, 涡旋混匀并短暂离心, 37°C 水浴下孵育 20 h 。

蛋白去除和 N 糖的标记纯化: 向酶切完的样品中加入 3 倍体积预冷的乙醇, 涡旋混匀, -20°C 放置 1 h 沉淀蛋白。 $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 。吸取适量上清液 (如 $360 \mu\text{L}$) 至离心管中离心干燥。待完全干燥后, 加入 $10 \mu\text{L}$ 2-AB 标记溶液, 涡旋混匀并短暂离心。 65°C 下孵育 4 h 。标记完成后, 采用 GlycoClean™ S Cartridges 纯化小柱对标记的 N 糖进行纯化, 以去除游离的 2-AB, 离心干燥纯化的样品, 用 $100 \mu\text{L}$ 体积分数 70% 乙腈水溶液复溶。

超高液相色谱分析: 色谱柱: ACQUITY UPLC Glycan BEH Amide 130 A ($2.1 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$, Waters 公司); 色谱条件: 柱温 60°C ; 样品盘温度 $2 \sim 8^\circ\text{C}$; 进样量 $5 \mu\text{L}$ 。以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲酸铵 (pH 4.5) 为流动相 A 液, 以乙腈为流动相 B 液, 梯度为 39.5 min 内 B 相从 78% 到 20%, 流速为 $0.50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (洗脱 39.5 min 至 44.5 min , 流速为 $0.25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), 检测波长: Waters 公司 UPLC H-class Bio 液相色谱仪激发波长为 330 nm , 发射波长为 420 nm ; Agilent 公司 1290 液相色谱仪激发波长为 260 nm , 发射波长为 430 nm 。

1.2.2 方法学验证 方法学验证共有 4 家单位参与, 分别为: P1、P2、P3 和 P4。方法学评价指标如下。

特异性实验 (specificity): 分别进样单抗样品和空白对照, 分析空白样品中是否有干扰峰的存在。

准确性实验 (accuracy): 对单抗样品进行缓冲液置换后, 分别取 $10 \mu\text{L}$ ($100 \mu\text{g}$)、 $17.5 \mu\text{L}$ ($175 \mu\text{g}$)、 $25 \mu\text{L}$ ($250 \mu\text{g}$)、 $32.5 \mu\text{L}$ ($325 \mu\text{g}$)、 $40 \mu\text{L}$ ($400 \mu\text{g}$) 的蛋白进行酶切及后续标记纯化步骤, 每个样品进样 3 针。通过回收率评价方法的准确性。回收率 = (某蛋白量下测定的峰面积平均值) \div (该蛋白量下的理论峰面积) $\times 100\%$, 其中理论峰面积 = $250 \mu\text{g}$ 样品下测定的峰面积均值 \times (蛋白量 $\div 250$)。

精密性实验 (precision): ①样品制备重复性 (reproducibility), 重复制备 6 份样品, 每个样品进样 1 针。②进样重复性 (repeatability), 对同一份样品重复进样 6 针。③中间精密性 (intermediate precision), 在不同的 3 d 独立进行 3 次实验, 每次进样 2 针样品。

定量限实验 (LOQ): 计算 $250 \mu\text{g}$ 蛋白条件下信噪比 (S/N) 约等于 10 的色谱峰所占峰面积百分比, 即为方法的定量限。

耐用性实验 (robustness): 对样品分别进行不同标记衍生时间 (65°C 3、4 和 5 h) 和标记衍生温度 (60 、 65 和 70°C 标记衍生 4 h) 处理, 并对处理后样品在样品盘放置 24 h 进行分析, 每个条件下的样品进样 2 针, 以评价方法的耐用性。

线性实验 (linearity): 准确性测定时制备 5 个不同蛋白量样品 (见“1.2.2”), 以各点的峰面积均值 ($n=3$) 与蛋白量做线性回归, 利用拟合曲线的 r^2 评价线性。

范围 (range): 即为方法能够准确定量的单个峰面积百分比的上下限范围。

2 结果

2.1 特异性

将单抗样品和空白对照分别进行 N 糖酶切和标记等处理,检测结果表明,单抗样品中检出的峰为特异的 N 糖色谱峰,空白对照中无干扰峰存在(图 1),该方法具有良好的特异性。

2.2 准确性

通过对 5 个不同蛋白量的单抗样品进行分析(100、175、250、325、400 μg),并分别对总峰面积、G0F、Man5、G1F(1,6)、G1F(1,3)和 G2F 峰面积计算回收率,结果表明,该方法具有良好的准确性,4 家验证单位整体回收率在 86% ~ 117% 内(表 1)。

2.3 线性

通过对不同蛋白量分别与总峰面积、G0F、

Man5、G1F(1,6)、G1F(1,3)和 G2F 峰面积做线性回归(图 2),拟合曲线的 r^2 大于 0.98(表 2),表明该方法具有良好的线性。

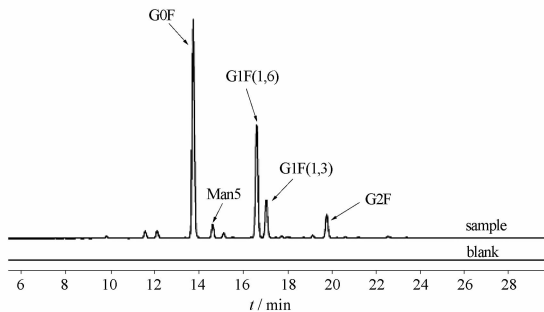


图 1 HILIC 方法的特异性检测结果

Fig. 1 Evaluation of specificity of HILIC method

表 1 HILIC 方法的准确性评价结果

Tab. 1 Evaluation of accuracy of HILIC method

Participant	Total peak area	G0F	Man5	G1F(1,6)	G1F(1,3)	G2F
P1	102 – 114	102 – 117	102 – 111	100 – 113	103 – 113	95 – 117
P2	98 – 106	98 – 106	97 – 106	98 – 106	97 – 106	97 – 108
P3	86 – 104	86 – 104	86 – 104	86 – 104	86 – 104	87 – 105
P4	97 – 107	96 – 108	96 – 107	95 – 107	96 – 107	98 – 109

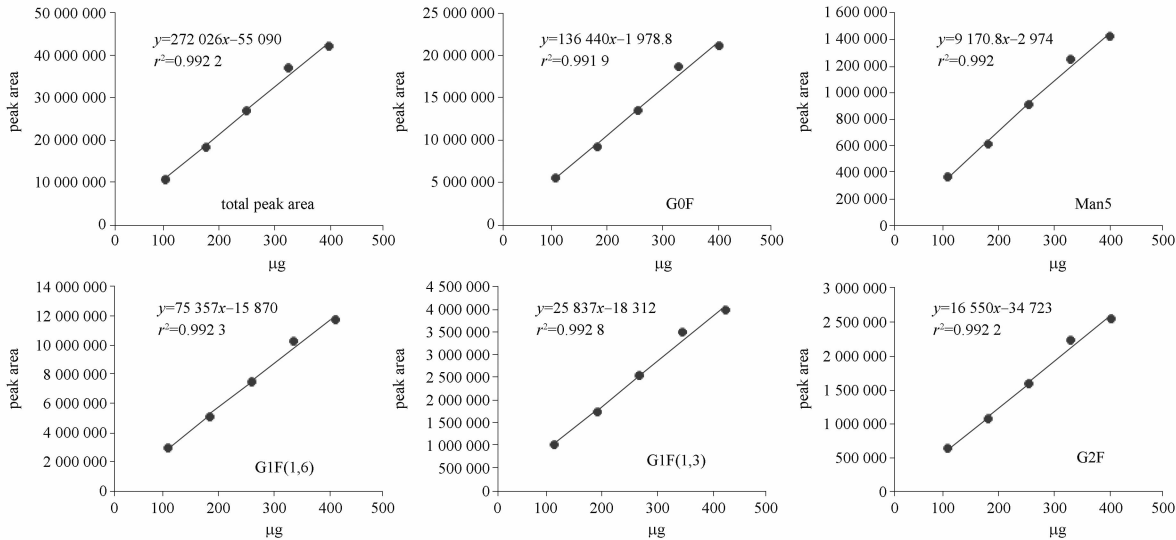


图 2 HILIC 方法的线性分析

Fig. 2 Linear regression analysis of HILIC method

表 2 HILIC 方法的线性拟合 r^2

Tab. 2 r^2 of Linear regression equation of HILIC method

Participant	Total peak area	G0F	Man5	G1F(1,6)	G1F(1,3)	G2F
P1	0.986 6	0.989 9	0.995 1	0.991 7	0.988 1	0.986 5
P2	0.992 2	0.991 9	0.992 0	0.992 3	0.992 8	0.992 2
P3	0.997 0	0.997 4	0.997 2	0.997 1	0.997 7	0.996 5
P4	0.997 5	0.997 4	0.997 9	0.997 5	0.997 5	0.996 5

2.4 精密性

分别进行了进样重复性、样品制备重复性和中间精密性评价(图3),结果表明,该方法具有良好的

精密性,G0F、Man5、G1F(1,6)、G1F(1,3)和G2F的峰面积百分比和保留时间的RSD值均小于10%,实验室内的RSD值小于实验室间的RSD值(图4)。

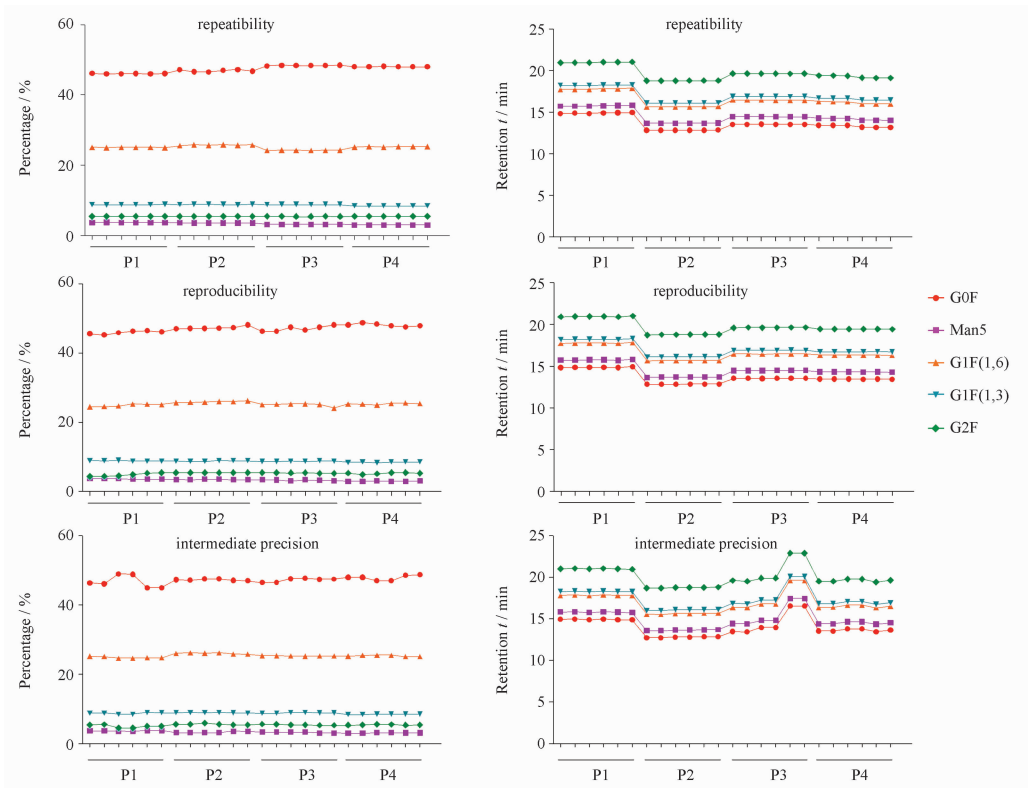


图3 HILIC 方法的精密性评价结果

Fig. 3 Evaluation of precision of HILIC method

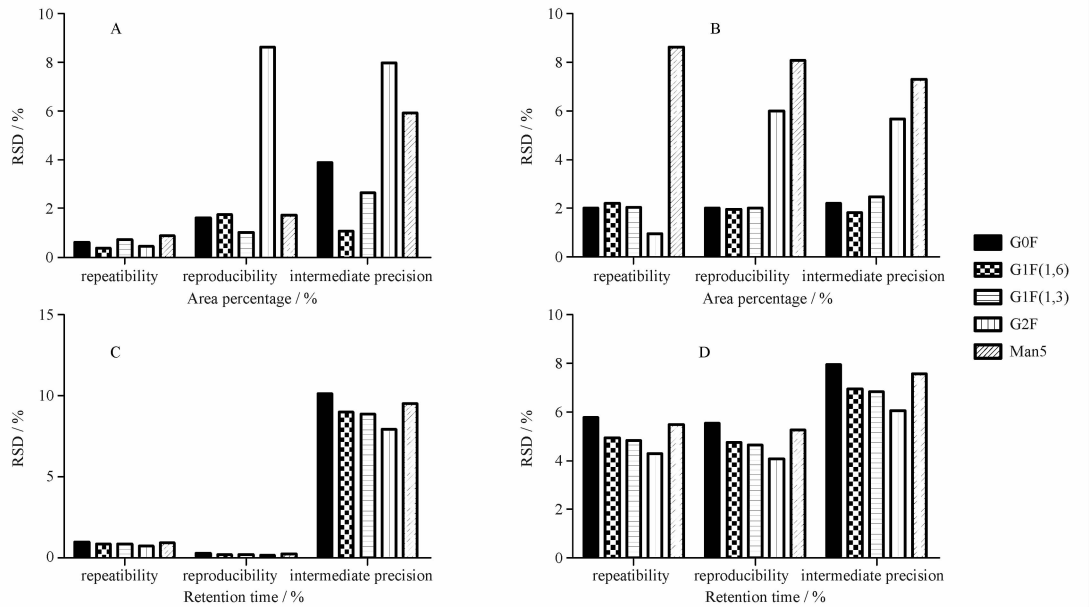


图4 HILIC 方法精密性评价中的RSD值

A - 实验室内峰面积的RSD; B - 实验室间峰面积的RSD; C - 实验室内保留时间的RSD; D - 实验室间保留时间的RSD

Fig. 4 The RSD value of precision test of HILIC method

A - intra-laboratory RSD of peak area percentage; B - inter-laboratory RSD of peak area percentage; C - intra-laboratory RSD of retention time; D - inter-laboratory RSD of retention time

2.5 定量限

对样品中信噪比在 10 左右的色谱峰进行分析,发现 4 个色谱峰(peak 1, peak 2, peak 3 和 peak 4, 见图 5), 其信噪比和峰面积百分比见表 3。其中 peak 1 的信噪比最小, 选择该峰的峰面积百分比为方法定量限, 即定量限为 0.040%。

2.6 范围

在定量限检测中, 结果显示, 该方法对定量限(0.040%)的色谱峰能够准确检测, 且具有较好的精密性(RSD = 7.50%), 因此我们选择方法定量限为范围下限。

对于方法上限, 因样品中峰面积百分比最高的色谱峰为 GOF, 我们选择 GOF 为目标峰, 计算该方法的范围上限, 即通过计算高蛋白量(400 μg)下的 GOF 峰面积在低蛋白量(100 μg)样品中所占的比例, 即为该方法的实测范围上限, 实测范围上限% = $\frac{\text{GOF 峰面积}_{\text{高蛋白量}}}{\text{总峰面积}_{\text{低蛋白量}} - \text{GOF}_{\text{低蛋白量}} + \text{GOF 峰面积}_{\text{高蛋白量}}} \times 100\%$, 其中 GOF 峰面积_{高蛋白量}、GOF_{低蛋白量}、总峰面积_{低蛋白量}均为实际检测的数值。因方法学验证数据表明该方法具有良好的线性、准确性和精密性, 我们还可以通过公式推导计算范围上限, 公式推导范围上限% = $n \times a \times 100\% \div [(n-1) \times a + 1]$, 其中 n = 高蛋白量 ÷ 低蛋白量, 即 $n = 400 \div 100 = 4$ 。a 为低蛋白量样品中的 GOF%。

我们挑选了 1 个低蛋白量样品(100 μg)和高蛋

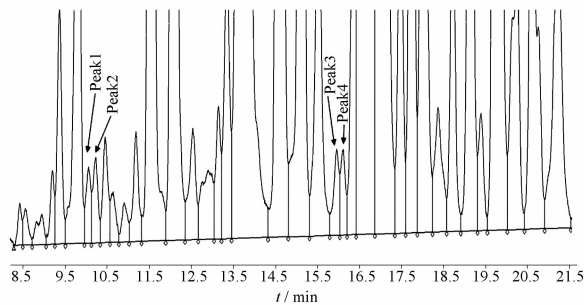


图 5 HILIC 方法定量限检测图谱

Fig. 5 Chromatogram of LOQ test of HILIC method

表 3 HILIC 方法的定量限评价结果. $n = 12, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Determination result of LOQ of HILIC method. $n = 12, \bar{x} \pm s$

Peak	S/N (RSD/%)	Area percentage (RSD/%)
Peak 1	14.33 ± 0.84(5.86)	0.040 ± 0.003(7.50)
Peak 2	15.61 ± 1.15(7.37)	0.045 ± 0.003(6.67)
Peak 3	15.30 ± 1.54(10.07)	0.049 ± 0.002(4.08)
Peak 4	15.44 ± 1.35(8.74)	0.043 ± 0.002(4.65)

白量样品(400 μg)的检测结果为例, 分别比较了实测范围上限和公式推导范围上限, 结果见表 4, 实测范围上限为 78.420%, 公式推导范围上限为 77.996%, 两者基本一致。因此, 对于该方法的范围上限, 我们通过公式推导计算了整体的范围上限。因方法验证中多家参与单位低蛋白量(100 μg)下检测的 GOF% 均值为 48.093%, 经公式推导计算的

范围上限为 78.751%。

综上所述, 该方法的范围为 0.040% ~ 78.751%, 即可以对比例在 0.040% ~ 78.751% 内的单个色谱峰进行准确分析定量。

2.7 耐用性

分别进行了不同标记时间和标记温度以及样品放置 24 h 的耐用性评价, 结果表明, 该方法具有耐用性, GOF、Man5、G1F(1,6)、G1F(1,3)和 G2F 的峰面积百分比 RSD 值小于 5%, 保留时间的 RSD 值小于 1% (图 6)。

3 讨论

分析方法是药品质量控制评价的重要工具, 良好的分析方法可以检测药品质量属性的变化, 对样品放行和稳定性研究提供直接的数据支持。方法学验证是分析方法的基础, 是证明采用的方法能否适用于相应的检测目的和要求。通常, 对于质控分析方法需要进行完整的方法学验证, 以保证其满足检测需求。

单抗作为结构功能复杂的生物大分子, 其质控评价非常依赖于分析方法。单抗 Fc 上的 N 糖具有高度的异质性, 尽管 N 糖对抗功能活性等方面至关重要^[6-10], 对抗 N 糖的检测, 生产单位通常在细胞株筛选和生产工艺开发阶段进行, 在产品放行

表 4 HILIC 方法范围上限计算示例

Tab. 4 Example of determination of upper limit of the HILIC method

Parameters	100 μg sample	400 μg sample
GOF area	16 370 441	67 131 358
Total peak area	34 844 396	142 342 177
Total peak area minus GOF peak area	18 473 955	75 210 819
GOF/%	46.98	-
Measured upper limitation/%	-	78.420
Calculated upper limitation/%	-	77.996

注: 100 μg 样品为低蛋白量样品; 400 μg 样品为高蛋白量样品

Note: 100 μg sample stand for low protein content; 400 μg sample stand for high protein content

标准设定中被忽视。同时,在现行版《中国药典》中,也缺乏对 N 糖分析方法的收录。

本实验中,对基于 PNGase F 酶切、2-AB 标记、HILIC-UPLC 分离检测的 N 糖质控分析方法进行了全面的方法学联合验证,结果表明,该方法具有良好的特异性、准确性、精密性和耐用性,可用于对单抗

N 糖的质控分析。本实验的数据也为 2020 年版《中国药典》中单抗 N 糖分析方法的收录提供了支持,在《中国药典》收录后,企业在进行方法确认后,可利用该方法对单抗 N 糖进行质控分析,从而对批间一致性、糖型比例的变化和糖型的改变进行有效的监控,以保证产品的有效性和安全性。

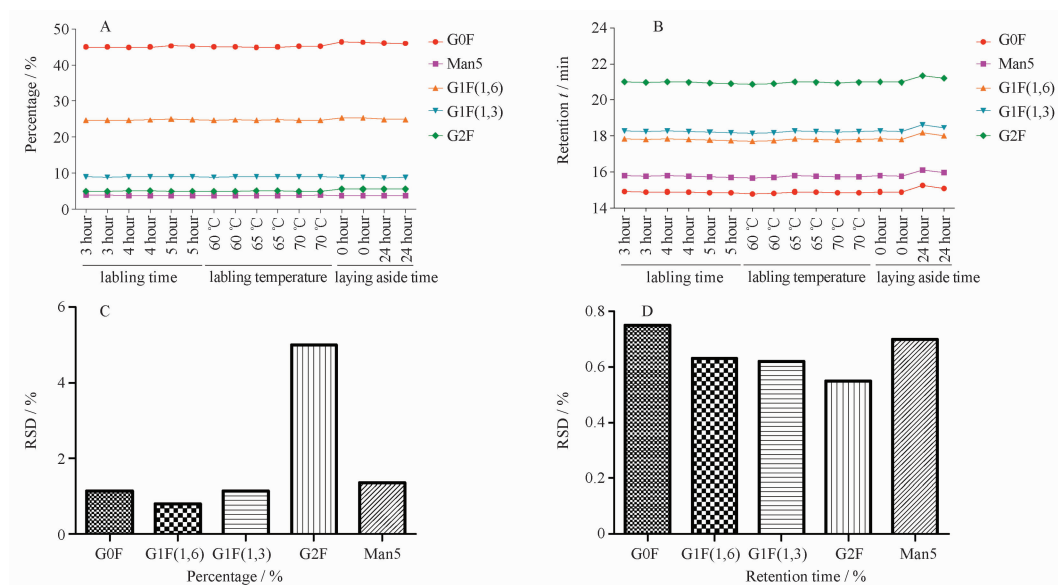


图6 HILIC 方法的耐用性评价结果

A - 峰面积数据; B - 保留时间数据; C - 峰面积的 RSD; D - 保留时间的 RSD

Fig. 6 Evaluation of robustness of HILIC method

A - peak area percentage; B - retention time; C - RSD of peak area percentage; D - RSD of retention time

REFERENCES

- [1] MASTRANGELI R, PALINSKY W, BIERAU H. Glycoengineered antibodies: towards the next-generation of immunotherapeutics[J]. *Glycobiology*, 2019, 29(3):199-210.
- [2] HUANG S, LI F, LIU H, *et al.* Structural and functional characterization of MBS301, an afucosylated bispecific anti-HER2 antibody[J]. *mAbs*, 2018, 10(6):864-875.
- [3] KAYSER V, CHENNAMSETTY N, VOYNOV V, *et al.* Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Biotechnol J*, 2011, 6(1):38-44.
- [4] KRAHN N, SPEARMAN M, MEIER M, *et al.* Inhibition of glycosylation on a camelid antibody uniquely affects its FcγRI binding activity[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 96: 428-439.
- [5] REUSCH D, HABERGER M, FALCK D, *et al.* Comparison of methods for the analysis of therapeutic immunoglobulin G Fc-glycosylation profiles-Part 2: mass spectrometric methods [J]. *mAbs*, 2015, 7(4):732-742.
- [6] LIU L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins[J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(6):1866-1884.
- [7] PACE D, LEWIS N, WU T, *et al.* Characterizing the effect of multiple Fc glycan attributes on the effector functions and FcγRIIIa receptor binding activity of an IgG1 antibody[J]. *Biotechnol Prog*, 2016, 32(5):1181-1192.
- [8] PAWLOWSKI J W, BAJARDI-TACCIOLI A, HOUE D, *et al.* Influence of glycan modification on IgG1 biochemical and biophysical properties [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 151: 133-144.
- [9] WADA R, MATSUI M, KAWASAKI N. Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms [J]. *mAbs*, 2019, 11(2):350-372.
- [10] ZHANG Y, FAN C, ZHANG L, *et al.* Glycosylation-dependent antitumor therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2019, 163: 471-485.

(收稿日期:2019-08-20)