DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20240410

单抗药物非还原毛细管电泳法方法学验证研究

徐刚领，倪永波，武刚，付志浩，于传飞，王兰*

（中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室，药品监管科学全国重点实验室，国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室，国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室，北京 102629）

【摘要】目的 对单抗药物的非还原十二烷基硫酸钠毛细管电泳法（nrCE-SDS）进行方法学验证，为业界相应质控方法的方法学验证提供参考。**方法** 按照2020版《中华人民共和国药典》三部通则3127单抗分子大小变异体测定法检测。2名实验员分别进行3 d实验，每天采用相同的检测方法分析受试样品，并进行全面的方法学验证。**结果** 该方法专属性良好，各分析用样品主峰的准确性为98%~102%，总片段和特定杂质的准确性为70%~130%；重复性和中间精密度的RSD≤15%；主峰≥89.9%，总片段范围为0.66%~10.10%，特定杂质的范围为0.36%~4.80%；本方法的定量限为0.33%。**结论** 对方法的准确性、精密度、线性、范围、定量限和专属性进行了全面的验证研究，为相应方法学验证的科学性和合理性设计提供了参考。

【关键词】单抗药物；纯度；非还原毛细管电泳法；方法学验证；质量控制

中图分类号：R927.11　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096−8965（2024）04−0082−05

Methodological validation study of nrCE-SDS for monoclonal antibodies

Xu Gangling, Ni Yongbo, Wu Gang, Fu Zhihao, Yu Chuanfei, Wang Lan*

(Division of Monoclonal Antibodies, National Institutes for Food and Drug Control, State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, National Health Commission Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Medical Products Adminstration Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

【Abstract】Objective To perform methodological validation of non-reduced capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate (nrCE-SDS) for monoclonal antibodies, providing a reference for the methodological validation of corresponding quality control methods in the industry. **Methods** Samples were analyzed according to the general chapter <3127> determination method for monoclonal antibody molecular size variants in the *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* (2020 edition). Two laboratory technicians performed experiments over three days, using the same detection method daily to analyze the test samples, alongside comprehensive methodological validation. **Results** The method demonstrated good specificity, with the accuracy of the main peaks of all analytical samples reaching 98% to 102%, and the accuracy of total fragments and specific impurities reaching 70% to 130%. The relative standard deviation (RSD) for repeatability and intermediate precision was ≤15%. The ranges for the main peak, total fragment, and specific impurity were ≥89.9%, 0.66% to 10.10%, and 0.36% to 4.80%, respectively.

收稿日期：2024-08-26；**修回日期：**2024-10-10

基金项目：国家重点研发计划项目（2021YFF0600804）

通信作者：王　兰（1977-），女，黑龙江哈尔滨人，研究员，主要从事抗体类药物质量研究和评价工作，E-mail：wanglan@nifdc.org.cn

The limit of quantification of the method was 0.33%. **Conclusion** Full validation demonstrates good accuracy, precision, linearity, range, limit of quantification, and specificity of the method, providing a reference for the scientific and rational design of corresponding methodological validations.

【Keywords】 Monoclonal antibody; Purity; Non-reduced capillary electrophoresis; Methodological validation; Quality control

抗体类药物因其具有靶向性强、特异性好、治疗效果显著等优点，在生物药中占据越来越重要的地位，已经涵盖肿瘤、自身免疫性疾病、心血管和神经性疾病、抗感染、罕见病等治疗领域[1]。近年来，随着表达产量、大规模生产等技术壁垒的突破，以及中国药品审评审批制度改革，中国的抗体药物产业也有了迅速的发展，已有100余个国产和进口抗体药物获批上市[2-3]。抗体类药物申报上市前需要开展充分的药学研究，产品的质量标准是其重要的组成部分，通常包括鉴别、生物学活性、大小异质性、电荷异质性和残留杂质，以及颜色、澄清度、渗透压摩尔浓度、不溶性微粒、可见异物、蛋白质浓度及安全性控制指标等一般常规检查[4-6]。其中非还原十二烷基硫酸钠毛细管电泳法（non-reduced Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate，nrCE-SDS）作为目前用于分析大小异质性的常规检测方法被广泛运用，但是本研究发现不少企业在进行此类方法的方法学验证时不充分或存在误区。本研究采用2020年版《中华人民共和国药典》三部通则3127单抗分子大小变异体测定法，使用典型单克隆抗体，并参照2020年版《中华人民共和国药典》9101分析方法验证指导原则[7]和ICH Q2[8]进行全面的方法学验证，旨在给业界提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品

一种IgG1型单克隆抗体药物mAb1，为单克隆抗体产品室留样，质量浓度为25 mg/mL。

1.2 试剂材料及主要仪器

SDS-MW分析试剂盒（含有SDS-MW Gel Buffer，0.1 mol/L氢氧化钠，0.1 mol/L盐酸）、Beckman毛细管（50 μm×31 cm，有效长度21 cm）均购自美国Beckman Coulter公司；样品处理液[1% SDS的0.04 mol/L磷酸盐溶液（pH=6.5）]；0.8 mol/L碘乙酰胺水溶液；1 mol/L氢氧化钠溶液；双氧水；水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司，型号DK-8D）；金属浴（美国OHAUS公司，型号HB2DG）；光照培养箱（德国BINDER公司，型号KBF-LQC 720）；医用冷藏箱（中国海尔股份有限公司，型号HYCD-282）；离心机（美国BECKMAN COULTER公司，型号Microfuge 20R）；毛细管电泳系统为美国Beckman公司的PA800 plus（PDA检测器）。

1.3 强制降解样品制备

高温降解样品：将样品置于金属浴中，（60±2）℃放置24 h；碱性降解样品：用氢氧化钠溶液将样品pH调节至11.00±0.02，2~8℃放置10 d；光照降解样品：将样品置于光照培养箱中，设定日光光照5 000 Lux，紫外90 Uw/cm^2，温度（25±2）℃条件下放置10 d，光总量为1.2×10^6 Lux·h；氧化降解样品：将样品中加双氧水至终浓度为0.1%，室温孵育6 h。

1.4 nrCE-SDS检测方法

用样品缓冲液将样品稀释至1 mg/mL，取95 μL加入0.8 mol/L碘乙酰胺水溶液5 μL，涡旋混匀后70℃孵育5 min，冷却至室温后5 500×g离心1 min。取80 μL置进样瓶上机分析。采用Beckman PA800 plus毛细管电泳系统，使用无涂层毛细管（总长度31 cm，有效长度21 cm）检测。检测条件：10 kV反相极性电动进样40 s，15 kV反相极性分离40 min，毛细管温度为20℃，样品室温度为20℃，检测波长为220 nm。按面积归一化法计算样品主峰、低分子量物质的校正峰面积百分比。

1.5 验证方案

采用正常样品与降解样品按比例混合的方式制备分析用样品（见表1），每个样品平行制备2份，

表1 主峰和杂质分析用样品制备

Table 1 Preparation of samples for main peak and impurity analysis samples

样品比例（%）	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
碱解样品比例	100	90	70	50	40	20	10	5	0
正常样品比例	0	10	30	50	60	80	90	95	100
主峰	89.1	89.9	91.4	92.9	93.7	95.2	95.9	96.3	96.7
总片段	8.9	8.3	7.2	6.0	5.4	4.3	3.7	3.4	3.1
特定杂质	5.1	4.8	4.1	3.5	3.1	2.5	2.1	2.0	1.8

2份平行结果的平均值为该点结果。根据样品S1（强制降解样品）和S9（正常样品）的纯度值，分别计算S2~S8主峰和杂质纯度。理论值的计算按照添加强制降解样品与正常样品的比例计算。例如：S5样品主峰理论值=（0.4×S1样品主峰）+（0.6×S9样品主峰）。

为评价方法的分析线性、准确度、范围、精密度，2个实验员分别在3 d内进行实验，每个样品共有6个数据。仪器线性的验证使用超纯水将样品稀释至0.2 mg/mL、0.5 mg/mL、0.8 mg/mL、1.0 mg/mL、1.2 mg/mL、1.5 mg/mL，分别相当于正常上样量的20%、50%、80%、100%、120%、150%。本研究还考察了方法的耐用性，研究参数包括轻微改变孵育温度（68~72 ℃）、孵育时间（3~7 min）、碘乙酰胺体积（3~7 μL）。样品稳定性研究通过考察将配置完成后的正常样品作为0 h样品，比较在室温放置约4 h、24 h、48 h，以及在2~8℃条件下放置约4 h、24 h、48 h后样品的检测结果的差异。

2 结果

2.1 专属性

专属性是指在可能存在其他成分的情况下，采用的方法能正确测定出被测物的能力。本研究通过2个方面考察专属性：一是通过分析制剂处方缓冲液、超纯水、样品处理液是否存在显著的干扰峰，结果如图1所示，在目标范围内未见任何干扰吸收峰；二是分析方法是否具有稳定性指示作用，结果如图2所示，本方法可以对高温、碱性、光照降解与未降解样品进行区分，但无法区分氧化降解与未降解样品。

2.2 线性

2.2.1 仪器线性

分别以校正峰面积为纵坐标，以上样质量浓度为横坐标进行线性回归拟合，结果见图3，主峰、片段、特定杂质（主峰前的一个杂质峰，以下均称特定杂质）的R^2分别为0.998 5、0.998 8和0.999 0，表明在正常上样质量浓度的20%~150%（0.2~1.5 mg/mL）内，校正峰面积与上样质量浓度的线性关系良好。

2.2.2 分析线性

以多次测量样品S1、S9的平均值为其理论值，计算S2~S8的理论值，并以理论值为横坐标，实测值为纵坐标进行线性回归，主峰和总片段、特定杂质的线性拟合图见图4，R^2分别为0.993 7，0.996 5，0.991 0，结果表明本方法的分析线性较好。

2.3 准确度

本研究设定主峰、总片段和特定杂质的准确度

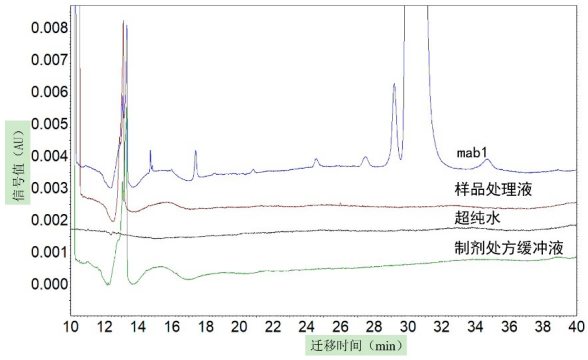


图1 nrCE-SDS专属性考察结果

Figure 1 Specificity assessment results of nrCE-SDS

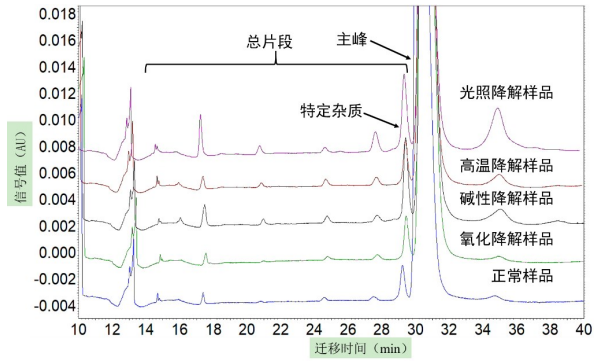


图2 nrCE-SDS稳定性指示性考察结果

Figure 2 Stability-indicating results of nrCE-SDS

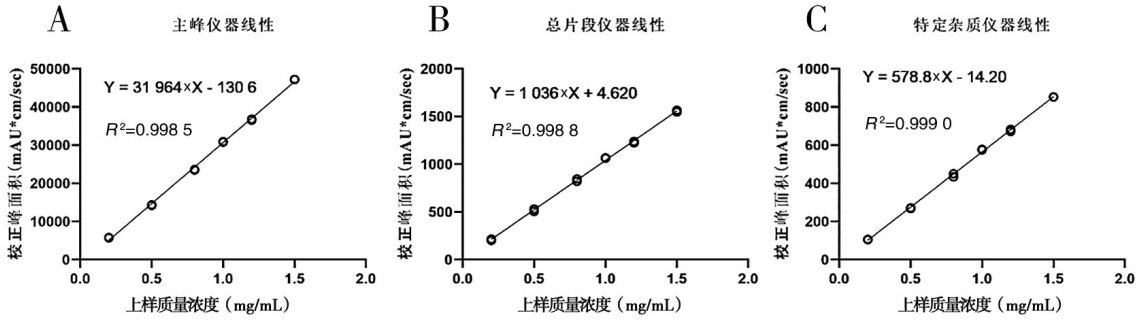


图3 nrCE-SDS仪器线性回归直线图

Figure 3 Regression line plots for instrument linearity of nrCE-SDS

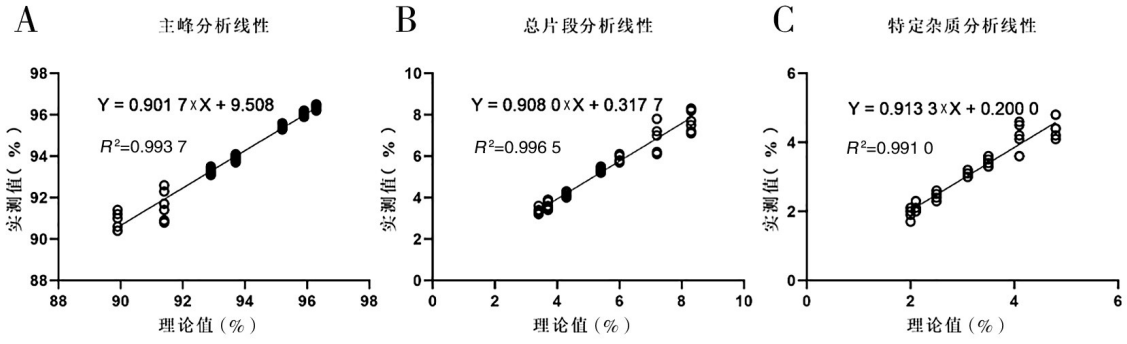


图4　nrCE-SDS主峰、总杂质、特定杂质的分析线性回归直线图

Figure 4　Regression plots for analysis linearity of nrCE-SDS main peak, total impurity and specified impurity

可接受标准分别为98%~102%、70%~130%。采用上节线性数据，计算分析线性以及仪器线性样品的主峰、片段以及特定杂质的回收率：

回收率%=（实测值/理论值）×100%

仪器线性的回收率以S9正常样品的主峰、总片段、特定杂质的校正峰面积百分比为理论。仪器线性主峰和特定杂质的回收率为99.79%~100.10%，总片段的回收率为103.23%~112.90%，特定杂质的回收率为100%。分析线性回收率结果见表2，其中分析线性主峰的回收率为99.45%~100.56%，总片段的回收率为84.72%~108.33%，特定杂质的平均回收率为85.00%~112.20%。结果显示该方法具有良好的准确度。

表2　nrCE-SDS分析线性准确性结果（%）

Table2　Accuracy of nrCE-SDS analytical linearity experiment（%）

指　标	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
主峰	100.56~101.67	99.45~101.31	100.21~100.65	100.00~100.43	100.10~100.42	100.00~100.31	99.90~100.10
总片段	85.54~100.00	84.72~108.33	95.00~101.67	96.30~101.85	93.02~100.00	91.89~105.41	94.12~105.88
特定杂质	85.42~100.00	87.80~112.20	94.29~102.86	96.77~103.23	92.00~104.00	95.24~109.52	85.00~105.00

2.4　精密度

重复性由1名实验员采用正常非降解样品（也是仪器线性项100%浓度点的样品）平行制备6份并对其进行nrCE-SDS考察，计算相对标准差（Relative Standard Deviation，RSD）以评价该方法的重复性。考察结果为：主峰纯度RSD为0.1%，总片段的RSD为0.9%，特定杂质的RSD为7.0%，表明该方法具有良好的可重复性。中间精密度是通过计算由2名实验员分别在3 d内进行实验的6个检测结果的RSD进行评价，结果显示S2~S8主峰纯度的RSD为0.1%~0.8%，总片段的RSD为2.3%~9.2%，特定杂质的RSD为2.4%~10.5%；结果表明该方法中间精密度良好。

2.5　范围

分析方法的范围是指实验方法提供可接受程度的线性、准确度和精密度能力的范围值。使用本文“2.2.2”“2.3”“2.4”中所述研究结果，本方法的主峰为89.9%~96.3%，片段为3.4%~8.3%，特定杂质为2.0%~4.8%。结合本文“2.2.1”仪器线性的结果，主峰的范围扩宽至150.0%，最终范围为89.9%~150.0%；片段的范围扩宽至0.7%，最终范围为0.7%~8.3%；特定杂质的范围扩宽至0.4%，最终范围为0.4%~4.8%。

2.6　定量限

分析方法的定量限是指在一个样品中待测物能够被定量测定的最低量，具有适当的精密度和准确度。本研究采用考察仪器线性最低进样质量浓度（0.2 mg/mL）的特定杂质校正峰面积用于评估定量限。理论校正峰面积（%）=(0.2/1.0)×1.0 mg/mL质量浓度下特定杂质校正峰面积（%）(1.8%)=0.36%。实测校正峰面积（%）=0.2 mg/mL质量浓度下特定杂质校正峰面积平均值/1.0 mg/mL质量浓度的总校正峰面积平均值的百分比=106/319 41=0.33%，回收率为92%。6次分析精密度RSD为0.1%。上述结果满足准确性和精密性要求，将0.33%作为本方法的定量限。

2.7　耐用性

采用单因素试验，通过微小改变样品孵育温度、孵育时间、烷基化试剂体积、采集时间等，考察其主峰、总片段、特定杂质与正常水平检测结果差值评估耐用性。另外，还考察了制备样品溶液的稳定性：样品配置完成后，立即进样作为0 h样品，并分别与在室温及2~8℃放置4 h、24 h、48 h后的

样品比较，计算其主峰、杂质与0 h的检测结果差值。变化条件与考察结果见表3和表4，结果表明，制备样品溶液在2~8℃条件下48 h、室温条件下24 h内的稳定性较好，在本研究其他变化的条件下该方法也具有良好的耐用性。

表3 耐用性研究条件及其结果

Table 3 Robustness study conditions and results

变化条件	孵育温度（℃）	孵育时间（min）	碘乙酰胺体积（μL）	校正峰面积差值（%）		
				主峰	总片段	特定杂质
最低水平	68	3	3	−0.2	0.2	0.2
最高水平	72	7	7	0.1	0.3	0.3

表4 制备样品溶液的稳定性研究结果

Table4 Stability study results of prepared sample solutions

时间	放置条件	校正峰面积差值（%）		
		主峰差值	总片段差值	特定杂质差值
4 h	2~8℃	0	0	0
4 h	室温	0	0	0
24 h	2~8℃	0.1	0.1	−0.1
24 h	室温	0.3	0.3	0.3
48 h	2~8℃	0	0	0
48 h	室温	−0.8	0.8	0.8

3 讨论

分子大小变异体主要是抗体药物分子在生产或储存过程中发生聚集、截断、二硫键连接错误或氨基酸序列变化等引起，主要表现如聚体、片段等[9-12]；聚体可能会产生免疫原性，而片段会对产品有效性产生影响，评估认为其为关键质量属性需纳入质量标准中进行控制[13-16]。目前，大小变异体常规分析手段包括体积排阻色谱法、十二烷基硫酸钠毛细管电泳法（Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate，CE-SDS）等[17-21]，其中CE-SDS法需要在样品处理时加入SDS，破坏了分子间非共价的作用力，因此，由非共价键形成的聚体在此方法下不能被检出，所以在质量标准中一般主要用于产品主峰和片段的控制。与还原CE-SDS方法验证纳入非糖基化重链不同[22]，考虑到在nrCE-SDS检项中可能会对产品特定杂质进行控制，为使本研究的参考性更强，本研究还纳入特定杂质的方法学验证研究。本研究采用药典方法并按照相关指导原则对方法的专属性、稳定性指示、线性、准确度、重复性、中间精密度、定量限、耐用性等进行了考察。研究结果表明，该方法专属性好、具有良好的准确度和精密度。本制品制定的质量标准为主峰≥95.0%，片段≤3.0%，特定杂质≤1.5%，本方法的片段和特定杂质的验证范围能够满足规定限度的120%，主峰的范围为89.9%~150.0%也能够满足放行和稳定性期间的数据检测区间，所以方法的验证结果证明本方法适用其分析的目的。

本研究在注册检验的质量标准复核过程中发现，部分企业CE-SDS方法验证存在错误或不足，比如质量标准中规定了主峰和杂质的限度，但仅对主峰进行相关验证；方法验证的范围以及数据的分析描述为样品的质量浓度（一些企业理解范围为上样质量浓度的高低），而不是校正峰面积的百分比；方法验证范围未包括拟定的产品质量标准范围；定量限的制定依据不充分，未考虑需满足准确性和精密性的要求；用于过程控制分析时，未采用过程中样品进行方法的验证等。本研究采用强制降解样品和正常样品混合的方式得到不同比例的主峰、片段和特定杂质，然后分别对主峰、片段以及特定杂质进行全面的方法学验证，只是提供了一个参考案例，企业在实际验证工作中应结合拟定质量标准中的控制项目验证，并不是都需要分别验证。另外，企业在实际操作时也可以采用其它科学适宜的手段进行方法学验证，比如通过收集主峰和片段的馏分后进行加标样品的制备。希望本研究对业界研究抗体类药物nrCE-SDS检测方法验证起到一定的参考作用，同时也可为抗体类药物其他纯度的检测方法，如体积排阻色谱法、离子交换色谱法的方法学验证提供借鉴。

参考文献

[1] MULLARD A. FDA approves 100th monoclonal antibody product[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(7): 491-495.

[2] 武刚，付志浩，徐刚领, 等. 抗体偶联药物研发进展[J]. 生物医学转化, 2021, 2(4): 1-11.

[3] 付志浩, 徐刚领, 黄璟, 等. 单克隆抗体药物研发进展[J]. 中国药事, 2021, 35(11): 1253-1268.

[4] 杜加亮, 于传飞, 王文波,等. 抗HER2单抗注射液（皮下注射）的质量控制[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(5): 643-651.

[5] 俞小娟, 武刚, 张峰, 等. 抗CD19单抗的质量控制研究[J]. 中国药事，2021, 5(9) : 1027-1035.

[6] ICH Harmonised Tripartite Guideline: Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological / biological products Q6B[EB/OL]. (1999-03) [2021-07-03]. http: /www. ich. org /fileadmin / Public_Web_Site /ICH_ Products /Guidelines /Quality /Q6B/Step4 /Q6B_ Guideline. pdf.

（下转第95页）