

中国图书分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1004-5503(2010)08-0861-05

【治疗制品】

重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体的质控方法及质量标准的建立

魏敬双 程立均 赵伟 周兴军 刘进怀 贾茜

【摘要】目的 建立重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体(rhRMcAb)的质控方法和质量标准。方法 采用小鼠中和试验(MNT)和快速荧光灶抑制试验(RFFIT)分别测定 6 批 rhRMcAb 样品的中和活性,还原、非还原 SDS-PAGE 检测 rhRMcAb 样品的纯度,还原烷基化胰蛋白酶酶切和反相高效液相色谱法分析 rhRMcAb 的肽图,焦谷氨酸胺酶去除 N-端焦谷氨酸封闭后,氨基酸序列分析仪测定 rhRMcAb 的 N-端氨基酸序列,表面等离子共振法(Surface plasmon resonance, SPR)测定 rhRMcAb 与狂犬病病毒糖蛋白的亲合常数。按《中国药典》三部(2005 版)要求检测 rhRMcAb 的各项其他指标,并建立其质量标准。结果 采用 MNT 和 RFFIT 2 种方法检测 6 批 rhRMcAb 的中和活性,批间活性基本一致;3 批 rhRMcAb 原液的还原 SDS-PAGE 纯度大于 99.0%,非还原 SDS-PAGE 除抗体主带外,在高、低相对分子质量处分别存在一些次带;3 批原液样品的肽图谱与理化测定对照品一致,N-端氨基酸序列与理论序列一致,结合狂犬病病毒糖蛋白抗原的亲合常数为 $1.86 \times 10^8 / M$;其他各项指标均符合《中国药典》三部(2005 版)要求,建立的质量标准中,中和活性应不低于 500 IU/mg,SDS-PAGE 及 HPLC 纯度应不低于 98.0%。结论 已建立了 rhRMcAb 的质控方法和质量标准,可用于 rhRMcAb 产品的检定。

【关键词】 重组人源单克隆抗体;狂犬病病毒;质量控制

Establishment of Method and Standard for Quality Control of Recombinant Human Monoclonal Antibody against Rabies

WEI Jing-shuang, CHENG Li-jun, ZHAO Wei, ZHOU Xing-jun, LIU Jin-huai, JIA Qian (New Drug R&D Center, North China Pharmaceutical Corporation, Shijiazhuang 050015, China)

【Abstract】 **Objective** To establish the method and standard for quality control of recombinant human monoclonal antibody against rabies (rhRMcAb). **Methods** The rhRMcAb was analyzed for neutralizing activity by mouse neutralization test (MNT) and rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT), for purity by reduced and non-reduced SDS-PAGE and for peptide map by reduction alkylation and trypsin digestion followed by reverse phase HPLC. The amino acids at N-terminus was sequenced by amino acid sequencer after the pyroglutamate blockage at N-terminus was removed by pyroglutamate aminopeptidase. The affinity constant of rhRMcAb with rabies virus glycoprotein was determined by surface plasmon resonance (SPR) method. Other quality indexes of rhRMcAb were determined according to the requirements in *Chinese Pharmacopeia* (2005 edition), based on which a standard for quality control was established. **Results** The activities of six batches of rhRMcAb determined by MNT and RFFIT were basically in agreement. The reduced SDS-PAGE purities of three batches of rhRMcAb bulks were more than 99.0%. Except major antibody bands, some minor bands with both high and low relative molecular masses were also observed on the non-reduced SDS-PAGE profile of rhRMcAb. The peptide maps of three batches of bulks were consistent with that of in-house reference. The amino acid sequence at N-terminus was identical to the theoretical value. The affinity constant of rhRMcAb with rabies virus glycoprotein was $1.86 \times 10^8 / M$. All the other quality indexes of rhRMcAb met the requirements in *Chinese Pharmacopeia* (2005 edition). In the established standard for quality control, the neutralizing activity of rhRMcAb was not less than 500 IU/ml, while both SDS-PAGE and HPLC purities were not less than 98.0%. **Conclusion** The method and standard for quality control of rhRMcAb were established.

【Key words】 Recombinant human monoclonal antibody; Rabies virus; Quality control

狂犬病是由狂犬病病毒引起的人畜共患传染病,流行性广,病死率几近 100%。WHO 推荐的暴露后预防(Post-exposure prevention, PEP)方法为接种狂犬病疫苗,并使用抗狂犬病血清。临床上用单克隆抗体取代血源抗体用于狂犬病病毒暴露后预防已成为共识^[1]。重组人源抗狂犬病病毒单克隆抗体(Reco-

mbinant human anti-rabies virus monoclonal antibody, rhRMcAb)为 CHO 细胞表达的全人源抗体,属于 IgG1 亚型,可代替抗狂犬病血清用于狂犬病病毒暴露后预防。本文对本公司研制的 rhRMcAb 的质控方法和质量标准进行了研究,现报道如下。

1. 材料与方法

1.1 毒株及细胞

狂犬病病毒固定毒株(CVS-11)由武汉生物制品

基金项目:“十一五”863 计划生物和医药技术领域重大项目(2006AA02A247)。

作者单位:华北制药集团新药研究开发有限责任公司生物技术研究室(石家庄 050015)。

通讯作者:魏敬双 E-mail:weijsb@hotmail.com

研究所提供 ;鼠成神经细胞瘤细胞(NA 细胞)来自 TJU USA。

1.2 样品

rhRMcAb 为本公司试制 ,原液 3 批(20060501、20060701、20060801)经检定合格后 ,每批分别制备 2 种规格的制剂各 1 批 ,即 20060501 批原液制备 20070101 和 20070102 批制剂 ,20060701 批原液制备 20070103 和 20070104 批制剂 ,20060801 批原液制备 20070105 和 20070106 批制剂 ,其中 20070101、20070103、20070105 批制剂规格为 200 IU/1.0 ml·瓶 ,20070102、20070104、20070106 批制剂规格为 500 IU/2.5 ml·瓶 ,rhRMcAb 理化测定对照品(批号 :20051101)为本公司自制。

1.3 主要试剂及仪器

荧光素标记的抗狂犬病病毒 N 蛋白抗体由武汉生物制品研究所提供 ;含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养基为 GIBCO 公司产品 ;WHO 抗狂犬病病毒免疫球蛋白国际标准品(30 IU/支 ,用含 10%灭活小牛血清的 DMEM 培养基稀释至 2 IU/ml)购自 NIBSC ,UK ;胰蛋白酶(1 mg/ml)为 Sigma 公司产品 ,焦谷氨酸胺酶为 TaKaRa 公司产品 ,狂犬病病毒糖蛋白(0.6 mg/ml ,11 μ mol/L)由美国 Thomas Jefferson 大学 Dietzschold 博士惠赠 ;C18 3.5 μ m 4.6 mm \times 150 mm RP-HPLC 柱和高压液相色谱仪(515 泵 ,2487 检测器 ,Waters Symmetry 300 工作站)为 Waters 公司产品。

1.4 rhRMcAb 的生物学活性测定

1.4.1 小鼠中和试验(MNT) :采用 MNT 法测定 rhRMcAb 的中和活性 ,方法按《中国药典》三部(2005 版)进行。

1.4.2 快速荧光灶抑制试验(RFFIT) :在 96 孔细胞培养板中用含 10%灭活小牛血清的 DMEM 培养基倍比稀释待测样品及标准品 ,同时设阴性(稀释液)和阳性对照(市售人狂犬病免疫球蛋白 ,按标示量稀释至 1 IU/ml) ,再在各孔中加入 50 μ l 用含 10%新生牛血清的 RPMI1640 培养基稀释的 CVS-11 病毒稀释液(病毒含量可致 80%的细胞被感染) ,37℃中和 1 h ;每孔加入约 5×10^4 个 NA 细胞 ,34℃ ,5% CO₂ 条件下培养 48 h ;弃去培养液 ,PBS 洗涤 1 次 ,冷丙酮固定 20 min ,干燥后加入 200 倍稀释的荧光素标记的抗狂犬病病毒 N 蛋白抗体 ,37℃孵育 1 h ;PBS 洗涤 3 次 ,在荧光显微镜下观察 ,记录每孔细胞荧光灶百分比 ,计算出与阳性对照相比 ,减少 50%荧光灶比例的样品的稀释度 ,并通过与标准品比较 ,计算样品的抗体效价(IU/ml)。

1.4.3 RFFIT 法的验证 :相关性验证采用曲线拟合的方法 ,以样品稀释倍数倒数的对数值为横坐标 ,对应的荧光灶观察值为纵坐标作曲线拟合 ,拟合模型选择 logistic 模型 ,曲线模型为 $Y = 1 / (1 / u + b_0 \times b_1 X)$,使用 SPSS13.0 软件计算结果 ,上限规定为 80.1 ,采用 2 种样品和抗狂犬病病毒免疫球蛋白的国际标准品。精密性验证选择 0.5、1.0 和 2.0 IU/ml 的样品 ,分别测定 3 次 ;重复性验证选择 1.0 IU/ml 的样品进行 1 次试验 ,试验作 10 个平行样品 ,每 2 个平行样品作为 1 个测定单位 ,共 5 个测定单位 ,计算 5 个结果间的变异系数(CV)值。专属性验证 :以 Cetuximab 单抗(抗 EGFR 单抗 ,本公司自制)或 PBS 为干扰物质 ,对 0.5、1.0 和 2.0 IU/ml 的样品进行测定。以 Cetuximab 单抗为干扰物质时 ,将相当于 rhRMcAb 蛋白质浓度 12.5 倍的 Cetuximab 单抗与等体积 rhRMcAb 混合 ,以 PBS 为干扰物质时 ,用 PBS 与等体积的 rhRMcAb 混合。

1.4.4 2 种方法检测结果的比较 :采用 MNT 法和 RFFIT 法分别检测 2 种规格各 3 批 rhRMcAb 样品的生物学活性。

1.5 rhRMcAb 的电泳纯度检测

取 3 批 rhRMcAb 原液样品 ,分别进行还原、非还原 SDS-PAGE ,分离胶浓度分别为 12.5%和 7.5% ,上样量 10 μ g ,150 V 恒压电泳。凝胶用考马斯亮蓝 R250 染液染色。

1.6 rhRMcAb 的肽图分析

用含 DTT、盐酸胍的 NH₄HCO₃ 缓冲液对 3 批 rhRMcAb 原液样品及理化测定对照品进行变性处理 ,加入烷基化试剂封闭自由巯基 ,再用胰蛋白酶进行酶切 ,最后用 C18 3.5 μ m 4.6 mm \times 150 mm RP-HPLC 柱对酶切产物进行分析^[2]。

1.7 rhRMcAb 的 N-端氨基酸序列测定

在酶切缓冲液中加入 0.1%的 Tween20 ,用焦谷氨酸胺酶酶切 20060501 批 rhRMcAb 原液样品及理化测定对照品 ,以去除 N-端焦谷氨酸 ,还原 SDS-PAGE 分离轻、重链后 ,电印迹至 PVDF 膜上 ,用氨基酸序列分析仪测定 N-端氨基酸序列^[3]。

1.8 rhRMcAb 的亲合常数测定

采用表面等离子共振法(Surface plasmon resonance ,SPR)测定 20060801 批 rhRMcAb 原液与狂犬病病毒糖蛋白的亲合常数。使用 BIAcore 3000 ,将狂犬病病毒糖蛋白化学偶联到目标通道 Fc2 ,偶联量 > 1 000 RU。通道 Fc1 进行封闭处理 ,作为对照通道。分别进行梯度浓度(100、50、25、12.5、6.25 和 3.125 nmol/L)样品对芯片表面偶联糖蛋白的结合

曲线测定。使用 Control 软件中的 Wizard 程序 ,记录信号 Fc2-1。以“1 : 1 binding with baseline drift”为分析模块 ,获得亲和力数据。

1. 9 rhRMcAb 的其他指标检测及其质量标准的建立

3 批 rhRMcAb 原液样品的 HPLC 纯度、相对分子质量、等电点、宿主细胞蛋白残留量、ProteinA 残留量、残留 DNA、6 批制剂的热原检测及安全试验等 ,均按《中国药典》三部(2005 版)要求进行。参考重组产品质量控制要点及 ICH 有关质量标准的制定原则 ,制定 rhRMcAb 的质量标准。

2. 结果

2. 1 rhRMcAb 的生物学活性

2. 1. 1 RFFIT 法的验证 2 种样品和抗狂犬病病毒免疫球蛋白国际标准的拟合曲线见图 1 , r 值均大于 0. 9。0. 5、1. 0 和 2. 0 IU / ml 3 种浓度的样品分别经 3 次测定 ,变异系数分别为 18. 0%、11. 0%和 9. 0% ;1. 0 IU / ml 的样品经重复性测定 ,变异系数为 8. 0%。0. 5、1. 0 和 2. 0 IU / ml 3 种浓度的样品以 Cetuximab 单抗为干扰物质进行检测时 ,变异系数分别为 9. 5%、3. 3%和 10. 5% ,以 PBS 为干扰物质时 ,变异系数分别为 5. 2%、9. 6%和 6. 8%。

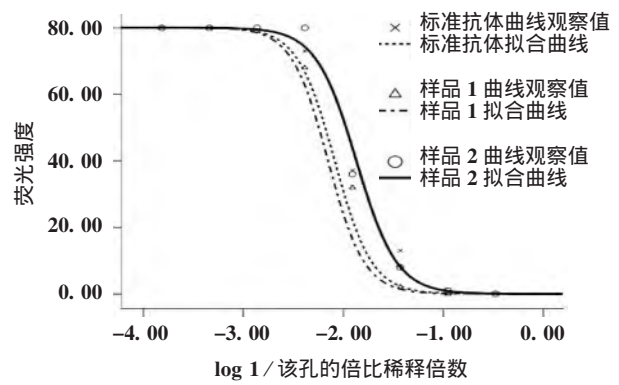


图 1 RFFIT 法荧光观察值拟合曲线
Fig 1. Curve fitting of RFFIT method

2. 1. 2 2 种方法检测结果的比较 检测结果显示 2 种方法检测 hRMcAb 样品的批间活性基本一致 ,见表 1。

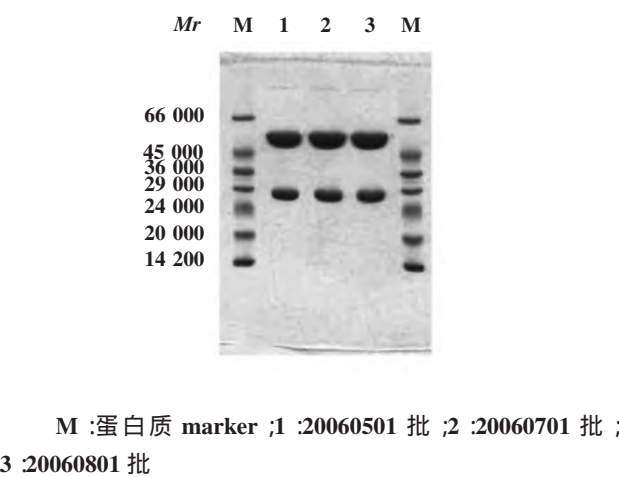
2. 2 rhRMcAb 的电泳纯度

3 批 rhRMcAb 原液样品的还原 SDS-PAGE 除抗体重链、轻链外 ,无其他可见条带 ,样品纯度均大于 99. 0% ,见图 2 ;非还原 SDS-PAGE 除抗体分子主带外 ,还显示一条较明显的高相对分子质量染色带 ,

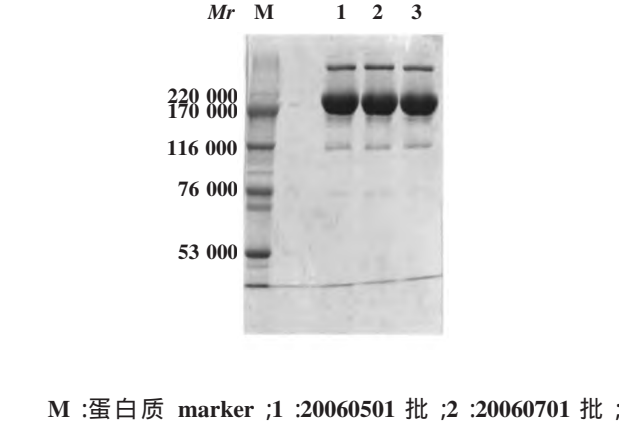
以及显色较弱的低相对分子质量染色带 ,见图 3。

表 1 6 批 rhRMcAb 的生物学活性检测结果

Tab 1. Bioassay results of 6 batches of rhRMcAb		
批号	RFFIT 法(IU / ml)	MNT 法(IU / ml)
20070101	253	235
20070102	260	277
20070103	286	212
20070104	292	240
20070105	226	288
20070106	230	222



M :蛋白质 marker ;1 :20060501 批 ;2 :20060701 批 ;
3 :20060801 批
图 2 3 批 rhRMcAb 原液样品的还原 SDS-PAGE 分析
Fig 2. Reduced SDS-PAGE profile of 3 batches of rhRMcAb bulks

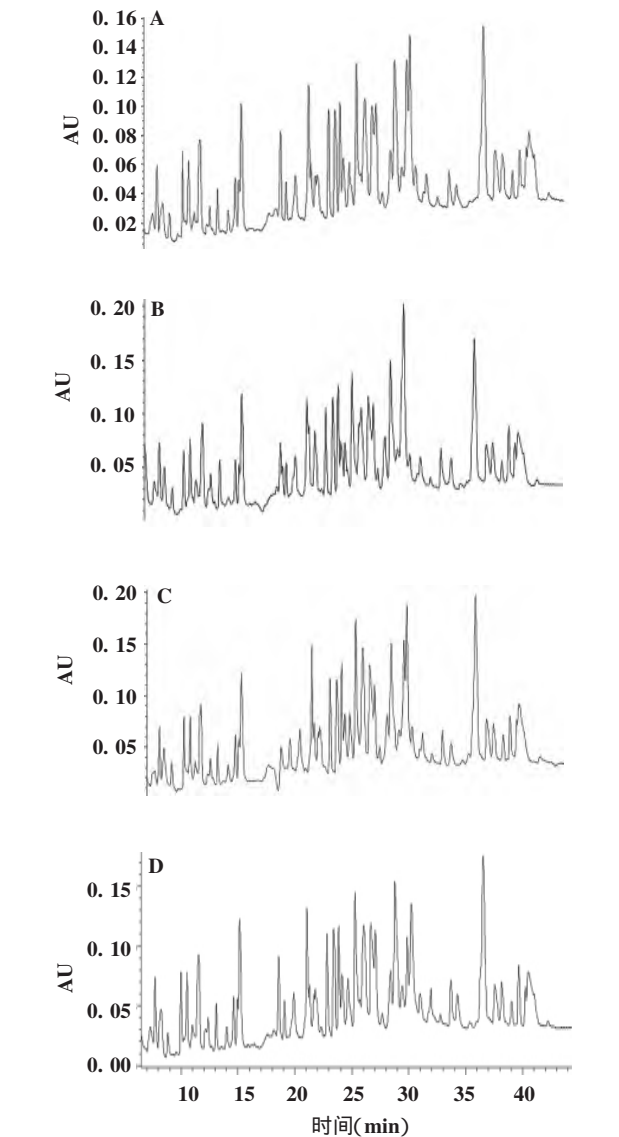


M :蛋白质 marker ;1 :20060501 批 ;2 :20060701 批 ;
3 :20060801 批
图 3 3 批 rhRMcAb 原液样品的非还原 SDS-PAGE 分析

Fig 3. Non-reduced SDS-PAGE profile of 3 batches of rhRMcAb bulks

2. 3 rhRMcAb 的肽图分析

3 批 rhRMcAb 原液样品的肽图图谱与理化测定对照品一致 ,见图 4。



A 20060501 批 B 20060701 批 C 20060801 批 D :理化测定对照品

图 4 3 批 rhRMcAb 原液及理化测定对照品的肽图分析

Fig 4. Peptide mapping of 3 batches of rhRMcAb bulks and in-house reference

2. 4 rhRMcAb 的 N-端氨基酸序列

测序结果显示 ,20060501 批 rhRMcAb 原液样品及理化测定对照品的 N-端焦谷氨酸均被成功去除 ,测定结果均为重链(Q)VQLVQSGAEVKKPGS ,轻链(Q)SALTQPRSVSGSPGQ ,与理论序列一致。

2. 5 rhRMcAb 的亲合常数

通过 SPR 法测得的 20060801 批 rhRMcAb 原液与狂犬病病毒糖蛋白的梯度结合曲线见图 5。经软件计算 ,得到动力学常数分别为 :ka(1 / Ms) = 6. 01 × 10⁴ kd (1 / s) = 3. 23 × 10⁻⁴ ,因此 ,亲和常数为 Ka = ka / kd = 1. 86 × 10⁸ / M。

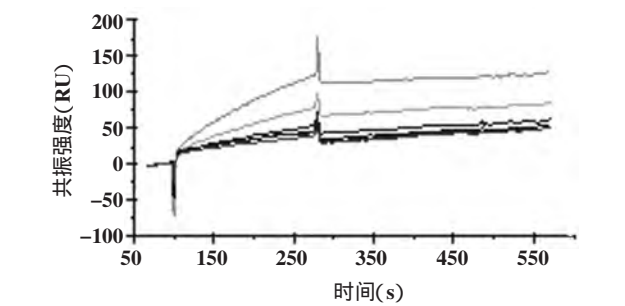


图 5 rhRMcAb 与狂犬病病毒糖蛋白的梯度结合曲线
Fig 5. Gradient binding curve of rhRMcAb and rabies virus G protein

2. 6 rhRMcAb 的其他指标及其质量标准

经检测 3 批 rhRMcAb 原液样品的 HPLC 纯度、相对分子质量、等电点、残留 DNA、宿主细胞蛋白残留量、Protein A 残留量指标均符合《中国药典》三部(无热原安全试验结果 2005 版)的规定。rhRMcAb 的质量标准见表 2。

表 2 rhRMcAb 原液的质量标准
Tab 2. Requirements for quality control of rhRMcAb bulk

检测项目	方法	标准
比活性(IU / mg)	RFFIT	≥ 500
纯度(%)	还原 SDS-PAGE	≥ 98.0
	分子筛-HPLC	≥ 98.0
分子量(kD)	还原 SDS-PAGE	重链 :53 ± 5. 3 轻链 :27 ± 2. 7
等电点	等电聚焦	7. 0 ~ 9. 0
肽图谱	胰酶消化法	与理化对照品一致
紫外最大吸收	紫外光谱扫描	(278 ± 3) nm
残留 DNA 含量(pg / 剂)	点杂交法	≤ 100
宿主细胞蛋白残留量(%)	酶联免疫法	≤ 0. 010
Protein A 残留量(%)	酶联免疫法	≤ 0. 010
N-端氨基酸序列	Edman 降解法	与理论序列一致

3. 讨论

目前 ,WHO 推荐的抗狂犬病病毒抗体效价测定方法为 MNT 法和 RFFIT 法。RFFIT 法与 MNT 法相比 ,具有时间短、成本低等优势 ,适合在较短时间内对大量样品进行测定。程满荣等^[4]及吴小红等^[5]对两种方法检测抗狂犬病病毒中和抗体的相关性、敏感性和重复性进行了比较 ,结果显示二者相关性较好 ,且 RFFIT 法的灵敏度和重复性均优于 MNT 法 ,与本实验结果一致。因此 ,RFFIT 法可替代 MNT 法用于狂犬病病毒中和抗体的检测。在前期研究中 ,我们先后建立了以 BSR 细胞和 NA 细胞为基质的 RF-

FIT 法。实验中发现,以 NA 细胞为基质的 RFFIT 法的精密度和准确性均优于前者。方法学验证结果表明,以 NA 细胞为基质的 RFFIT 法测定抗狂犬病病毒中和抗体效能获得较理想的线性和精密度。

rhRMcAb 样品用 SEC-HPLC 和还原 SDS-PAGE 分析纯度,结果均在 99.0% 以上,但本品的非还原 SDS-PAGE 纯度分析比较特殊,除抗体主带外,在高相对分子质量及低相对分子质量处,分别存在一些次带。通过免疫印迹试验证实,这些蛋白均呈阳性。这些次带产生的原因是抗体分子中存在少量的自由巯基,在电泳样品高温变性处理过程中引发二硫键重排,从而产生一些假象带^[69]。

肽图分析反映了重组蛋白一级结构的完整性和批间稳定性。对于含有多对二硫键、结构复杂的大分子蛋白质,为了得到酶解完全的肽段,首先需将所有二硫键进行还原处理,使其断裂成为还原状态的自由巯基。为防止自由巯基再次形成二硫键,采用烷基化的手段封闭自由巯基。通过上述处理,蛋白在溶液中成为彼此游离的伸展肽链,适于进行胰蛋白酶裂解。用此方法对 3 批 rhRMcAb 原液样品及理化测定对照品进行肽图分析,各批样品显示出良好的一致性,且与理化测定对照品一致。

通过蛋白质序列分析能获得蛋白质一级结构的信息,可用于鉴定重组蛋白结构,N-端 15 个氨基酸序列可作为重组蛋白的重要鉴定指标。与多数抗体一样,rhRMcAb 的轻、重链 N-端氨基酸均为谷氨酰胺,由于自发环化反应成为焦谷氨酸,造成 N-端封闭,无法进行基于 Edman 降解反应的 N-端序列测定,需对 N-端进行去封闭处理。对于 N-端焦谷氨酸的去除方法,已有较多报道^[10-13]。根据重组抗体的情况,本文建立了适合重组抗体产品的 N-端焦谷氨酸去封闭的方法。用此方法对 rhRMcAb 样品及理化测定对照品进行了 N-端序列测定,结果均与理论序列一致。

抗体的亲和力是评价抗体特性的一项重要指标。抗体的亲和力测定方法有许多种,目前常用的包括 SPR 法和 ELISA 法。通过表面等离子共振法测得的 rhRMcAb 样品结合狂犬病病毒糖蛋白抗原的亲和常数为 $1.86 \times 10^8 / \text{M}$ 。

在参考重组产品质量控制要点及 ICH 有关质

量标准制定原则的基础上,制定了 rhRMcAb 的质量标准。rhRMcAb 是我国第 1 个自主研发的全人源单克隆抗体药物,其质量标准的制定为同类产品的质量研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Dietzschold B, Gore M, Casali P, *et al.* Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus [J]. J Virol, 1990, 64 (6) :3087-3090.
- [2] 魏敬双,程立均,刘进怀,等.重组单抗药物的肽图分析[J].生物技术通报,2008,(Z1):172-175.
- [3] 魏敬双,程立均,贾茜.重组抗体的 N-端氨基酸序列测定[J].中国生物制品学杂志,2008,21(12):1118-1120.
- [4] 程满荣,徐葛林,吴杰,等. RFFIT 和 MNT 检测狂犬病毒中和抗体的比较研究[J]. 中国人兽共患病学报,2009,25(1):30-33.
- [5] 吴小红,李加,唐建蓉,等.抗狂犬病病毒中和抗体效价快速荧光灶抑制试验(RFFIT)的建立及应用[J]. 中国生物制品学杂志,2009,22(11):1145-1148.
- [6] Liu H, Gaza-Bulsecu G, Chumsae C, *et al.* Characterization of lower molecular weight artifact bands of recombinant monoclonal IgG1 antibodies on non-reducing SDS-PAGE [J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(11):1611-1622.
- [7] Zhang W, Czupryn MJ. Free Sulfhydryl in recombinant monoclonal antibodies [J]. Biotechnol Prog, 2002, 18(3):509-513.
- [8] Taylor FR, Prentice HL, Garber EA, *et al.* Suppression of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis sample preparation artifacts for analysis of IgG4 half-antibody [J]. Anal Biochem, 2006, 353(2):204-208.
- [9] 程立均,魏敬双,张世雄,等.重组单抗药物的非还原电泳纯度分析[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(1):83-86.
- [10] 坎普 RM,威特曼-利伯德 B,乔里-帕帕多普洛 T. 蛋白质结构分析:制备、鉴定与微量测序[M]. 施蕴渝,饶子和,陈常庆,等.译.北京:科学出版社,2000:115-116.
- [11] Werner WE, Wu S, Mulkerrin M. The removal of pyroglutamic acid from monoclonal antibodies without denaturation of the protein chains [J]. Anal Biochem, 2005, 342(1):120-125.
- [12] Mozdzanowski J, Bongers J, Anumula K. High-yield deblocking of amino termini of recombinant immunoglobulins with pyroglutamate aminopeptidase [J]. Anal Biochem, 1998, 260(2):183-187.
- [13] Hellström JL, Vehniäinen M, Mustonen M *et al.* Unfolding of the immunoglobulin light and heavy chains is required for the enzymatic removal of N-terminal pyroglutamyl residues [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1764(11):1735-1740.

(收稿日期 2010-01-05)