

蛋白类药物强制降解研究进展

张晓腾, 韩建军, 白燕*

华北制药金坦生物技术股份有限公司, 石家庄 050035

摘要: 强制降解试验可以揭示药物可能的降解途径, 为蛋白类药物制剂组方的开发、储存、运输提供支持, 因此, 强制降解研究在蛋白类药物研发中具有重要作用, 但目前关于强制条件的选择、作用时间和降解程度尚无标准指南。综述了目前常用的强制降解条件(高温、pH、氧化、光照、反复冻融和震荡或搅拌)及不同强制降解条件对蛋白类药物的影响, 并提出了相关设计建议, 以期蛋白类药物的强制降解试验条件的选择提供参考。

关键词: 蛋白类药物; 强制降解; 强制条件

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2021.0171

中图分类号: Q493.2 文献标志码: A

Research Progress on Forced Degradation of Biopharmaceuticals

ZHANG Xiaoteng, HAN Jianjun, BAI Yan*

North China Pharmaceutical Jintan Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050035, China

Abstract: The forced degradation studies can reveal the possible degradation pathway of medicine, and provide support for the formulation development, storage and transportation of biopharmaceuticals. Therefore, the forced degradation studies play important roles in biopharmaceuticals research and development, however, there were no standard guidelines on the selection of forced conditions, action time and degradation degree. The commonly used forced degradation conditions (high temperature, pH, oxidation, light, repeated freezing-thawing and shaking or stirring) and the effects of different forced degradation conditions on protein drugs were summarized in this paper, and reasonable design suggestions were put forward, in order to provide reference for the selection of forced degradation studies conditions of biopharmaceuticals.

Key words: biopharmaceuticals; forced degradation; forced conditions

蛋白类药物在肿瘤、免疫等疾病上, 具有特异性高、疗效快、安全性好等优点, 因此, 近年来, 蛋白类药物的研发引起了人们广泛的关注, 尤其是抗体药物, 已成为医药领域发展最迅速、研发数量最多的产品之一^[1-2]。截至2020年, 单克隆抗体产品全球销售额约1 250亿美元, 占药品总销售额的15%^[3]。2019年共批准上市了9款抗体药物, 累计上市的抗体药物数量是2010年的近3倍, 且后期临床管线较丰富, 与2010年相比, 处于后期研究阶段的抗体疗法数量增加了2倍多; 同时, 早期临床管线也较多, 据统计, 有500多种新型抗体疗法已进入临床I、I/II、II期试验^[4-5]。

蛋白类药物主要成分是蛋白质, 其分子量大、不稳定且具有高度复杂的二维和三维构象, 有些蛋白质还有特定的糖基化修饰, 其不稳定性导致对外界条件较敏感, 易发生降解, 从而影响其功效。蛋白类药物的降解产物具有免疫原性, 这也是蛋白类药物的主要危险因素。因此, 稳定性研究是蛋白类药物质量控制的重要内容之一。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)、国际人用药品注册技术协调会(The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)(Q1A8、ICH Q5C)和世卫组织(World Health

收稿日期: 2021-10-20; 接受日期: 2021-12-03

联系方式: 张晓腾 E-mail: 447663259@qq.com; * 通信作者 白燕 E-mail: jtbaiyan@163.com

Organization, WHO)(Annex 10)指南规定了药物稳定性试验的要求,用于了解在各种环境因素的影响下,原料药和药品的质量是如何随时间变化的。强制降解是稳定性试验中最重要的部分,也是预测药物稳定性最常用的工具,可以预测外界条件对药品纯度、效力和安全性的影响,从而制定药品包装、运输、储存等条件要求。目前,对于强制降解研究,仅在ICH Q1B中对强光条件设置有明确的规定,其他条件如高温、高湿、酸/碱水解及氧化条件均无明确规定。虽然化学药物强制降解研究已相对成熟,但蛋白类药物对环境条件更敏感,因此,蛋白类药物强制降解与化学药物差异较大。本文主要综述了蛋白类药物的强制降解条件及其对蛋白质结构的影响,以期对蛋白类药物强制降解试验条件设计提供理论参考依据。

1 蛋白类药物不稳定性因素

蛋白类药物的稳定性由物理稳定性和化学稳定性组成。物理不稳定性与蛋白质高阶结构的变化有关,包括热不稳定性和构象不稳定性,其中热不稳定性与蛋白质的展开温度有关;构象不稳定性与蛋白质的三维结构有关。物理不稳定性可能由降解导致,如去折叠、解离、变性、吸附、聚集和沉淀,其中蛋白质去折叠是非常重要的物理不稳定性因素,会影响蛋白质的二级结构和三级结构,这种构象变化可能会导致蛋白类药物的生物活性下降并可诱导不可逆的蛋白质聚集^[6-8]。而化学不稳定性与蛋白类药物一级结构中肽键的形成和/或断裂有关,可由氧化、还原、脱酰胺、水解、精氨酸转化、 β -消除等不同降解途径引发^[9]。

2 蛋白类药物强制降解条件

不同类型的蛋白质其结构、分子量均不相同,导致稳定性差异较大,因此,难以制定强制降解条件的统一标准。但目前对于降解量,FDA和WHO建议为5%~30%。强制降解的条件若过于激烈,可能会导致次级降解产物的生成,甚至导致主峰被完全破坏,且在研究中这些次级降解产物的稳定性较差,对于蛋白类药物的稳定性及杂质谱无指导价值。若强制降解的条件过于平缓,降解产物的含量很难达到检出限或者定量限,进而很难

对稳定性试验中可能出现的杂质做出正确的预测。因此,合理的试验条件是强制降解成功的关键。目前,强制降解试验条件主要考察高温、pH(强酸、强碱)、氧化、光照、反复冻融、振荡等。

2.1 高温

蛋白类药物受温度影响较大,一般储存于2~8℃下,随着温度的升高,蛋白构象可能会发生展开或者部分展开,展开后的蛋白质更易发生降解或者聚集。随着温度的持续升高,会达到蛋白质融化温度,导致蛋白质发生不可逆的聚集。在高温下,构象发生变化的蛋白质其氨基酸更易与化学物质发生反应,因此,在高温下,蛋白质除了发生聚集外,还会伴随其他化学反应,如氧化、脱酰胺等。蛋白类药物的温度设置条件需高于稳定性研究加速考察温度的10℃以上,还需低于融化温度的10~20℃,才可以获取有效的降解信息。Mcavan等^[10]研究表明,IgG4单克隆抗体在40、50℃处理14 d后,发生了聚集反应,进一步对肽图进行分析发现,Met、Trp和His残基发生了氧化,且50℃处理下,发生了明显的脱酰胺反应;同时,利妥昔单抗在45、55、65℃处理4 h,发现在低于融化温度(45、55℃)时,His和Lys残基发生变化,进而导致单抗的拓扑结构发生了变化,而在65℃时,利妥昔单抗发生聚体沉淀。

药物的高温降解一般遵循阿伦尼乌斯(Arrhenius)方程,其可用来实时预测蛋白质降解情况,但蛋白类药物降解并不遵循阿伦尼乌斯方程。Didier等^[11]发现冻干减毒活疫苗在37℃强制条件下处理14 d,病毒的滴度下降不符合阿伦尼乌斯方程,分析原因为病毒滴度下降首先由病毒与海藻糖之间的氢键发生变化引起,而后发生构象变化(α -螺旋增加、 β -转角减少)和脱酰胺导致病毒失活造成病毒滴度下降,该现象实际遵循二级动力学方程。在其他生物制品中,高温对蛋白类药物造成的降解也发现此种情况,二级动力学模型在储运期间(包括温度偏移)的稳定性均可以被准确预测,而阿伦尼乌斯方程在稳定性预测方面会产生显著误差^[12]。

2.2 pH

蛋白质在极端pH条件下由于维持构象的分子内或分子间作用力(如氢键、静电力和疏水力)被破坏,从而可能导致永久变性或聚集。在细胞培养阶段、低pH病毒失活、纯化阶段等常造成局

部溶液 pH 极端,进而导致蛋白类药物降解,因此,对于工艺研究,了解极端 pH 条件导致的蛋白类药物降解至关重要。蛋白类药物 pH 强制条件一般为低 pH 在 3~5 之间,高 pH 在 8~9 之间,处理时间 1~3 周,甚至 3 个月^[13]。低 pH 条件下蛋白类药物易发生 Gln 脱酰胺和 Asn 残基脱酰胺,在高 pH 条件下蛋白类药物易发生 Met 残基氧化、Gln 残基脱酰胺、Asn 残基脱酰胺和蛋白质纤维化^[14]。但以上条件并不是绝对的,药品中的某些物质也会导致蛋白类药物的降解,如在低 pH 下,中国仓鼠卵巢细胞宿主蛋白也会加速蛋白类药物 Phe 和 Trp 残基的降解^[15]。

高温可以加速 pH 依赖的降解,因此, pH 诱导的强制降解试验的温度一般在 25 °C 或者 40 °C^[16]。但温度对 pH 诱导的强制降解加速并不是绝对的,与缓冲液类型也有一定的关系。Pacea 等^[17]发现温度影响不同 pH 缓冲液下 IgG1 单克隆抗体的脱酰胺速率,在 40 °C 时,酸性缓冲液溶液的脱酰胺速率快于碱性缓冲液,但在 5 °C 时,碱性缓冲液溶液的脱酰胺速率快于酸性缓冲液,原因为 OH⁻ 浓度与单克隆抗体的脱酰胺速率相关,而温度的剧烈变化会影响缓冲液中的 OH⁻ 浓度。pH 对温度造成的蛋白质聚集影响较大,人单克隆 IgG2 抗体在 4 °C 下表现出典型的 pH 依赖性的二聚体聚集。然而在 37 °C 下,高分子量聚集体与 pH 呈负相关关系,表明其与温度介导的剪切相关^[18]。

2.3 氧化

蛋白类药物中 S 原子比较活跃,容易被氧化,因此, Met 和 Cys 残基是最容易被氧化的氨基酸。在碱性条件下, Met 和 Cys 残基氧化可生成 Met 亚砷或 Met 砷甚至形成分子内/间二硫键。由于氨基酸结构中存在芳香环,芳香环容易被氧化,因此, His、Tyr 和 Trp 残基也容易被氧化^[19]。蛋白质的氧化易受到外界环境的刺激,进而加速氧化,如某些金属离子、高温、光照、化学添加剂等。最常用的化学氧化剂为 H₂O₂、叔丁基过氧化氢、2-偶氮双(2-氨基丙烷)二盐酸盐等,常用的金属离子为 Fe²⁺、Fe³⁺、Cu²⁺、Mn²⁺ 等,其中 H₂O₂ 氧化法是最经典的氧化方法,添加量为 0.03~500 mmol·L⁻¹,但反应时间差异较大。氧化法常结合高温或者光照辅助加速氧化,但有时氧化反应速度过快,并且在低温甚至冷冻条件下仍然可以进行,因此,很难将氧化反应终止,目前,最常用的氧化终止法是缓冲液交

换法。蛋白类氧化会造成药物的疗效降低,甚至导致蛋白质空间结构发生变化。Singh 等^[20]在 25 °C 条件下采用 300 mmol H₂O₂ 氧化人粒细胞刺激因子 (human granulocyte-stimulating factor, G-CSF),发现 G-CSF 的 Met 残基最易被氧化,氧化位点为 Met1、Met138、Met127 和 Met 122,其中 Met127 和 Met122 的氧化还会引起 G-CSF 的 Asp113 和 Thr117 残基的轻微位移,从而导致局部构象发生变化。此外,一些赋形剂(如聚山梨酯、聚乙二醇和吐温-80)、润滑剂和包装材料的过氧化物的污染可导致蛋白类药物的氧化^[21]。使用不同的氧化剂虽然均能氧化蛋白质,但氧化的位点优先顺序却存在差异,强光氧化条件下 IgG1 重链的 Met 优先氧化,而叔丁基过氧化氢氧化条件下 Met 氧化是随机的^[22]。

2.4 光照

蛋白类药物一般建议避免阳光直射,并且有些药物需采取相应的措施以避免直接或者长期暴露于阳光下,但在蛋白类生产用药过程中很难完全避免光照,如纯化层析过程中紫外灯的检测、半成品的配制和转移可能暴露于人工光源下等。光强制降解是众多条件中,唯一有指导原则的试验。ICHQ1B 光稳定性试验指导原则要求对光源的波长分布除 450~650 nm 的可见光区外,还应包括 320~400 nm 的近紫外区。因此,光源有 2 种选择方式,第 1 种是光源分布波长特性相当于 ISO 室外日光标准 D65 与室内间接日光标准 ID65 的光源,如日光荧光灯、氙灯、卤灯等;第 2 种是同时暴露于冷白荧光灯和近紫外荧光灯下。并且 ICH 还要求样品应暴露于总照度不低于 1.2×10⁶ lx·h,近紫外能量不低于 200 w·h·m⁻²。光诱导的强制降解与蛋白质的结构和构象、制剂配方组成、包装形式以及光波长、光强度和光照时间密切相关。光强制降解可导致多种产物生成,包括蛋白质聚集、交联和降解。光强制降解常作用于 Cys、Trp、Tyr 和 Phe 靶点^[23]。光照条件下存在的氧化剂或者金属离子均可加速蛋白质氧化。光强制降解虽然只影响单个氨基酸的化学变化,但单个氨基酸可能在活性氧和水共同存在下与其他氨基酸发生反应使蛋白质的构象发生变化,从而导致聚集,或者在长期储存期间,产生的小浓度聚集体作为成核中心,进而产生可见颗粒物。酪氨酸的氧化产物是二酪氨酸,脱质子化的二酪氨酸具有光敏作用,可

以产生 O_2^- 、 H_2O_2 和 O_2 , 进一步与其他氨基酸发生反应, 破坏蛋白质的空间结构^[24]。

除了蛋白类药物的氨基酸光照后形成的氨基酸氧化产物是光敏剂外, 糖基化终产物和过氧化氢物也可以作为光敏剂, 进而破坏蛋白质的结构。蛋白质可与还原糖发生非酶反应, 形成结构多样的杂环交联产物——高级糖基化终产物, 如戊糖苷、甲基乙二醛赖氨酸二聚体、乙二醛赖氨酸二聚体和脱氧葡萄糖基赖氨酸二聚体。这种高级糖基化产物在紫外光的作用下产生 O_2^- 、 H_2O_2 和 O_2 等, 进而氧化破坏蛋白质的结构^[25-26]。蛋白类药物制剂中一般不存在还原糖, 但蔗糖等二糖常作为稳定剂添加到制剂中。蔗糖在酸性和高温条件下易水解为葡萄糖和果糖, 如单克隆抗体在蔗糖中 29 °C 保存 6 个月即可以生成高级糖基化产物^[25]。聚山梨酯-80 是蛋白类药物中常用的抗氧化剂, 亚油酸是其游离的脂肪酸成分。亚油酸可以通过残余宿主细胞蛋白的催化水解或者氧化释放出来。亚油酸可以进一步氧化生成丙二醛。丙二醛可与 Lys 残基反应生成二氢吡啶加合物, 其在光照条件下可产生 O_2 , 以氧化蛋白质^[27]。

2.5 反复冻融

蛋白类药物在储藏和运输过程中, 易受到外界环境的剧烈变化导致发生冻融过程。蛋白类药物运输储藏过程中易发生低于 0 °C 情况, 此时药物是否可以使用需要依据蛋白类药物反复冻融的机制去评估。在反复冻融过程中, 可能会发生蛋白质与冰表面张力变化、温度剧烈变化、浓缩、赋形剂结晶、相分离和 pH 变化, 这些变化会影响蛋白类药物的聚集, 但影响程度取决于制剂的组分、蛋白质本身性质及反复冻融的温度及温度变化速率^[28-29]。蛋白质的聚集主要是由于蛋白结构在冷冻过程中被打开, 蛋白质单体可与相邻单体发生聚合反应, 形成二聚体和三聚体, 但此聚合过程是可逆的。但若 pH 在冷冻过程中变化导致缓冲液 pH 接近蛋白质的等电点时, 近距离蛋白质单体之间互相排斥的电荷被中和, 疏水力会增大, 进而导致蛋白质重新折叠成聚集体(此过程是可逆的)或者与另一个蛋白质单体发生 β -折叠形成不可逆的聚集体^[30]。如单克隆抗体在 -80 °C 下冷冻, 室温下解冻会发生明显的聚集, 但此聚集体是不可逆的, 当冷冻过程 pH 由酸性偏向于中性时, 蛋白质聚集体的含量也随之增加^[31]。蛋白质聚集体在

高温强制条件下也可以形成, 但形成机制不同。如单克隆抗体在高温条件下形成的聚集体是以二硫键连接的, 而在反复冻融过程中形成的聚集体是以非共价键连接起来的, 形成的机制不同, 导致生物物理性质和高阶结构与单体相比差异也较大。反复冻融形成的聚集体在生物活性、物理性质和高阶结构方面与单体差异较小, 但由于空间位阻的存在, 导致其生物活性显著降低^[32]。

反复冻融试验中, 试验样品的体积参数也非常重要, 1~5 mL 蛋白质溶液在几分钟冷冻, 而大体积的蛋白质溶液冷冻过程漫长, 会导致蛋白质溶液出现不均一现象, 这是由于发生了冷冻浓缩现象, 水溶液的冰点低首先冻结, 导致下层溶液蛋白质、缓冲液成分均变大, 引起渗透压、pH 发生变化, 因此, 在反复冻融试验中, 试验的体积应尽可能小。冷冻温度一般需要低于蛋白类药物的玻璃态融化温度, 一般选择 -20 °C 或者 -80 °C。融化温度一般选择 5 °C 或者 25 °C。反复冻融的周期一般应大于 3 个周期。

2.6 振荡或搅拌

蛋白类药物在生产、运输和最终给药过程中常会受到振荡或搅拌, 因此, 测试其在振荡或者搅拌情况下的稳定性非常重要。蛋白质在振荡或者搅拌中会暴露于剪切力增大、气液两相、局部温度变化等情况下, 这些情况可能导致蛋白类药物发生降解。蛋白类药物在混合、过滤等制造过程中易受到剪切力的作用从而导致蛋白质的聚集, 但研究发现当剪切力达到 20~150 pN 时, 蛋白质结构才可能被破坏, 从而导致聚集。一般在混合、过滤过程中, 剪切力最高不超过 0.06 pN, 理论上无法使蛋白质发生聚集, 但也有蛋白质发生聚集的情况, 原因为蛋白质暴露于气液两相界面上导致蛋白质的稳定性发生变化, 其发生的聚集是不可逆的甚至会形成不溶颗粒^[33-34]。剪切力可能会导致蛋白质的融化温度降低从而导致蛋白质的结构发生变化, 如重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)在高剪切力作用下, 虽然构象未发生变化, 但其焓值发生了明显变化^[35]。

在蛋白类药物的实际运输过程中, 虽然难以发生高剪切力作用, 但可能由于多种因素的共同作用导致蛋白类药物的聚集, 如蛋白类药物浓度越高, 蛋白质在疏水作用下越容易自发展开折叠进而形成聚集体。因此, 应充分考虑运输路线、交

通工具、运输距离、运输时间、装载模式、外界环境等因素。通过试验,在运输过程中应确认产品处于拟定的保存条件下可以保持产品的稳定性^[36]。目前,对于运输振荡的模拟,一般采用涡流振荡器法、摇床振荡法和振动试验机法。Fleischman等^[37]采用涡流振荡器、摇床和振动试验机来模拟运输对IgG1和IgG4的影响,发现振动试验机能够预测在实时运输过程中,单克隆抗体在西林瓶和预灌封注射器中发生的聚集,而其他方法不能实时预测,表明振动试验机是模拟蛋白类药物在实际运输过程中蛋白质聚集的有效手段。

3 提高蛋白类药物稳定性策略

虽然以提高蛋白类药物稳定性的新技术或手段较多,但目前仍以物理和化学两种策略为主。在物理策略上,主要通过改变剂型或调整缓冲液的组分以达到提高蛋白质稳定性的目的。目前蛋白类药物剂型主要为注射剂或粉针剂。粉针剂是采用冷冻干燥制得,其蛋白质的稳定性比注射剂更强,主要是由于蛋白质在冷冻干燥后其分子在介质中的热运动及相互作用降低,并且制剂中的赋形剂也可维持蛋白质的天然结构,从而其稳定性也大大提高^[38-39]。因此,对于不稳定的蛋白主要采用冷冻干燥制成粉针。在冷冻干燥中使用的赋形剂主要有糖类或糖醇(如甘露醇、葡萄糖等)、氨基酸(如组氨酸^[40]、精氨酸等^[41])、表面活性剂(如吐温20、吐温80等)、聚集体(如乙二醇、葡聚糖和聚乙烯吡咯烷酮等^[42])。随着科学技术的发展,脂质体包埋^[43]、纳米微球^[44]、聚电解质^[45]等也是提高蛋白类药物稳定性的有效手段,其可以较好地抵抗温度、pH造成的蛋白质降解。在注射制剂中,调整缓冲液的pH或组分是提高蛋白类药物稳定性最常用的策略^[46]。蛋白类药物易受到pH的影响,因此,将蛋白类药物调整到稳定性的范围内是最经济的手段。在组分添加中,主要添加物有表面活性剂、糖类等物质。表面活性剂中吐温-80应用最广泛,其可以防止蛋白聚集,从而达到稳定蛋白质的目的^[47]。糖类可通过非特异性的静电作用提高蛋白类药物的稳定性^[48]。

在化学策略上,主要是通过对蛋白质的结构进行修饰以达到稳定的目的,主要手段有定点突变、聚乙二醇修饰、糖基化修饰、脂肪酸修饰及末

端修饰等,其中聚乙二醇修饰及脂肪酸修饰是最成功的手段,均有大量商业化产品上市。定点突变主要是通过对不稳定的氨基酸残基侧链进行替换,且不对活性中心进行修饰,以达到不影响其活性且增加稳定性的目的。Palmer等^[49]发现蛋白G在碱性条件下,Asn37残基易发生降解导致其蛋白不稳定,而将其位置突变为Thr后发现其耐碱性增加8倍。用聚乙二醇对蛋白质进行修饰后形成了大量的氢或离子键,这些亲水键的形成,会提高其稳定性,延长其半衰期,如商业化聚乙二醇化人粒细胞刺激因子等。糖基化修饰是对蛋白质的N-糖基、O-糖基、C-糖基以及糖基磷脂酰肌醇等进行修饰,是最简便、有效的工具^[50]。CH₂结构域是人类IgG恒定区的关键结构,但其最不稳定。有研究者^[51]对CH₂结构域的糖基化进行修饰,构建出不含糖基化的CH₂结构域后,发现其不会造成蛋白聚集,其免疫原性也更强,表明CH₂结构域的糖基化易造成蛋白聚集。脂肪酸修饰也是商业化较为成功的方法,如利拉鲁肽等均已成功上市。脂肪酸修饰后的蛋白质稳定性更强,还有利于提高其脂溶性^[52]。末端修饰主要应用于多肽类药物,多肽中的静电作用力是维持肽链结构与稳定性的主要应力,因此,对肽链末端进行修饰可加强静电作用进而提高多肽的稳定性。Zheng等^[53]将神经六肽的N端和C端分别连接Phe和Thr后发现,其结构更稳定,且不易发生聚集。

4 展望

强制降解是蛋白类药物研发过程中最重要的一环,其可以阐明蛋白类药物的内在稳定性及降解机制,从而为分析方法的建立及制剂开发等指明方向。强制降解条件是强制降解研究成功的关键,但目前强制降解条件与稳定性研究试验条件相比缺少相关的指南和建议,对蛋白类药物的强制降解条件主要依靠蛋白质的结构和研究人员经验进行确定,因此,需要质量研究人员对蛋白质的结构有清楚的认知,虽然药典中未对强制降解的批次进行要求,但在前期试验条件探索过程中,需要大量的试验和批次才能确认较好的试验条件。在强制降解试验中制剂使用的包材(如预灌封注射器、西林瓶等)质量较稳定,然而在原液中使用的包材大多数为重复使用的材料,质量稳定性较

差,容易对试验造成干扰,因此,建议使用质量较好的且未使用的原液包材进行强制降解,以保证批次间的一致性。

综上所述,反复冻融和震荡或搅拌主要引起蛋白质物理不稳定性,造成蛋白质的聚集,而高温、氧化、光照可以引起蛋白质化学不稳定性,造成蛋白质氨基酸氧化、脱酰胺等,从而使蛋白质高级结构发生变化,导致蛋白类药物失活。此外,一些缓冲液或制剂成分会加速蛋白质的降解,如金属离子、还原糖等。目前强制降解试验中仍存在降解程度过低的问题,导致长期试验中难以发现该物质,进而造成检测条件不合理,影响患者身体健康;同时,也存在降解条件过于剧烈,检测到降解产物再次降解,这些次级降解产物在药品稳定性试验中很难出现,造成方法及降解产物毒理学研究过度。在强制降解试验中也存在分析方法灵敏度过低、方法不合理的问题,这需要对于可能降解的产物采用更加灵敏的方法,如质谱法、核磁共振等进行分析,以期确定其结构或者可能发生降解的位点,为制剂配方的开发或稳定性改造奠定研究基础。此外,强制降解条件的合理设计是试验成功的关键。本文为蛋白类药物研发人员的强制降解条件的选择以及降解产物的分析提供了理论参考。

参 考 文 献

- [1] BECK A, WAGNER-ROUSSET E, AYOUB D, *et al.*. Characterization of therapeutic antibodies and related products[J]. *Anal. Chem.*, 2013, 85(2): 715-736.
- [2] 张忠兵,韦薇,罗建辉.生物类似药糖基化相似性评价中的审评思考[J].*中国新药杂志*,2020,29(21):2476-2480.
- [3] 周爱萍.生物治疗药物和生物类似药研究进展[J].*中国新药杂志*,2017,26(3):296-299.
- [4] HELENE K, MURALIDHARAN M, SCHNEIDER Z, *et al.*. Antibodies to watch in 2020[J]. *MAbs*, 2020, 12(1): 1-8.
- [5] FDA. New Drug Therapy Approvals 2019 [EB/OL]. [2020-01-06]. <https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/new-drug-therapy-approvals-2019>.
- [6] WANG W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals[J]. *Int. J. Pharm.*, 1999, 185(2): 129-188.
- [7] ALEXIS O, JOSEB F, MATIAS L. New trends in analysis of biopharmaceutical products[J]. *Curr. Pharm. Anal.*, 2007, 3(4): 230-248.
- [8] DHAMA K, MUNJAL A, HMN I. Recent advances and novel strategies for the development of biomedical therapeutics: state-of-the-art and future perspectives[J]. *Int. J. Pharm.*, 2017, 13(7): 929-933.
- [9] GAVINA J, BRITZ-MCKIBBIN P. Protein unfolding and conformational studies by capillary electrophoresis[J]. *Curr. Anal. Chem.*, 2007, 3(1): 17-31.
- [10] MCAVAN B S, BOWSHER L A, POWELL T, *et al.*. Raman spectroscopy to monitor post-translational modifications and degradation in monoclonal antibody therapeutics[J]. *Anal. Chem.*, 2020, 92(15): 10381-10389.
- [11] DIDIER C, VERONIQUE H, WOINET B, *et al.*. A spray freeze dried micropellet based formulation proof-of-concept for a yellow fever vaccine candidate[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2019, 142: 334-343.
- [12] DIDER C. Accurate prediction of vaccine stability under real storage conditions and during temperature excursions[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2018, 125: 76-84.
- [13] HALLEY J, CHOU Y R, CICCHINO C, *et al.*. An Industry perspective on forced degradation studies of biopharmaceuticals: survey outcome and recommendations[J]. *J. Pharm.*, 2019, 109(1): 6-21.
- [14] HASELLBERG R, BRINKS V, HAWA A, *et al.*. Capillary electrophoresis-mass spectrometry using noncovalently coated capillaries for the analysis of biopharmaceuticals[J]. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400: 295-303.
- [15] LIM A, DOYLE B L, KELLY G M, *et al.*. Characterization of a cathepsin D protease from CHO cell-free medium and mitigation of its impact on the stability of a recombinant therapeutic protein[J]. *Biotechnol. Prog.*, 2018, 34(1): 120-129.
- [16] DOVGAN T, GOLGHALYANI V, ZURLO F, *et al.*. Targeted CHO cell engineering approaches can reduce HCP-related enzymatic degradation and improve mAb product quality[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2021, 118: 3821-3831.
- [17] PACEA L, WONG R L, ZHANG Y T, *et al.*. Asparagine deamidation dependence on buffer type, pH, and temperature[J]. *J. Pharm.*, 2013, 102(6): 1712-1723.
- [18] PERICO N, PURTELL J, DILLON T M, *et al.*. Conformational implications of an inversed pH-dependent antibody aggregation [J]. *J. Pharm.*, 2009, 98(9): 3031-3042.
- [19] PATEL J, KOTHARI R, TUNGA R, *et al.*. Stability considerations for biopharmaceuticals, part 1: overview of protein and peptide degradation pathways[J]. *Bioprocess Int.*, 2011, 9(1): 20-31.
- [20] SINGH S K, MISHRA A, GOEL G, *et al.*. Modulation of granulocyte colony stimulating factor conformation and receptor binding by methionine oxidation[J]. *Protein*, 2020, 86(1): 1-13.
- [21] GRAF T, ABSTIENS K, WEDEKIND F, *et al.*. Controlled polysorbate 20 hydrolysis — a new approach to assess the impact of polysorbate 20 degradation on biopharmaceutical product quality in shortened time[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2020, 152: 318-326.
- [22] LIU H, GAZZ-BULSECO G, ZHOU L. Mass spectrometry analysis of photo-induced methionine oxidation of a recombinant human monoclonal antibody[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2009, 20(3): 525-528.
- [23] SCHEICH C. Photo-degradation of therapeutic proteins: mech-

- anistic aspects[J]. *Pharm. Res.*, 2020, 37(3): 2763-2768.
- [24] REID LO, VIGNONI M, MARTINS-FROMENT N, *et al.* Photochemistry of tyrosine dimer: when an oxidative lesion of proteins is able to photoinduce further damage[J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2019, 18(7): 1732-1741.
- [25] HEMMLER D, GONSIOR M, POWERS L C, *et al.* Simulated sunlight selectively modifies Maillard reaction products in a wide array of chemical reactions[J]. *Chemistry*, 2019, 25(57): 13208-13217.
- [26] KAUR H, KAMALOV M, BRIMBLE M A. Chemical synthesis of peptides containing site-specific advanced glycation end-products[J]. *Acc. Chem. Res.*, 2016, 49(10): 2199-2208.
- [27] JACOBITZ A W, DYLLSTRA A B, SPAHR C, *et al.* Effects of buffer composition on site-specific glycation of lysine residues in monoclonal antibodies[J]. *J. Pharm.*, 2019, 109(1): 1606-1615.
- [28] LAMORE S D, AZIMIAN S, HORN D, *et al.* The malondialdehyde-derived fluorophore DHP-lysine is a potent sensitizer of UVA-induced photooxidative stress in human skin cells[J]. *J. Photochem. Photobiol. B*, 2010, 101(3): 251-264.
- [29] LATYPOV R F, HOGAN S, LAU H, *et al.* Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc[J]. *J. Biol. Chem.*, 2011, 287(2): 1381-1396.
- [30] HAUPTMANN A, PODGOREK K, KUZMAN D, *et al.* Impact of buffer, protein concentration and sucrose addition on the aggregation and particle formation during freezing and thawing[J]. *Pharm. Res.*, 2018, 35(5): 101-117.
- [31] KEVIN P, KEN T, CHAD E, *et al.* Solution pH jump during antibody and Fc-fusion protein thaw leads to increased aggregation[J]. *J. Pharm. Anal.*, 2018, 8(5): 302-306.
- [32] JUN Z, CHRISTOPHER W, FENG H, *et al.* Structural changes and aggregation mechanisms of two different dimers of an IgG2 monoclonal antibody[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(37): 5466-5479.
- [33] BEE J S, STEVENSON J L, MEHTA B, *et al.* Response of a concentrated monoclonal antibody formulation to high shear[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 103(5): 936-943.
- [34] WANG W, NEMA S, TEAGARDEN D. Protein aggregation pathways and influencing factors[J]. *Int. J. Pharm.*, 2010, 390(2): 89-99.
- [35] MAA Y F, HSU C C. Effect of high shear on proteins[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, 51(4): 458-465.
- [36] MARCH D, BIANCO V, FRANZESE G. Protein unfolding and aggregation near a hydrophobic interface[J]. *Polymers*, 2021, 13(1): 156-170.
- [37] FLEISCHMAN M L, CHUNG J, PAUL E P, *et al.* Shipping induced aggregation in therapeutic antibodies: utilization of a scale down model to assess degradation in mAbs[J]. *J. Pharm. Sci.*, 2016, 106(4): 994-1000.
- [38] SSK A, SMP B, RS C, *et al.* Key factors governing the reconstitution time of high concentration lyophilized protein formulations[J]. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2021, 165: 361-373.
- [39] JEAN-RENE A, RODRIGUES M A, SERGUEI T, *et al.* Freezing of biologicals revisited: scale, stability, excipients, and degradation stresses[J]. *J. Pharm. Sci.*, 2020, 109(1): 44-61.
- [40] AL-HUSSEIN A, GIESELER H. Investigation of histidine stabilizing effects on LDH during freeze-drying[J]. *J. Pharm. Sci.*, 2013, 102(3): 813-826.
- [41] SEIFERT I, FRIESS W. Improvement of arginine hydrochloride based antibody lyophilisates[J]. *Int. Pharm.*, 2020, 589: 118589-118688.
- [42] ARAKAWA T, PRESTRELSKI S J, KENNEY W C, *et al.* Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins[J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 46: 307-326.
- [43] 王静, 赵文静, 胡春梅, 等. 蛋白/多肽类药物脂质体的研究进展[J]. *化工技术与开发*, 2017, 46(8): 32-36.
- [44] HE P, TANG Z, LIN L, *et al.* Novel biodegradable and pH-sensitive poly (ester amide) microspheres for oral insulin delivery[J]. *Macromol. Biosci.*, 2012, 12(4): 547-556.
- [45] YU Y, SHAO Y, ZHOU M, *et al.* Polyethylene glycol-derived polyelectrolyte-protein nanoclusters for protein drug delivery[J]. *RSC Adv.*, 2021, 46: 521-532.
- [46] Houser J, KOSOUROVA J, KUBICKOVA M, *et al.* Development of 48-condition buffer screen for protein stability assessment[J]. *Biophys. Struct. Mech.*, 2021, 50: 461-471.
- [47] RABE M, KERTH A, BLUME A, *et al.* Albumin displacement at the air-water interface by Tween (Polysorbate) surfactants[J]. *Eur. Biophys. J.*, 2020, 49: 533-547.
- [48] EBEL C, EISENBERG H, GHIRLANDO R. Probing protein-sugar interactions[J]. *Biophys. J.*, 2000, 78(1): 385-393.
- [49] PALMER B, ANGUS K, TAYLOR L, *et al.* Design of stability at extreme alkaline pH in streptococcal protein G [J]. *J. Biotechnol.*, 2008, 134(3): 222-230.
- [50] WALTHER R, ZELIKIN A N. Chemical (neo) glycosylation of biological drugs[J]. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2021, 171: 62-76.
- [51] OYAMA K, OHKURI T, OCHI J, *et al.* Abolition of aggregation of CH₂ domain of human IgG1 when combining glycosylation and protein stabilization[J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, 558: 114-119.
- [52] KANAZAWA I, NOSTU M, TANAKA K, *et al.* An open-label longitudinal study on the efficacy of switching from insulin glargine or detemir to degludec in type 2 diabetes mellitus[J]. *Int. Med.*, 2015, 54(13): 1591-1598.
- [53] ZHENG J, MA B, TSAI C J, *et al.* Structural stability and dynamics of an amyloid-forming peptide GNNQQNY from the yeast prion Sup-35[J]. *Biophys. J.*, 2006, 91(3): 824-833.