

# 探讨单抗注册生产现场检查中的质量控制要点

许丹, 周艳, 段爽, 王元\* (国家药品监督管理局食品药品审核查验中心, 北京 100044)

**摘要** 目的: 探讨单抗生产质量控制中的常见问题, 指出单抗注册生产检查中的关注点, 统一单抗注册生产现场检查标准。方法: 以多年的药品检查工作实践为基础, 结合抗体的生物学特点, 从“注册现场检查”的角度分析单抗质量控制和生产中存在的问题。结果与结论: 从基于体系的横向检查策略和基于品种的纵向检查策略两个维度, 明确单抗生产中的关键质控点和统一检查标准, 与业界达成共识, 共同提高国内抗体的工艺控制水平和质量水平。

**关键词:** 单抗; 注册现场检查; 质量工艺控制

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)10-1115-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.10.001

## Analysis of Quality Control in the Pre-approval Inspection of Antibody Products

Xu Dan, Zhou Yan, Duan Shuang, Wang Yuan\* (Center for Food and Drug Inspection of National Medical Products Administration, Beijing 100044, China)

**Abstract Objective:** To discuss the common issues in the manufacture and quality control of antibodies, to point out the concerns in monoclonal antibody production registration inspection, and to unify the standards of pre-approval inspection of antibodies. **Methods:** Based on the practice of the pre-approval inspection and the knowledge of biological characteristics of antibodies, issues in the quality control and production of antibodies were analyzed from the registration field inspection perspective. **Results and Conclusion:** From the two dimensions of system-based horizontal inspection strategy and product-based vertical inspection strategy, the key quality control points and unified inspection standards in the production of antibodies were identified, a consensus was reached with the industry and the improvement of process control and quality level of domestic antibodies were jointly promoted.

**Keywords:** antibody; pre-approval inspection; quality control of process

### 1 概述

自1986年全球第一个治疗肾移植排斥反应的抗CD3鼠源抗体Orthoclone OTK3上市后, 抗体由于特异性强、疗效显著及毒性低等特点, 在肿瘤治疗、自身性免疫性疾病、心血管疾病、过敏症、移植等多个治疗领域内快速发展, 已成为新药市场的焦点, 更是制药企业争相布局的“金矿产业”<sup>[1]</sup>。

相比国外市场, 我国抗体药物市场规模还较

小, 具有成熟的抗体工业化体系和规模化生产能力的企业还不多。但是近年来, 随着国内企业在抗体发酵体积和纯化技术上的突破以及自主创新能力的提高, 我国陆续有创新的抗体药物上市或者进入后期临床阶段, 抗体的研发和注册已经由“生物类似物”开始向“创新药”转变<sup>[2]</sup>。抗体的发展呈现多元化和突飞猛进的方式, 其中为代表的就是以PD-1为靶点的抗体集中报批。

作者简介: 许丹, 主管药师; 研究方向: 生物制品现场核查; Tel: (010) 68441684; E-mail: xud@cfdi.org.cn

通信作者: 王元, 主管药师; 研究方向: 生物制品现场核查; Tel: (010) 68441682; E-mail: wangy@cfdi.org.cn

目前抗体有多个发展方向,如全新靶点抗体药物(New Target Antibodies)、改良抗体(Bio-better)、双特异性抗体(Bispecific Antibodies)、抗体偶联药物(Antibody-drug Conjugates)、复方抗体(Antibody Cocktail)、纳米抗体(Nanobody)等<sup>[3]</sup>。由于抗体本身分子量大、结构复杂,因此需要高度依赖于对生产工艺的控制。目前国内陆续出台了抗体类质量控制的法律法规和指导原则,但是工业界在执行中与监管方常存在分歧,比如工艺控制重要关注点、检查的标准尺度等。只有完善的质控技术和法规标准才能保证抗体药物生产的安全有效,才能够满足患者的需求。

因此,笔者拟从“注册现场检查”的角度,结合国内单抗注册现场检查中发现的共性问题,与业内共同探讨,在抗体研发注册的起始阶段明确单抗生产中的关键质控点和检查的标准,和工业界达成共识,共同提高国内抗体的工艺控制水平和质量水平。

## 2 检查中发现存在的焦点问题

不同于化学药品,单抗有其自身的特性:起始材料均为生物活性物质、单抗分子量大、复杂的高级结构,且组成单抗的氨基酸的各种修饰(如糖基化)对生物活性和质量有重要影响,工艺生产中单抗分子较不稳定,易受酸碱、温度环境因素影响,对热和剪切力敏感,易失活、易被微生物污染,易被酶解破坏<sup>[4]</sup>。

单抗的特殊属性决定质量工艺控制贯穿于整个药品的生命周期。(1)注册工艺研究开发方面,需建立细胞库、完成培养基筛选,完成方法学研究、标准物质开发和质量标准研究(特别是杂质的研究),同时根据确定目标产品质量概况(Quality Target Product Profiles, QTPPs)找出潜在的关键质量参数(Critical Quality Attributes, CQAs),完成初步的工艺可行性设计,并且确定初步的关键工艺参数(Critical Process Parameter, CPPs)。同时积累初步的产品稳定性数据<sup>[5]</sup>。(2)在药品注册生产阶段,需要结合工艺研究开发积累的CQAs和CPPs,完成商业化规模生产工艺的性能确认与工艺验证;完成病毒去除/灭活工艺验证,在临床试验阶段申请时重在有效工艺步骤的初步验证。(3)在注册上市后,应完成工艺持续验证,进行上市后产品与临床样品的可比性研究,

防止上市后多批次生产后出现质量的“偏移”<sup>[6]</sup>。

根据国内外上市抗体的工艺控制经验,上游发酵培养工艺需要重点关注产品的异质体(如电荷异质性、糖基化修饰)等;下游纯化工艺更需要关注工艺验证的稳健性。

### 2.1 变异体的控制

通常来说,由于组成单抗可以被修饰的氨基酸较多,不同数量被修饰的氨基酸之间排列组合,使得单抗分子有近千万种变异体。单抗的变异体包括结构异质性(天冬酰胺脱酰胺化、谷氨酸焦谷氨酸环化、蛋氨酸的氧化作用、糖基化)、电荷变异体(脱酰胺、C端赖氨酸异质性、唾液酸化等)、分子大小变异体(氧化、聚集、片段化等)、疏水变异体(二硫键错配、氧化等)<sup>[7]</sup>。现有研究已经证实,变异体存在会影响体内药物代谢、生物学活性、免疫原性等。如果抗体的Fab段出现变异体(如CDR区域的天冬氨酸异构化),可影响到抗体与抗原的识别和结合。如果抗体恒定区(Fc段)出现变异体(蛋氨酸的氧化和糖基化修饰)可以影响抗体与Fc $\gamma$ R和C1q的识别和结合,从而影响到抗体活性的发挥<sup>[8]</sup>。末端半乳糖的存在可增强抗体的C1q亲和力和补体依赖的细胞毒性(Complement Dependent Cytotoxicity, CDC)活性,去岩藻糖化可以使得抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用(Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxicity, ADCC)活性增高<sup>[9]</sup>。

异质性会发生在抗体的全生命周期中,如在发酵过程中蛋白在细胞中翻译后修饰的糖基化,纯化过程中的氧化、脱氨酰等降解作用,储存过程中的聚集、片段化等降解作用。因此,抗体分子结构上存在的异质性和工艺复杂性,需要在工艺开发中加强工艺研究和验证,在检查中重点关注变异体的工艺控制。由于单抗品种的个体化差异,还需要根据情况,基于风险,制定case-by-case的研究策略。需要特别说明的,在生产工艺控制中,必须确保不同批次间变异体类型尽可能固定,并且不同种类的变异体比例相对不变。

### 2.2 工艺验证批次的稳健性

完整的工艺验证包括工艺设计阶段、工艺确认阶段和上市后的工艺持续验证<sup>[10]</sup>。为了缩减报批时间,大多数企业普遍不进行工艺特性研究和大规模差异性分析,直接进行商业化批量的工艺确认

阶段，缺少工艺设计阶段的基础研究，直接进行的工艺确认阶段的验证批次不能代表后续生产情况。因此，若缺乏对生产工艺的完整认识和控制，往往会导致工艺放大后稳健性不足的问题。某单抗药物在采用商业化规模工艺验证时发现，发酵规模放大后未处理原液中溶氧不足，导致二硫键无法正确组装，中间体非还原电泳纯度检查项目不合格<sup>[11]</sup>。

只有通过工艺验证，基于对生产工艺进行全面、深入的研究，深入了解单抗工艺参数对产品质量的影响，才能为后续工艺参数的调整预留足够的空间。工艺确认阶段，尽可能考察工艺最差条件，来确保拟上市工艺的稳健性。值得关注的是，工艺验证中除了进行放行项目检测及中间控制项目检测外，如果趋势研究发现变化时，还应当结合工艺研发时表征数据，对关键检测指标进行充分研究（如N/C端异质性、糖型分析、蛋白的高级结构等表征研究）。上市后的工艺持续验证，基于单抗品种全生命周期的考虑，进行各个阶段工艺及产品质量可比性研究，特别是上市后产品与临床样品的可比性研究，防止上市后多批次生产后出现质量的“偏

移”，保证工艺的稳健性。

### 3 检查策略中的一般考虑

#### 3.1 总体考虑

由于生物大分子的属性特性，不同于化学药品检查，在检查中除了应当关注抗体的产量和杂质残留控制，还需要重点关注抗体生物活性的工艺控制。检查中应当注意和化学药品的不同，进行检查策略的思维转变。采用“T”型检查策略，即基于体系的横向检查策略和基于品种的纵向检查策略。见图1。

横向体系方面包括质量管理体系、机构和人员系统、厂房与设施设备系统、物料系统、生产系统、实验室质量管理体系六个方面。纵向基于品种方面包括菌种发酵阶段（种子复苏、摇床发酵培养、逐级扩大发酵）、纯化阶段（澄清过滤、亲和层析、低pH病毒灭活、阴离子交换层析、阳离子交换层析、除病毒过滤、超滤浓缩换液、原液配液）、成品分装灯检包装阶段。

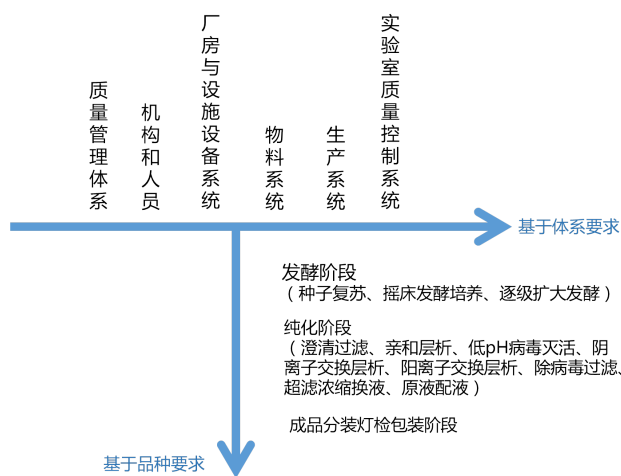


图1 “T”型检查策略

通过两个维度的检查，全面、系统地对单抗进行注册生产现场检查。每块系统的检查可以基于品种的风险点和企业的历史检查情况，突出重点，完成现场检查，最终确保注册检查的“四性”：真实性、一致性、可行性和GMP符合性<sup>[12]</sup>。

#### 3.2 基于体系的横向检查策略

##### 3.2.1 质量管理体系

重点关注产品的质量回顾，结合相关产品生产情况对变更控制、偏差管理、纠正和预防措施

（Corrective Action Preventive Action, CAPA）有效性、检验结果偏差（Out of Specification, OOS）处理进行重点检查，并通过相关趋势分析和数据的回顾对企业质量管理体系的运行情况做出评价。

重点通过偏差分析，了解生产中遇到不符合预期的突发事件时，质量管理体系的运行情况，具体包括偏差调查是否充分、是否找到引起偏差的根本原因以及是否采取有效的纠正预防措施。同时应当结合产品研发和工艺验证的相关数据，说明该偏差是否

对最终产品产生影响。重点关注重复发生的偏差。

重组单抗的产品质量高度依赖于制备工艺，要关注工艺变更，即使是工艺“微小”的改动，也可能影响到产品的质量，防止上市后多批次生产后出现质量的“偏移”。Sandoz公司发现利妥昔单抗和依那西普融合蛋白在2007–2010年质量属性的变化，两者在工艺变更前后，酸碱变异体和糖基化变异体有明显改变<sup>[13]</sup>。Samsung公司在研究2015–2019年曲妥珠单抗的质量工艺控制时，发现单抗的糖型发生变化，导致原研药的Fc $\gamma$ R IIIa结合力与ADCC效应出现偏移<sup>[14]</sup>。因此，应当重点检查已变更的内容，结合产品工艺开发时的研究数据，考察该变更是否为CPPs，变更的范围是否在工艺开发时的设计空间（Design Space）中，其变更对CQAs影响程度<sup>[15]</sup>。在变更前后，企业结合单抗品种工艺是否做了评估工作和具体研究。相关数据是否能支持变更合理性，必要时开展变更前3批样品和变更后3批样品原材料、生产工艺、质量控制、特征研究和稳定性研究等可比性研究（“头对头”比对研究）。

不同于化学品种，单抗品种在生产中影响因素较多，可变性也较多。为了减少批间差，质量体系应当重点考察相关指标，比如每一工序的收率和总收率波动变化、原液和成品检测中质量标准以外的关键检测表征回顾（如蛋白的C端氨基酸序列分析、高级结构、糖型分析）。从不同角度来考察减少批间差异，保证工艺能够持续稳定地生产出预定用途的单抗产品。

### 3.2.2 机构和人员系统

单抗企业机械化程度高，具体人员综合素质相对高。关键岗位人员基本都有海外科研和学术背景，专业能力强。因此在检查中，重点关注关键人员如质量管理、验证、生物检定人员在关键质量属性、技术转移、变更控制和偏差管理等方面的培训。参与病毒清除灭活验证应当由有病毒工作经验的人员和设计制定按比例缩小纯化工艺的生产人员共同完成。同时关注进入细胞库人员的授权管理情况、灯检人员工作能力和培训情况。

### 3.2.3 厂房与设施设备系统

重点关注是否有与发酵体积和纯化批量相适宜的生产系统。由于单抗企业在发酵和纯化中广泛地使用一次性配液袋，减少了共线污染的风险，需要重点关注中间品或产品和一次性配液袋相容性

的问题，避免析出物对产品的影响。同时，针对2000 L体积庞大的反应袋，重点考察混匀均一性和取样代表性问题。

下游纯化工艺中使用的亲和层析柱、阴离子层析柱、阳离子层析柱，需要考虑层析柱纯化方法、介质使用次数（即寿命）、层析柱清洁方法等是否已进行验证。应采用规模缩小模型模拟实际工艺条件，根据工艺性能（蛋白载量、回收率）和产品质量（纯度、工艺杂质残留）确认其使用寿命（最大使用循环）。同样也需要关注浓缩膜包的使用次数和清洁方式<sup>[16]</sup>。

由于单抗品种广泛地使用了一次性配液系统和无菌焊管机，在上游发酵阶段和下游纯化阶段无菌保障总体控制风险较小。需要重点关注纯化后原液配制的微生物控制策略。重点关注生产所用的器具、设备、不同洁净级别环境监控、培养基模拟灌装情况。

### 3.2.4 物料系统

重点关注物料流程管理（包括物料的采购、接收、贮存、检验、放行、发放、使用、退库、销毁）、供应商管理、物料标识、放行管理等方面。应当尽可能避免使用动物源性的原材料，任何动物源性的成分应当溯源并进行外源因子检查。

细胞库的建立是为了保证重组单抗生产的稳定性及批间一致性<sup>[17]</sup>。重点关注细胞库管理情况。部分单抗企业委托其他公司构建种子细胞，要关注冷链运输和审计放行情况。同一液氮罐中保存不同细胞库，应当有措施能够防止差错、混淆或者交叉污染。

发酵过程中使用的二氧化碳用于生产上游细胞培养液与料液直接接触、氧气用于生产上游细胞培养液与料液直接接触，需要关注气体的无菌控制策略。

单抗为蛋白制剂、为低温保存产品，应当重点关注中间品及成品储存时限和储存条件的控制措施。

### 3.2.5 生产系统

重点对生产过程参数控制、过程检测、生产现场管理及相关验证情况进行检查。关注原液及制剂的生产批量及其验证情况，关注生产过程中工艺参数控制及中控项目的检验情况。为了防止交叉污染，重点关注共线生产情况。关注生产排班有无交

替，避免同一个区域有不同批次产品生产，防止差错和混淆。应当按照《中华人民共和国药典》对生产终末细胞进行检定。

单抗工艺生产中重点关注CQAs和CPPs的风险评估，结合企业工艺特性研究（包括工艺参数的风险评估、缩小模型建立及工艺特性研究等），针对该品种的关键工序是否进行了工艺特征分析和工艺验证报告<sup>[18]</sup>。

关注工艺杂质去除效果验证，杂质包括产品相关杂质和工艺相关杂质<sup>[19]</sup>。前者包括聚体、降解产物、电荷异构体、疏水变体等，后者包括DNA残留、宿主细胞蛋白残留、胰岛素残留、Protein A残留、微生物限度、细菌内毒素、消泡剂残留、抗生素残留、其他工艺添加物残留等。重点关注杂质去除效果研究，生产过程中的工艺杂质是否在可接受范围内。

### 3.2.6 实验室质量控制系统

由于单抗的分子结构特点，生物学测定的结果波动范围比较大，具有可变性，决定了生物技术药物质量检测的特殊性。质量控制检测方法学验证和相关标准物质是生物药物质量标准的两个重要技术支撑点，完善的质量标准是保证生物药物安全与有效的必要条件。

方法学研究是生物技术药物质量控制研究的基础，应当重点关注分析方法从研发实验室转移到QC实验室的方法学验证，包括专属性、准确度、精密性、线性和范围、定量限、耐用性和系统适用性等<sup>[20]</sup>。有的企业生物活性测定方法验证不充分，色谱类方法验证时仅考虑主峰，而未对杂质峰的专属性、准确性、精密性、中间精密性、线性和范围进行验证；定量限仅采用信噪比的方式制定。考虑到生物测定的持续性和复杂性，除了上述的方法学验证项目外，还应当关注试验样品和对照品检测顺序的影响、样品冻融稳定性的影响和批间的精密性等。

标准物质是生物技术药物质量控制研究的另一基础，应当重点关注标准物质和参比品管理，包括制备、鉴定、接收、储存、领用、复验、稳定性考察等。其中均一性和稳定性是标准物质的关键。应当在参比品换批时基于统计学原则进行量值传递的验证统计。

制定标准时应当考虑单抗的特殊性。每个检测项目的标准范围的确定，应当考虑方法本身的误

差和工艺等影响因素，重点检查制定的标准范围是否基于大量的研究数据。

对实验室管理、取样、样品管理、样品检验等方面进行检查。关注中间品、产品检验结果，原液和成品的持续稳定性考察情况及趋势分析。由于稳定性研究包括原液、中间品、半成品和成品等各个阶段的产品，因此对于各个阶段的样品，所检测的项目有所不同，但是应当包括生物学活性、纯度和含量分析等内容。结合检验结果，关注关键质量属性的统计分析，包括蛋白浓度、分子排阻单体含量、阳离子交换色谱主成分峰和酸峰、毛细管凝胶电泳纯度等。同时关注企业委托检验情况和审计情况。

### 3.3 基于品种的纵向检查策略

一般单抗的生产工艺流程基本相似。不同品种所用的已筛选好的工程细胞种子不同，其后续的生产工序环节基本相同，仅所用的工艺参数不同。由于抗体在结构和理化性质上具有相似性，所以抗体的工艺可以有通用性平台工艺，一般分为三个阶段：发酵阶段、纯化阶段和成品分装阶段，见图2。

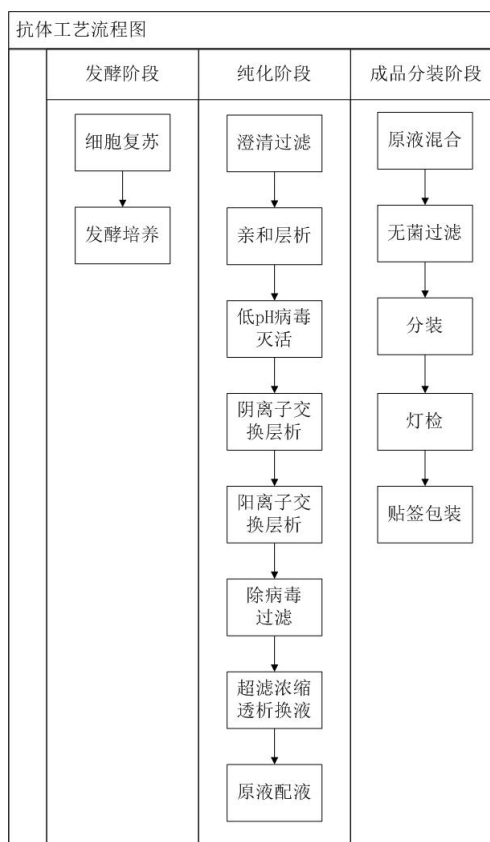


图2 抗体工艺流程图举例

### 3.3.1 发酵阶段

在品种研发阶段,已经筛选出表达稳定、生产稳定的细胞株和与之相适宜的培养基及发酵培养工艺。注册检查时为商业批次批量生产,因此,需要从细胞株和培养基两个角度对细胞复苏、发酵培养工序进行工艺核查。

#### (1) 种子复苏

工作代种子接种在适宜的培养基上,然后经过摇瓶培养、传代扩增培养,传代至规定代次和规模,获得浓度和体积都符合生产接种要求的种子培养液。

由于不同品种构建的细胞不同,该阶段应当重点关注细胞种子,包括种子谱系图、种子稳定性(包括生长稳定性、表达稳定性、遗传稳定性)、细胞工作种子的代次管理,即生产用种子代次应不超过批准用于生产的最高限定代次等。对于来源不同主种子批的工作种子,应考察细胞生长速率、倍增时间、群体倍增水平、抗体产量等,从发酵源头上进行控制,加强批间差异的研究。

关注菌种开启、接种、传代或细胞复苏(特别是水浴复苏)、培养、消化、分散等操作的无菌操作防污染措施及环境要求、培养条件(温度、pH、二氧化碳、溶氧等)符合工艺要求、细胞生长状态的观察。培养过程未添加任何动物源性成分。

#### (2) 发酵培养

动物细胞对培养环境比较敏感,其生长与表达水平容易受到环境参数影响,因此需要重点关注培养条件。应当结合早期工艺研究的补料研究,对商业化生产发酵工序的补料策略进行检查。生产用种子培养液按比例接种至大罐培养基发酵培养,根据细菌或细胞的生长特性在发酵过程中适当补充所需的营养物质,控制培养温度、搅拌速度、通气量、通气方式、罐压等,同时监控溶氧、pH、生长浓度等。培养过程需要取样检测活细胞密度、抗体浓度等,培养末期需要取样进行微生物限度检查。

该阶段影响抗体的表达量和变异体的形成,应当结合企业研发的CQAs和CPPs重点关注培养基配方及配制应与注册文件一致。由于大部分培养基为外购,应当重点关注外购培养基无菌和热原控制措施。在发酵培养中,重点关注接种培养、换液补料、过程取样等操作的防污染措施及环境要求,培

养条件和注册规程一致,例如接种时的细胞密度及生长状况、接种比例(接种细胞浓度和接种体积)、培养温度、pH、溶氧(DO)、搅拌转速、培养时间等参数。有报道显示在2000 L的培养中pH是CPPs,影响酸性变异体的形成<sup>[21]</sup>。

为了关注培养曲线及收获期时的细胞生长状态,重点检查细胞培养时间和培养浓度的情况。同时重点关注细胞收获阶段时单抗的收获纯度。在诱导细胞表达抗体时,往往添加诱导剂。现场检查时关注添加诱导剂时细胞浓度是否达到要求,加入的诱导剂是否在合适的浓度范围内。重点关注添加后温度转换后的培养温度、温度转换的时间间隔。同时关注细胞培养发生污染事件的偏差调查。

### 3.3.2 纯化阶段

纯化的目的是将抗体和杂质(工艺相关杂质、产品相关杂质)相分离,且将潜在的内源病毒样颗粒和外源病毒进行灭活去除,最终得到高纯度、低潜在危害的产品。其中工艺相关杂质包括宿主细胞蛋白、宿主细胞核酸、亲和蛋白A层析柱脱落的配基、内毒素、培养基、培养过程添加物(胰岛素、消泡剂等)、细胞碎片等;产品相关杂质包括聚集体、降解片段、变异体(电荷变体、疏水变体)等。

#### (1) 澄清过滤

该工序主要作用为固液分离,将细胞和细胞碎片从培养液中去除,为后续纯化步骤做基础。重点关注深层过滤的材质、孔径、过滤时的压力保持和过滤时间。关注深层过滤器是否为重复使用,引起交叉污染。关注固液分离过滤器吹气收集残留液的步骤和过滤收集液中杂质的监控方式。关注载量、过滤流速和过滤压力。

#### (2) 亲和层析

抗体工艺采用蛋白A亲和层析进行抗体捕获分离,即收获液直接上样,合适的缓冲液(高盐或偏酸性)预洗后,酸性条件下洗脱结合的抗体,去除培养基成分、培养时添加物、宿主细胞蛋白(HCP)、宿主细胞核酸及潜在病毒。

该工序上样时,重点关注上样载量、上样流速(保留时间)和上样温度等。冲洗时,重点关注冲洗液pH、电导、冲洗体积等。洗脱时,重点关注洗脱液pH和洗脱终点的判定。同时关注蛋白A配基脱落的后续检验及填料的使用次数(即寿命)。

### (3) 低pH病毒灭活

目前单抗所用的细胞株主要有鼠源的CHO、SP2/0和NS0细胞株,都可能携带鼠源性的病毒等外源因子的污染,特别是自身携带的逆转录病毒<sup>[22]</sup>。通常病毒验证至少要求两个稳健且不同机制的除病毒步骤保证内源性病毒的清除,如使用低pH病毒灭活和纳米膜过滤等。低pH病毒灭活工序需要结合病毒灭活工艺验证,考虑生产时病毒灭活的pH和灭活时间等。值得注意的是,当生产或纯化过程有显著改变时,如采用新工艺、被灭活的中间品组成成分或pH发生改变时等,应当考虑该变更对病毒清除的影响,必要时需要对病毒清除灭活方法进行再验证。同时需要关注该酸性环节的pH对病毒灭活容器特别是近年来广泛使用的一次性袋子的相容性问题,避免析出物对产品的影响。

### (4) 阴离子交换层析

离子层析柱是用精细纯化方法进一步去除宿主细胞蛋白、核酸、脱落蛋白A、聚集体、片段和变体等杂质,达到工艺设计的纯度范围。一般先为阴离子交换层析,再进行阳离子交换层析。

需要考虑层析柱纯化方法(柱效、柱高)、介质使用次数(即寿命)、层析柱清洁方法等应进行验证。由于阴离子交换层析需要的是流穿液,相对阳离子交换层析简单,需重点关注样品的pH、电导率和上样载量。

### (5) 阳离子交换层析

需要重点关注装柱的填料批号、清洁后未使用时层析柱的微生物和内毒素的控制和使用寿命。上样时,上样载量是否超过最大吸附能力,样品的酸性成分比例、pH和电导率是否在合格范围内。洗脱时,重点关注洗脱液的pH和电导率,如果过高,会引起抗体聚集影响后序的纳米膜过滤工序。同时重点关注收集洗脱液的起点和终点。该步骤反映企业在工艺控制中对收率和纯度的取舍平衡点,因此需要关注工艺批间差。

### (6) 除病毒过滤

纳米膜过滤是通过膜过滤的原理达到病毒的清除,一般采用孔径小于20 nm的纳滤来清除有包膜或无包膜的病毒。病毒的清除率与模型病毒分子大小相关。因此,需要重点关注去病毒过滤滤膜的孔径,过滤时压力差监测和流速、过滤蛋白浓度、过滤温度等。工艺变更后,考察变更的工艺对纳

膜过滤病毒的影响。

### (7) 超滤浓缩透析换液

需要重点关注超滤浓缩工艺的膜包孔径、压力、流速等。透析换液需要关注透析液体积、换液次数和收集方式。

### (8) 原液配液

对于大多数抗体品种,企业在原液配制时候已经加入半成品配制时候所需要的各种辅料,如稳定剂、表面活性剂等。因此,在该工序中需要考虑均匀性的控制。同时,部分企业通过打开一次性配液袋上端的开口,进行敞口操作,需要关注该工序的微生物控制措施等,为后续工艺降低微生物负荷。

## 3.3.3 成品分装灯检包装阶段

### (1) 原液混合分装

混合时,部分单抗原液是-70℃冷冻,需要提前放置于2~8℃进行化冻。需要关注化冻后的多个原液袋和半成品袋多次对接时的无菌控制措施。同时,考察半成品袋的混匀均一性情况,如搅拌体积、搅拌环境温度、搅拌转速、搅拌时间等。

无菌过滤时,关注配制区的动态环境监测结果,如悬浮粒子、沉降菌、浮游菌和表面微生物。应关注过滤器的灭菌、除菌过滤参数以及除菌过滤耗时等,还应关注产品与滤芯的兼容性以及滤芯的细菌截留能力;除菌前产品中的生物负荷应控制在规定的范围内;滤芯在除菌过滤后应进行完整性检测。

分装时,应关注灌装速度、灌装时间等。同时应关注共线分装产品的污染和交叉污染,如共用管道的清洁验证。是否根据风险评估,基于毒理评价确定产品特定的日允许暴露量(PDE)数值,作为清洁验证产品残留限度。清洁验证限度设定是否考察了回收率和最难清洁部位等。

### (2) 冻干(或无)

冻干剂型是生物技术药物的基本剂型之一。为了保证冻干前后单抗活性在工艺设计范围内,冻干工艺应经过验证,产品冻干曲线应与验证的工艺一致。关注分装后半加塞产品转移至冻干机以及冻干后产品转移至轧盖机的无菌保证措施,特别应关注人工转运的防污染措施。

### (3) 灯检

注意对不合格品的类型分类,如黑点、纤毛、玻璃碎屑、胶塞和装量等,以便于后续追溯。

#### (4) 贴签包装

由于单抗品种多为低温储存,应当重点关注操作时间和温度以及产品脱冷链时间验证等。

#### 4 结语

单抗在部分疾病的治疗效果和副反应上明显优于化学药品,目前单抗已经成为国内外生物制品企业研发注册的热点。但是,我国产业发展与国外现状相比仍然有显著差距。国内单抗企业发展不仅存在“高水平重复”的集中申报的情况,还存在同品种各企业控制上参差不齐的现象。单抗企业未来发展短期取决于品种的潜在成长性及品种的竞争力,长期取决于该企业单抗品种的工艺稳健性和质量可控性。

因此,统一检查标准对抗抗的开发与评价具有重要的意义。一方面,明确单抗检查重点,在品种研发阶段指导企业按照法规进行扎实的基础研究,从设计源头上进行培育,避免企业走弯路,降低产品生产和工艺变更的风险,促进行业整体提升。另一方面,借鉴欧美发达国家对于单抗的检查经验,结合国内行业发展现状,统一监管尺度,促进相关法律法规和指导原则的出台,保证单抗品种上市后安全、有效和质量可控。

#### 参考文献:

- [1] 高凯,徐志凯,任跃明,等.关于我国药典单克隆抗体类生物治疗药物总论的思考[J].中国生物工程杂志,2014,34(1):127-134.
- [2] 王兰,朱磊,徐刚领,等.单克隆抗体类生物治疗药物研究进展[J].中国药学杂志,2014,(23):2058-2064.
- [3] 刘伯宁,罗建辉.关于创新型抗体药物药学评价的思考[J].药学学报,2017,52(12):1811-1819.
- [4] 王军志.生物技术药物研究开发和质量控制[M].第三版.北京:科学出版社,2018.
- [5] Alt N, Zhang TY, Motchnik P, et al. Determination of Critical Quality Attributes for Monoclonal Antibodies Using Quality by Design Principles[J]. Biologicals, 2016, 44: 291-305.
- [6] Ramanans S, Grampp G. Drift, Evolution, and Divergence in Biologics and Biosimilars Manufacturing[J]. Bio Drugs, 2014, 28(4):363-372.
- [7] Koziowski S, Swann P. Current and Future Issues in

the Manufacturing and Development of Monoclonal Antibodies[J]. Adv Drug Delivery Revs, 2006, 58: 707-722.

- [8] Imai-Nishiya H, Mori K, Inoue M, et al. Double Knockdown of alpha 1,6-fucosyltransferase(FUT8) and GDP-mannose 4,6-dehydratase(GMD) in Antibody-producing Cells: A New Strategy for Generating Fully Non-fucosylated Therapeutic Antibodies with Enhanced ADCC[J]. BMC Biotechnology, 2007, 7: 84.
- [9] Davies J, Jiang L, Pan LZ, et al. Expression of GnTIII in a Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression of Antibodies with Altered Glycoforms Leads to An Increase in ADCC Through Higher Affinity for FC Gamma RIII[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2001, 74: 288-294.
- [10] 李敏,郭秀侠,刘伯宁.关于生物制品工艺验证的审评实践与思考[J].中国生物制品学杂志,2017,30(6):664-672.
- [11] 刘伯宁,徐刚领,罗建辉.关于我国单抗药物上市阶段药学评价的思考[J].药学学报,2019,54(11):2126-2134.
- [12] 中华人民共和国卫生部.卫生部令第79号 药品生产质量管理规范(2010年修订)[EB/OL].(2011-01-07)[2020-06-04].http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0053/58500.html.
- [13] Schiestl M, Stangier T, Torella C, et al. Acceptable Changes in Quality Attributes of Glycosylated Biopharmaceuticals[J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(4):310-312.
- [14] Kim S, Song J, Park S, et al. Drifts in ADCC-related Quality Attributes of Herceptin(R): Impact on Development of A Trastuzumab Biosimilar[J]. MAbs, 2017, 9(4):704-714.
- [15] Hakemeyer C, McKnight N, St John R, et al. Process Characterization and Design Space Definition[J]. Biologicals, 2016, 44: 306-318.
- [16] 上海医药行业协会,上海药品审评核查中心. T/SHPPA 005-2019 人用重组单克隆抗体制品生产通用技术要求[S].2019.
- [17] Rawat R. Regulatory Consideration for Biotechnology Products: Clonality of the Production Cell Bank[R]. Vienna: Informa Life Sciences Annual Cell Line Development and



- Engineering Conference, 2016.
- [18] Li F, Hashimura Y, Pendleton R, et al. A Systematic Approach for Scale-down Model Development and Characterization of Commercial Cell Culture Processes[J]. *Biotechnol Prog*, 2006, 22: 696-703.
- [19] Rogstad S, Faustino A, Ruth A, et al. A Retrospective Evaluation of the Use of Mass Spectrometry in FDA Biologics License Applications[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2017, 28: 786-794.
- [20] Prior S, Hufton SE, Fox B, et al. International Standards for Monoclonal Antibodies to Support Pre- and Post-marketing Product Consistency: Evaluation of A Candidate International Standard for the Bioactivities of Rituximab[J]. *MAbs*, 2018, 10: 129-142.
- [21] Xing ZZ, Kenty BM, Li ZJ, et al. Scale-up Analysis for A CHO Cell Culture Process in Large-scale Bioreactor[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 103 (4): 733-746.
- [22] Minor P, Berthold W. Safety of Biological Products Prepared from Mammalian Cell Culture: Detecting Viruses in Cell Banks[J]. *Dev Biol Stand*, 1998, 93: 129-140.

(收稿日期 2020年4月17日 编辑 王雅雯)