

## · 研究进展 ·

## 单克隆抗体颗粒表征的现状与挑战

郭莎<sup>1#</sup>, 贾哲<sup>1,2#</sup>, 吴昊<sup>3\*</sup>, 王兰<sup>1\*</sup> (1. 中国食品药品检定研究院, 卫生部生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 北京 102629; 2. 烟台大学药学院, 烟台 264005; 3. 沈阳药科大学制药工程学院, 沈阳 110016)

**摘要:** 随着生物技术的快速发展, 治疗性单克隆抗体已成为生物技术药物中增长最快速的部分, 也成为临床医疗的重要组成部分, 并不断为患者提供创新的治疗选择。单克隆抗体中的颗粒物是影响药物安全性和有效性的重要因素。本文论述了近年来单克隆抗体药物药典监测要求、重要的检测技术及各自应用范围、在药物研发不同阶段的监测考虑及对颗粒进行全面表征与重点表征中存在的挑战, 探讨了微粒控制的发展趋势、存在的难点及在药物安全性监测中可能的应用前景。

**关键词:** 单克隆抗体; 颗粒; 亚可见颗粒; 颗粒计数; 颗粒表征; 安全性

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)02-0161-09

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.02.008

### Current Status and Challenges of Particle Characterization in Monoclonal Antibody Formulation

Guo Sha<sup>1#</sup>, Jia Zhe<sup>1,2#</sup>, Wu Hao<sup>3\*</sup>, Wang Lan<sup>1\*</sup> (1. National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of the Ministry of Health for Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China; 2. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 3. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** With the rapid development of biotechnology, therapeutic monoclonal antibodies have become the fastest growing part of biotechnology drugs, and have become an important part in clinical therapeutics, and constantly provide innovative treatment options for patients. Particulate matter in monoclonal antibody formulations is an important factor affecting safety, and constantly efficacy of drugs. Pharmacopoeia monitoring requirements of monoclonal antibody drugs, the important testing techniques and their respective application scope in biopharmaceuticals, the monitoring considerations at different stages of drug development and the challenges existing in the comprehensive characterization and key characterization of particles in recent years were discussed. The development trend, existing difficulties and possible application prospect in drug safety monitoring of particle control were also discussed.

**Keywords:** monoclonal antibody; particle; sub-visible particle; particle quantification; particle characterization; safety

基金项目: 2020年国家药品标准提高项目课题—眼用注射剂的不溶性微粒检测(编号 2020S11)

作者简介: 郭莎 Tel: (010) 53852177; E-mail: guoapt@163.com

并列第一作者: 贾哲 Tel: (010) 53852199; E-mail: jiajia123163@163.com

通信作者: 王兰 Tel: (010) 53852159; E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

吴昊 Tel: 13904221830; E-mail: haowu@syphu.edu.cn

## 1 单克隆抗体颗粒检测的意义

单克隆抗体（以下简称单抗）作为治疗癌症、自身免疫性疾病和慢性炎症性疾病等发展最迅速药物类别，因其对靶向抗原的高度特异性日益受到人们的关注<sup>[1-2]</sup>。单抗药物在储存、运输以及使用过程中因经受应力形成聚集体和不溶性微粒，不溶性微粒是指不溶于注射液的、肉眼不可见的、非代谢性的颗粒杂质，粒径通常小于50  $\mu\text{m}$ 。蛋白质聚集体和不溶性微粒不具有治疗作用，还会诱发抗药抗体产生，直接影响蛋白质药物药效。更重要的是，不溶性微粒通过注射进入人体后有极大可能会引起不良反应，如刺激血管内壁，引起静脉血管光滑度改变，导致血小板黏附，引起静脉炎；较大的微粒可直接造成局部循环障碍，也可引起血管栓塞、供血不足、血栓、局部组织坏死等疾病，若沉积到心、肺、肝、肾等重要器官均有严重危害，其并发症可导致患者死亡<sup>[3-4]</sup>。根据《国家药品不良反应监测年度报告（2020年）》显示，从1999年到2020年，不良反应报告量呈逐渐增长趋势，2020年已达167.6万份。据统计，2020年因注射给药发生

的不良反应和不良事件的报告量占总量的56.7%，其中静脉注射给药占到91.1%，目前单抗药物几乎全部为注射给药，从用药途径统计来看具有较高安全风险。此外，针对100种单抗的统计发现，单抗用药的不良反应发生也较普遍，如利妥昔在B细胞淋巴瘤治疗过程中，有近一半的患者在首次用药时会有过敏反应<sup>[5]</sup>；14.5%的患者在输注西妥昔时会发生严重的输液反应<sup>[6]</sup>；12.3%的英夫利西使用者也会有输液反应，多次输注后，50%的患者体内产生了中和抗体<sup>[7]</sup>，某抗PD-1单抗单药治疗的所有级别的不良反应发生率甚至达93.8%。不良反应的追溯调查中，往往存在颗粒物异常升高的现象，可见单抗中不溶性微粒与其安全性和有效性息息相关，同时也能够体现单抗药物生产工艺的稳定性以及制剂处方的合理性。

## 2 颗粒的分类及各国药典要求

《美国药典》（United States Pharmacopoeia, USP）根据颗粒大小对颗粒物进行了分类，如图1所示<sup>[8]</sup>。

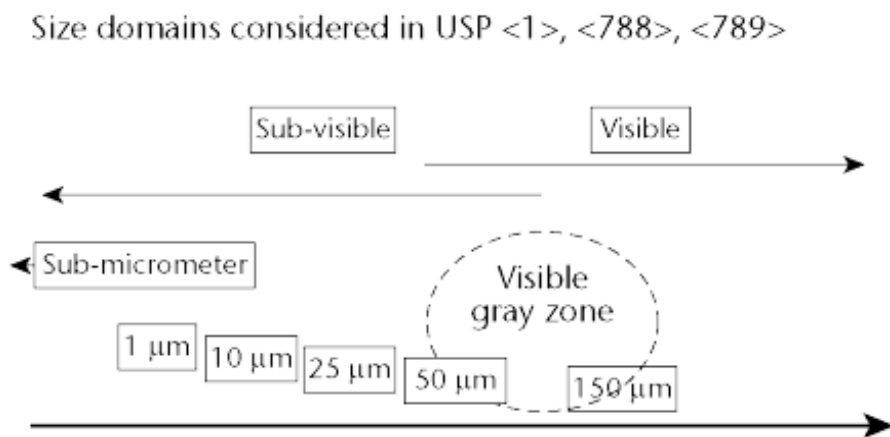


图1 USP中颗粒大小分类

<100 nm的颗粒为纳米颗粒，100~1000 nm（100~1000 nm是指 $\geq 100$  nm且<1000 nm，下同）的颗粒为亚微米颗粒，1~100  $\mu\text{m}$ 的颗粒为亚可见颗粒，即不溶性微粒， $\geq 100$   $\mu\text{m}$ 的颗粒为可见颗粒。根据来源不同，单抗制剂中的颗粒可分为内源性、外源性和固有性颗粒。内源性不溶性微粒一般来自于制剂本身、包材或生产过程，如胶塞上脱落的碎片、预充针的硅油涂层和玻璃碎片等。在单抗

的生产工艺中也会引入内源性颗粒，如在灌装过程中，柱塞泵表面会脱落金属氧化物颗粒，蠕动泵的管材在灌装过程中会脱落塑化剂进入到制剂中。外源性颗粒则与产品成分及生产过程无关。固有性颗粒来自药物活性成分或关键辅料，如蛋白质聚集体及与表面活性剂胶束形成的颗粒。除此之外，不溶性微粒也可根据其可逆性、构象、化学修饰和形态等方面进行更为详细的划分<sup>[9]</sup>，见表1。

表1 根据微粒的性质分类

性质	分类
可逆性	可逆；不可逆；可分离的；生理条件下可分离；特定条件下可分离
二级/三级结构	天然；部分展开；完全展开；无序；淀粉样
共价键修饰	交联；还原型交联；非还原型交联；分子内修饰；氧化；脱酰胺；无修饰
形态	单体亚基的数量；纵横比；表面粗糙度；内部形态；光学性质；透明度；均匀度

《中国药典》(Pharmacopoeia of the People's Republic of China, ChP)、USP、《日本药局方》(Japanese Pharmacopoeia, JP)、《英国药典》(British Pharmacopoeia, BP)和《欧洲药典》(European Pharmacopoeia, EP)对注射剂中不溶性微粒均规定了检测方法和限定标准。自2010年起,ChP2010对微粒的限定与USP32、JP15、BP2008、EP6.0基本保持一致。ChP2020和同期各国药典对注射液中不溶性微粒的限定标准,见表2。

表2 各国药典对注射液中不溶性微粒的限定标准

药典	类别	第一法:光阻法		第二法:显微计数法	
		$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$	$\geq 10\mu\text{m}$	$\geq 25\mu\text{m}$
ChP2020	大容量注射剂 ( $\geq 100\text{mL}$ )	$\leq 25$ 粒/mL	$\leq 3$ 粒/mL	$\leq 12$ 粒/mL	$\leq 2$ 粒/mL
	小容量注射剂 ( $< 100\text{mL}$ )	$\leq 6000$ 粒/容器	$\leq 600$ 粒/容器	$\leq 3000$ 粒/容器	$\leq 300$ 粒/容器
USP42-NF37	大容量注射剂 ( $> 100\text{mL}$ )	$\leq 25$ 粒/mL	$\leq 3$ 粒/mL	$\leq 12$ 粒/mL	$\leq 2$ 粒/mL
	小容量注射剂 ( $\leq 100\text{mL}$ )	$\leq 6000$ 粒/容器	$\leq 600$ 粒/容器	$\leq 3000$ 粒/容器	$\leq 300$ 粒/容器
JP18	大容量注射剂 ( $\geq 100\text{mL}$ )	$\leq 25$ 粒/mL	$\leq 3$ 粒/mL	$\leq 12$ 粒/mL	$\leq 2$ 粒/mL
	小容量注射剂 ( $< 100\text{mL}$ )	$\leq 6000$ 粒/容器	$\leq 600$ 粒/容器	$\leq 3000$ 粒/容器	$\leq 300$ 粒/容器
BP2020	大容量注射剂 ( $> 100\text{mL}$ )	$\leq 25$ 粒/mL	$\leq 3$ 粒/mL	$\leq 12$ 粒/mL	$\leq 2$ 粒/mL
	小容量注射剂 ( $\leq 100\text{mL}$ )	$\leq 6000$ 粒/容器	$\leq 600$ 粒/容器	$\leq 3000$ 粒/容器	$\leq 300$ 粒/容器
EP10.0	大容量注射剂 ( $> 100\text{mL}$ )	$\leq 25$ 粒/mL	$\leq 3$ 粒/mL	$\leq 12$ 粒/mL	$\leq 2$ 粒/mL
	小容量注射剂 ( $\leq 100\text{mL}$ )	$\leq 6000$ 粒/容器	$\leq 600$ 粒/容器	$\leq 3000$ 粒/容器	$\leq 300$ 粒/容器

注射剂中不应存在肉眼可见的颗粒，USP <787>和<788>都推荐使用光阻法（Light Obscuration, LO）进行亚可见颗粒的检测。尽管其有样品处理简单、适用范围广等诸多优势，光阻法仍具有一定的局限性，如样品用量大且不可重复利用，很可能会低估蛋白类不溶性微粒的数量等<sup>[10]</sup>。在ChP、USP <788>、EP 2.9.19中还指出使用显微计数法进行颗粒检测。显微计数法是将一定体积的供试液滤过，使所含不溶性微粒截留在微孔滤膜上，在100倍显微镜下，根据过滤面积上所得微粒总数，计算出不溶性微粒的含量。但目测的准确度有限，与光照条件、目测距离和检测者眼睛的敏锐度等因素有关<sup>[11-12]</sup>。

USP <787>和EP 2.9.19对注射用蛋白质药物中有阻塞血管风险的 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的颗粒有明确的规定和要求。但很多研究人员证明 $1\sim 10 \mu\text{m}$ 亚可见的蛋白质颗粒是免疫原性最强的一类不溶性微粒<sup>[13]</sup>，此外，蛋白质受到外界应力，如温度

变化、运输和药品的管理过程中的剪应力等可以使蛋白质变性形成蛋白质颗粒，并随着时间的推移而逐步积累<sup>[14-16]</sup>，由小粒径微粒动态聚集成大粒径微粒。可见， $1\sim 10 \mu\text{m}$ 范围内的亚可见蛋白质颗粒与 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的蛋白质颗粒相比，更有可能影响产品在保质期内的安全性和有效性。虽然各国药典对于 $< 10 \mu\text{m}$ 的亚可见颗粒的含量目前还没有法定规定，也缺乏对治疗性蛋白质产品进行此范围内的微粒检测的建议<sup>[14]</sup>，但也需要增加技术储备，了解和运用不同检测技术，对各个粒径范围的微粒进行表征并积累数据。

### 3 颗粒的表征方法介绍

尽管不同研究人员提出的颗粒范围有所不同，但普遍认为，没有一种技术可以覆盖所有颗粒检测范围。如图2<sup>[13]</sup>所示，说明了一些分析技术和它们可行性范围。颗粒的种类复杂，分类较广。以粒径大小分类，以 $1 \mu\text{m}$ 为分界，可以将颗粒的表征方法分为亚微米颗粒及微米级颗粒的表征。

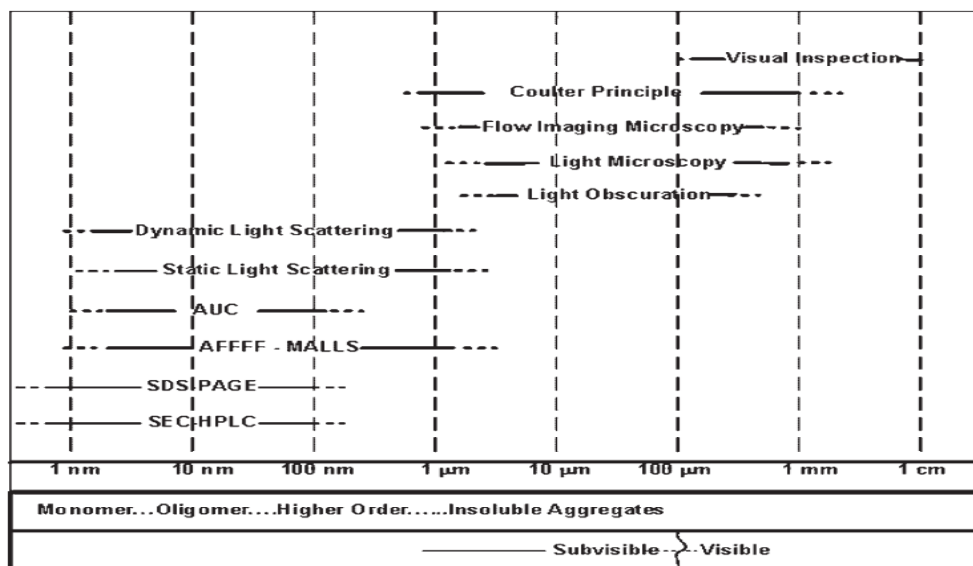


图2 颗粒检测的分析技术和适用范围

#### 3.1 亚微米级颗粒（ $0.1\sim 1 \mu\text{m}$ ）的检测

粒径在 $0.1\sim 1 \mu\text{m}$ 的颗粒称为亚微米颗粒。此范围的粒子粒径较小，考虑到颗粒散射光角度分布特征以及粒径、折射率等参数对散射光分布特点的影响，通过常规的光学方法较难精准地检测，可根据粒子的布朗运动、物理和化学分离等方法对颗粒进行表征。

动态光散射（Dynamic Light Scattering, DLS）

技术是一种基于粒子的布朗运动导致光强的波动来测定 $1 \text{ nm}\sim 1 \mu\text{m}$ 范围内粒径分布的非破坏性检测技术。该技术一般用于蛋白质药物初步稳定性研究，没有分离筛选能力。此外，DLS响应受溶液条件和蛋白质浓度影响，也不能区分颗粒类型<sup>[17]</sup>。如果样品中存在一些较大颗粒，或者试剂溶液对粒子不能很好地分散，会导致测量数据无法反映真实情况。

场流分离技术 (Field Flow Fractionation, FFF) 是基于流动的分选方法将大分子、胶体或微粒分离的技术, 可分为对称流场分离和非对称流场分离。非对称流场分离通用且广泛使用, 为生物聚合物和生物颗粒表征提供了强大的分离方法。该技术具有分离范围广 (几纳米到几十微米)、无固定相、很少与样品非特异性结合等优点, 但该技术定量不准确、需优化参数较多、操作复杂、无法区分等效球粒径相同形状不同的聚集体或颗粒。

分析超速离心 (Analytical Ultra Centrifuge, AUC) 的原理是在高速旋转产生的强大的离心力作用下, 不同分子在溶液中因沉降系数不同呈现出不同的沉降过程, 由分析超速离心的控制系统实时扫描, 并根据扫描所取得的数据计算出分子的特性, 是表征大分子沉降行为和溶液中聚集体存在的有力技术。AUC的主要优点之一是蛋白质样品可以在相关解决方案 (例如其制剂缓冲液) 中无需对样品前处理而进行表征, 减少了由样品制备、稀释或基质效应引起的样品中聚集体的形成或解聚。FFF和AUC目前被用作定量寡聚物的补充技术<sup>[18]</sup>, 如Jun Fukuda等<sup>[19]</sup>提出将中空纤维流场流分离技术作为评估单抗样品中聚集体含量的补充技术, 并对体积排阻色谱技术和中空纤维流场流分离技术性能进行了比较研究, 证明二者之间的互补性以及它们被用作蛋白质药物表征和质量控制方法的可行性。对于

100~1000 nm尺寸 (亚微米范围) 的颗粒的评估, 可以使用纳米颗粒跟踪分析 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) 和共振质量测量 (Resonant Mass Measurement, RMM) 检测。NTA是一种整合了激光光散射显微镜和视频成像系统能够测量溶液中单个颗粒并报告尺寸和样品中颗粒浓度的技术。NTA具有30~1000 nm的检测范围, 但样品折射率特性会使这个范围更小一些。就浓度而言, NTA可检测每毫升 $10^7\sim 10^9$ 个颗粒, 且根据追踪单个粒子布朗运动轨迹, 计算出扩散系数和等效球直径。与动态光散射一样, 结果容易受到溶液的折光率和较大颗粒影响使检测结果有较大偏差, 影响数据重复性。在RMM检测中, 颗粒在其自然悬浮液中通过微电子机械系统制造的机械共振的微流体通道运动, 当单独的粒子通过传感器时, 粒子的存在增加了总质量, 导致了传感器的共振频率偏移。RMM的检测量程在 $0.2\sim 2\ \mu\text{m}$ , 为区分蛋白质和硅油提供了一个极好的工具。例如, 在图3<sup>[20]</sup>中, 密度大于悬浮缓冲液的聚集体, 是用频率轨迹中的负峰值来表示。硅油的密度比缓冲液的密度低, 在频率轨迹上形成正峰值, 硅油的存在降低了传感器的整体质量, 从而提高传感器的共振频率形成正峰值。根据峰变化频率和个数, RMM可以提供每组检测样品的粒径分布情况和颗粒特征。

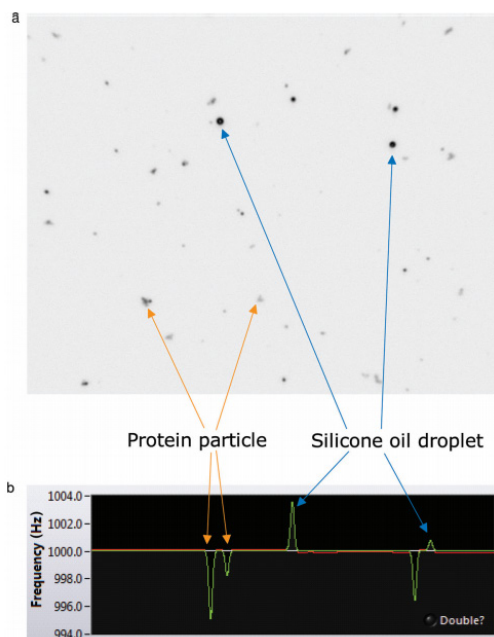


图3 RMM区分蛋白质聚集体和硅油液滴能力的展示

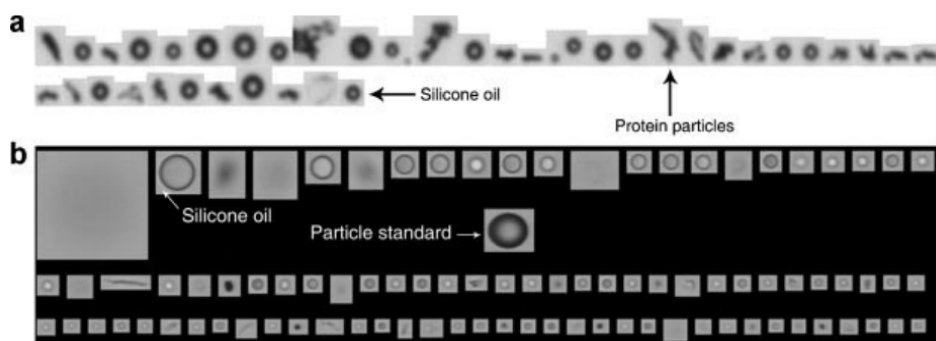
### 3.2 微米级颗粒 (> 1 μm) 的检测

分析微米范围内的“亚可见颗粒”的主要方法包括基于光阻原理开发的粒径测量方法、基于光学显微技术的图像分析方法和基于电阻测量的库尔特颗粒计数方法。

USP <787>和<788>都推荐使用LO进行亚可见颗粒的检测。LO是当一定体积的供试液通过一窄小的检测区时，与液体流向垂直的入射光被供试液中的微粒阻挡而减弱，导致传感器输出的信号降低，这种信号变化与微粒的截面积大小相关，再根据通过检测区供试液的体积，计算出每1 mL供试液中所含不溶性微粒数。作为注射液控制不溶性微粒的首选方法，LO可以分析1~300 μm的颗粒，具有操作简单、过程快速和中高通量等优点。但是LO也有一些局限性，比如无法对硅油、气泡、蛋白质聚集形成的颗粒和外部引入的颗粒进行区分，还有可能因为溶液折光率变化（如引入较大气泡）导致偏高计数。若颗粒的透明度很高，还有可能造成偏低计数。此外，LO测定高浓度蛋白质溶液时也易因颗粒

堵塞入射光束或超过检测限出现误差。若是能找到与介质存在微小折射率差异的校准物质，就能提高LO技术在定量分析蛋白质溶液中颗粒含量方面的准确性。

随着流动成像技术的发展，人工光学显微镜技术得到了改进。例如微流成像（Micro Fluid Imaging, MFI）、流动粒子成像分析仪（Flow Particle Imaging Analyzer, FPIA）和新型数字流式细胞摄像系统（FlowCAM）等仪器，使用与图像处理系统耦合的流通式显微镜组合，以实现分析和检测液体样品中颗粒的浓度和尺寸。由于被检测样品不需要进行任何预处理，避免了样品过滤和分离的操作对实际检测结果的影响。不同于LO，显微镜技术还为1~300 μm的颗粒提供颗粒参数和图像，从而帮助区分样品中硅油液滴、气泡和外源颗粒。用两种仪器（MFI和FPIA）获得的图像<sup>[13]</sup>显示，用于校准仪器的标准粒子、硅油液滴和蛋白质颗粒的图像不同，详见图4。



a 是 MFI 的代表性粒子图像；b 是 FPIA 的代表性粒子图像。

图 4 用两种不同的流动显微镜仪器获得的亚可见颗粒图像

库尔特原理（Coulter Principle）是另一种定量分析亚可见颗粒的方法，基于库尔特原理的技术方法亦被称为电阻法、电脉冲法或电感应技术，主要利用微颗粒随导电液体通过电敏感区时形成的脉冲信号来测量颗粒尺寸和数量（或频度）。这种技术是测定稀释导电液体中绝对颗粒数。根据制剂的缓冲特性和单抗制剂浓度，必要时需要通过稀释或添加电解质来改变样品的离子浓度才能测定。在应用库尔特原理进行颗粒分析时，受颗粒几何特征影响，形状越不规则，样品分析的结果越复杂、误差越大。综上，不同技术测得的颗粒水平差异较大，

对于分析含有多种不溶性微粒的样品，使用光学和形态学等技术来确定颗粒组成是有必要的。

## 4 在药品全生命周期中对单抗颗粒的监管考虑

与其他药物制剂一样，单抗制药企业应有一定的控制级别反映产品质量的潜在风险，同时也应有必要的检测方法监控工艺和制剂中存在风险的微粒。颗粒的特征信息越全面，越有利于产品安全性和有效性的评估和监控。通过对生物制剂中颗粒监控，积累颗粒相关研究经验和基础，对制剂研发、生产和监管进行优化，从而提升药物的安全性和有

效性。

#### 4.1 早期开发

单抗的早期开发阶段，在候选分子的筛选过程中，除了考虑其药效和稳定性，还应该评估单抗分子后期是否存在容易形成不溶性微粒的风险。单抗的稳定性很容易受到多种因素的影响，如单抗中的氨基酸序列（亲疏水位点的位置）、配方中的离子强度、pH值和表面活性剂会影响单抗分子间的作用力（排斥或吸引）；制剂的类型也会影响不溶性微粒在最终制剂的浓度，如复溶冻干粉针后，会产生大量不溶性微粒，因此，需要对冻干工艺进行优化，以减少不溶性微粒的形成；单抗制剂与包材的兼容性也极大程度影响制剂中不溶性微粒的含量，如单抗制剂可能与预充针上的硅油相互作用，影响单抗的稳定性，在轻微的外界应力刺激下，会形成大量硅油和蛋白质硅油不溶性微粒<sup>[21]</sup>。除此之外，胶塞、承装容器材质等都会与单抗制剂直接接触，有一定风险产生不溶性微粒<sup>[22]</sup>。因此，在单抗制剂的早期开发过程中，研发人员应该考虑单抗分子可能在制剂和管理过程中产生不溶性微粒的因素，尽量避免不溶性微粒的产生。

#### 4.2 后期开发

在这一阶段，重点是了解产品不同批次之间的可比性，以及颗粒结果与配方、制造和使用等因素之间的关联性，如应监测临床批次1~100  $\mu\text{m}$ 范围内的颗粒数量与大小；应加强纳米级聚集体和颗粒的表征；应收集在储存、使用和压力条件下形成的亚可见颗粒物的定量和定性数据，并制定风险控制策略；最终在选择监测产品颗粒大小和计数的方法时，应分别建立内源性颗粒、外源性颗粒及固有性颗粒的控制策略。在工艺放大过程中，应尽量监控各工艺环节产品中颗粒的含量，通过优化工艺方法和参数降低制剂中颗粒浓度。当各工艺环节中颗粒物超过预警阈值时，应及时调查原因，判断是否有工艺异常并采取相应的解决措施。

#### 4.3 放行检测

放行标准是药品进入市场的必需门槛，也是药品在整个效期内合规的评判依据。对于不溶性微粒的检测，目前国内已上市和申报上市的单抗产品中，有高达96.9%的批次仅采用药典方法—LO作为放行方法，该方法有较高的蛋白颗粒漏检率。根据USP <790>，当评估药企产品可见颗粒时，应对

20支样品进行抽样检查。如果在样品中没有观察到可见颗粒，则认为该批次基本上没有可见的颗粒。考虑到检测过程是概率事件，应针对特定的检验方法和产品/包装组合确定颗粒检测阈值。使用内部预警系统进行颗粒控制和溯源调查，是保证产品批次质量的关键环节。由于药典的监控标准是最低标准，与对微粒危害的最新认识和监测需求相比具有滞后性，因此，在内控时也应尝试从多种粒径水平、多种检测方法对颗粒进行全面表征和分析，积累数据，以便为增加放行方法和提升放行要求提供依据，也为不良反应原因回溯提供数据支持。

#### 4.4 市场监管

在药品上市后，也应在其全生命周期中对不溶性微粒进行检测和统计。在这个阶段，应该建立单抗制剂品种不溶性微粒数据档案，如不溶性微粒含量和特征的异常波动，参考并结合临床数据反馈，考察是否发生异常过敏反应或不良事件，及时预警药企并要求其作出适当解释和应对方案。当发生药品工艺变更时，结合数据档案，对变更风险进行评估和调研，给出合理的建议和解决方案。除此之外，药品在医疗机构的管理过程中也存在一定隐患，如不当的处方准备流程，不符合说明书的操作方法，都会导致单抗制剂中不溶性微粒的异常。监管机构应该定期检测医疗机构所持有的药品中不溶性微粒含量，是否有导致药品中不溶性微粒超标的隐患和不合规操作，及时预警并对医护人员进行相关的培训，降低药品在管理过程中产生不溶性微粒的风险。通过药典方法（LO和显微计数法）评估单抗制剂中 $\geq 10 \mu\text{m}$ 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ 不溶性微粒含量，当超过药典规定限额，应该及时停止药品销售并召回有问题批次产品。除此之外，也应该评估单抗制剂中1~10  $\mu\text{m}$ 不溶性微粒浓度变化趋势，建立不溶性微粒浓度与不良事件的数学模型和预警机制，提升流通在市场中药品的安全性。

### 5 单抗制剂中颗粒检测的挑战与前景

单抗制剂中存在的颗粒对药品来说是个潜在的安全风险点，已上市的双抗制剂在临床使用中发生不良反应的概率也不在少数。据调研，蛋白类不溶性微粒是不良免疫反应发生的重要危险因素<sup>[23]</sup>。因此对微粒的检测和控制是单抗用药安全性的必要保障，也是对单抗工艺稳定性和制剂合理性不可或缺的评价指标。

### 5.1 全面表征

目前绝大多数企业对微粒的检测和控制仅采用LO, 检测内容多数仅包含ChP中规定的粒径, 评判标准多数采用ChP中设定的限度, 仅个别企业除了LO还采用其他方法进行监测。若要对微粒的全面表征, 需要建立一系列适用于单抗微粒表征的方法, 从不同粒径如纳米级到微米级的连续范围、不同维度如微粒形态、蛋白是否发生空间构象改变、不同特性如微粒带何种电荷、发生了何种化学修饰等方面对其特点进行充分了解和认识, 建立完善的微粒档案。此外, 随着生物技术的不断进步和单抗产业的蓬勃发展, 越来越多新型的、更加复杂的蛋白制剂产品研发出来, 如高浓度蛋白制剂、抗体偶联药物、双特异甚至三特异性抗体等。单抗产品各具特点, 导致不溶性微粒的形成原因更加多样, 各方法是否适用于检测这些微粒需要细致评估, 得出的各项结果也需要有机整合, 若出现互相矛盾的结果还需通过检测原理对微粒信息进行甄别, 以便得到真实的结论。一旦对微粒进行了全面表征, 这套微粒档案可作为相应批次单抗的身份证, 有需要时则便于原因追溯。此外, 不同种类不同批次单抗的微粒档案可作为一整套数据库, 为后面类似单抗的微粒控制提供数据参考和可能的风险点提示。

### 5.2 重点表征

虽然单抗微粒是临床不良反应的重要风险点, 但微粒是如何引发不良免疫反应、哪些特征的微粒更易引发不良免疫反应、这些微粒是如何形成的, 这些基础性的问题仍然缺乏系统深入的研究。已有部分研究尝试对这些问题进行了探讨, 如单抗微粒通过何种途径激活补体系统<sup>[24]</sup>, 是否具有激活抗原提呈细胞的作用<sup>[25]</sup>等, 但单抗种类繁多各具特点, 免疫反应也包含先天免疫和适应性免疫, 并且涵盖了众多种类的免疫细胞和免疫因子, 要研究清楚究竟何种特征的微粒与何种免疫反应具有潜在关联性, 进而对微粒进行风险分级、重点表征和监测控制是非常具有挑战性的。不过这方面研究是可以针对单抗特点逐步开展的, 也是值得深入探索的, 如虽然针对大多数单抗制剂引起不良免疫反应的评估方法是抗药抗体检测, 但是针对免疫检查点的单抗颗粒引发的不良免疫反应可能更需要关注T细胞的异常和细胞因子释放等, 随着探索的深入

进行和对结果的有机整合, 这些可能的关联会逐渐清晰, 不同微粒特征在引发不良反应中的权重也会慢慢凸显, 届时可能对具有不同危害性的微粒特征进行排序, 进而采用相应手段对其进行分级监控, 既能减少人力物力消耗, 也能达到促进用药安全的最终目标。

## 6 结语

近年来, 我国单抗制品获批上市的数量从1999年的1个, 发展至今已达71个, 呈急速增长的趋势。随着用药可及性的推进, 2020年纳入医保的单抗达23个, 单抗制品的用药安全性占据着越来越重要的分量。各药物研发、生产企业和监管机构也一直致力于公众的用药安全。虽然目前ChP对与单抗安全性有关的微粒的要求和标准还不够完善, 但对单抗制品的微粒监测趋势是向着更加全面和严格的方向发展, 如更加关注小于10 μm微粒的检测、多种检测方法的综合使用、微粒与不良反应的关联性, 以及特殊使用部位如眼用注射剂的微粒控制等, 在提高我国药品质量的同时, 保障临床用药的安全性, 使得公众不但有药可用, 用药有效, 更要用得安全、用得放心。

### 参考文献:

- [1] George J Weiner. Building Better Monoclonal Antibody-based Therapeutics[J]. Nature Reviews Cancer, 2015, 15(6): 361-370.
- [2] Tsumoto Kanta, Isozaki Yushi, Yagami Hisanori, et al. Future Perspectives of Therapeutic Monoclonal Antibodies[J]. Immunotherapy, 2019, 11(2): 119-127.
- [3] 郭莎, 王开芹, 武刚, 等. 抗PD-L1单抗的质量控制研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 13-22.
- [4] 金鹤. 静脉输液中不溶性微粒对人体的危害及控制[J]. 上海护理, 2007(5): 55-57.
- [5] Lindenmeyer Luciane Pereira, Hegele Vanessa, Caregnato Juliana Prohonoski, et al. Follow-up of Patients Receiving Rituximab for Diffuse Large B Cell Lymphoma: An Overview of Systematic Reviews[J]. Annals of Hematology, 2013, 92(11): 1451-1459.
- [6] Giulia Fornasier, Sara Francescon, Paolo Baldo. An Update of Efficacy and Safety of Cetuximab in Metastatic Colorectal Cancer: A Narrative Review[J]. Advances in Therapy, 2018, 35(10): 1497-1509.



- [7] Subedi S, Gong Y, Chen Y, et al. Infliximab and Biosimilar Infliximab in Psoriasis: Efficacy, Loss of Efficacy, and Adverse Events[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2019 ( 13 ) : 2491–2502.
- [8] USP: Vol I [S]. 2018: 8052–8065.
- [9] Linda O Narhi, Jeremy Schmit, Karoline Bechtold–Peters, et al. Classification of Protein Aggregates[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 101 ( 2 ) : 493–498.
- [10] Chi–Ting Huang, Deepak Sharma, Peter Oma, et al. Quantitation of Protein Particles in Parenteral Solutions Using Micro–flow Imaging[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98 ( 9 ) : 3058–3071.
- [11] Deepak K Sharma, Dave King, Peter Oma, et al. Micro–Flow Imaging: Flow Microscopy Applied to Sub–visible Particulate Analysis in Protein Formulations[J]. AAPS PharmSci, 2010, 12 ( 3 ) : 455–464.
- [12] 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2020: 通则8–10.
- [13] Satish K Singh, Nataliya Afonina, Michel Awwad, et al. An Industry Perspective on the Monitoring of Subvisible Particles as a Quality Attribute for Protein Therapeutics[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 99 ( 8 ) : 3302–3321.
- [14] John F Carpenter, Theodore W Randolph, Wim Jiskoot, et al. Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98 ( 4 ) : 1201–1205.
- [15] Anil K Tyagi, Theodore W Randolph, Aichun Dong, et al. IgG Particle Formation During Filling Pump Operation: A Case Study of Heterogeneous Nucleation on Stainless Steel Nanoparticles[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 98 ( 1 ) : 94–104.
- [16] James G Barnard, Satish Singh, Theodore W Randolph, et al. Subvisible Particle Counting Provides a Sensitive Method of Detecting and Quantifying Aggregation of Monoclonal Antibody Caused by Freeze–Thawing: Insights into the Roles of Particles in the Protein Aggregation Pathway[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, 100 ( 2 ) : 492–503.
- [17] Janaky Narayanan, XY Liu. Protein Interactions in Undersaturated and Supersaturated Solutions: A Study Using Light and X–Ray Scattering[J]. Biophysical Journal, 2003, 84 ( 1 ) : 523–532.
- [18] Shawn Cao, Joey Pollastrini, Yijia Jiang. Separation and Characterization of Protein Aggregates and Particles by Field Flow Fractionation[J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2009, 10 ( 4 ) : 382–390.
- [19] Fukuda Jun, Iwura Takafumi, Yanagihara Shigehiro, et al. Separation and Quantification of Monoclonal–antibody Aggregates by Hollow–fiber–flow Field–flow Fractionation[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406 ( 25 ) : 6257–6264.
- [20] Daniel Weinbuch, Sarah Zölls, Michael Wiggernhorn, et al. Micro – Flow Imaging and Resonant Mass Measurement (Archimedes) – Complementary Methods to Quantitatively Differentiate Protein Particles and Silicone Oil Droplets[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2013, 102 ( 7 ) : 2152–2165.
- [21] Movafaghi Sanli, Wu Hao, Francino Urd ú niz Irene M, et al. The Effect of Container Surface Passivation on Aggregation of Intravenous Immunoglobulin Induced by Mechanical Shock[J]. Biotechnology Journal, 2020, 15 ( 9 ) : e2000096.
- [22] Hao Wu, Theodore W Randolph. Aggregation and Particle Formation During Pumping of an Antibody Formulation Are Controlled by Electrostatic Interactions Between Pump Surfaces and Protein Molecules[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 109 ( 4 ) : 1473–1482.
- [23] Ehab M Moussa, Jainik P Panchal, Balakrishnan S Moorthy, et al. Immunogenicity of Therapeutic Protein Aggregates[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016, 105 ( 2 ) : 417–430.
- [24] Carly F Chisholm, William Behnke, Yekaterina Pokhilchuk, et al. Subvisible Particles in IVIg Formulations Activate Complement in Human Serum[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2020, 109 ( 1 ) : 558–565.
- [25] Pardeshi Neha N, Ahmadi Maryam, Sierzputowska Izabela, et al. Subvisible Particles in Solutions of Remicade in Intravenous Saline Activate Immune System Pathways in In Vitro Human Cell Systems[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2021, 110 ( 8 ) : 2894–2903.

(收稿日期 2021年9月8日 编辑 邹宇玲)