

抗体蛋白类药物稳健冻干工艺的开发和放大策略

patheon

- API
- 生物制药
- 病毒载体服务
- 药物早期和后期开发
- 临床试验解决方案
- 物流服务
- 商业化生产



简介	3
抗体蛋白类冻干制剂的关键质量属性以及开发过程的挑战	3
抗体蛋白类制剂的处方筛选和稳健冻干曲线开发	4
冻干工艺开发、工艺转移和放大过程中需要注意的事项和考量点	5
1. 预冻	5
2. 退火	5
3. 一次干燥	6
4. 二次干燥	6
抗体蛋白类药物冻干制剂的展望	7
关于我们	8
参考文献	8

简介

自从第一款单克隆抗体药物莫罗单抗 -CD3 上市以来，抗体类生物药品的发展已经有三十多年^[1]。截止至 2022 年 6 月，全球范围内已有 162 种抗体药物获得了至少一个法规监管机构的批准，其中美国批准 122 种，欧洲 114 种，日本 82 种，中国 73 种^[2]。除了获得批准的数量显著增长之外，抗体分子的形式也越来越丰富，除单克隆抗体外，双抗、ADC、融合蛋白和重组蛋白等类型也逐步上市。

抗体分子相对小分子而言，结构复杂、分子量高、难以完全表征、对环境敏感，可选择的吸收途径相对单一，因此抗体制剂多为注射剂。抗体类生物制品的给药方式包括皮下注射、肌肉注射、静脉注射等。抗体蛋白液体水针制剂依然是主要剂型，但越来越多的复杂抗体（包括 ADC、双抗等）往往对环境更敏感而面临长期物理和化学稳定性的挑战，为克服不稳定性，蛋白制剂通常考虑制成固体形式，以获得可接受的药物有效期的产品。制备固体蛋白药物最常用的方法是制备成冻干制剂，这样可以有效提高稳定性，方便保存、运输，降低成本和潜在病人使用风险^[3]。在目前 FDA 批准上市的抗体类生物制品中有 41 个抗体药物为注射用冻干制剂，大约占 25%^[4]。在行业分子设计多样化的今天，毫无疑问，未来抗体蛋白类药物冻干剂型的开发将会越来越多。



抗体蛋白类冻干制剂的关键质量属性以及开发过程的挑战

抗体蛋白类冻干制剂是注射剂的一种，其质量属性的选择和控制应符合各国药典中关于注射剂的描述和要求，如 USP <1> Injections，中国药典 <0102> 注射剂章节的要求等，包括复溶后的可见异物、不溶性微粒、渗透压、摩尔浓度、装量差异、细菌内毒素、无菌等等。其次，冻干制剂中的含量、纯度、活性的质量属性设置和液体水针制剂要求一致，冻干产品特有的质量属性包括冻干粉饼外观、水分含量，以及复溶特性。

由蛋白质量属性出发，冻干工艺过程参数对于蛋白质量有所影响。首先，分析相对液体水针制剂工艺，冻干工艺带来的额外挑战包括但不限于：

- 冻干过程中的 pH 漂移
- 冻干和二次升华过程中的辅料过浓缩
- 冻干过程中冰晶的形成带来的大量固 - 液界面效应
- 升华引起的长时间固 - 气界面压力

在此类不适条件下，蛋白纯度降低甚至失活的文献常见报道。低 pH 会造成蛋白化学结构的变化，如脱氨、二硫键错配，重排反应等^[5]。界面效应造成蛋白构象的改变，可能引起电荷异型性的改变、蛋白沉淀，活性降低等^[6]。因此，处方的设计和冻干工艺相辅相成，无法孤立设计。在早期处方开发阶段，必须设计适当的稳定性考察实验，筛选出在压力条件下稳健的处方。在较复杂的分子中，需要将分析表征方法引入稳定性考察实验。例如表征一级结构的肽图，表征高级结构的圆二色谱（CD）、傅立叶转换红外光谱（FTIR）等。

这些方法能帮助早期快速建立蛋白降解途径、结构和活性之间的联系。此外，一些用于冻干饼微观结构表征的分析方法也适用于此实验研究，例如 FTIR，X-Ray，SEM 等。



抗体蛋白类制剂的处方筛选和稳健冻干曲线开发

抗体类蛋白制剂的处方开发的一般策略，是从影响产品质量权重最大的因素开始，即 pH。因为很多蛋白类分子在 pH 很小的范围内稳定，pH 变化会导致蛋白分子结构变化和降解。缓冲液和 pH 是不可分割的两个因素。缓冲体系决定了溶液的缓冲能力、影响离子强度。冻干制剂中需要特殊考虑的是，在冻融和升华过程中，选择的缓冲体系和强度是否能为蛋白持续提供稳定 pH 和环境。以醋酸体系作缓冲液为例，醋酸在冻干过程中升华，因此 pH 漂移，对蛋白的质量和冻干工艺的稳健性都有很大影响。

还要考虑蛋白类药物在后期大规模生产过程中，可能会经历比小试更强的过浓缩效应、更长时间的界面效应等压力。对于复杂抗体来说，这些压力有更大的概率导致蛋白质量不能达到小试预期。因此，此处也需要足够的前期处方开发和工艺模拟数据去支持工艺的稳健性分析。

冻干制剂稳定剂的选择对于抗体蛋白类分子冻干制剂也具有重要影响，稳定剂包括冷冻保护剂，冻干保护剂和表面活性剂。

- 稳定剂在冻干过程中持续的界面压力、过浓缩等情况下的保护能力。
- 稳定剂在冻干过程中可能产生结晶，结晶对于蛋白质量的影响则具有产品特异性。
- 稳定剂的选择影响到产品的玻璃化转变温度 (T_g) 和塌陷温度 (T_c)。
- 表面活性剂的选择除了降低界面效应的压力外，也影响到冻干升华过程中的爬壁等问题。制剂复溶过程中的稳定性也是产品重要的考察方面，在处方开发过程中也会考虑添加一些表面活性剂来减少蛋白产品聚集和降解。

另外在这个阶段容器密封系统也需要进行确定。

因此，冻干制剂处方的开发也不是孤立的，需要结合冻干工艺综合考虑。图 1 为冻干制剂开发的一个典型开发流程，通过前期处方开发工作选择一个或者几个处方进行初步冻干的尝试，观察冻干曲线、测试产品质量。最终，使用最终锁定的处方在确定的冻干工艺中进行验证。

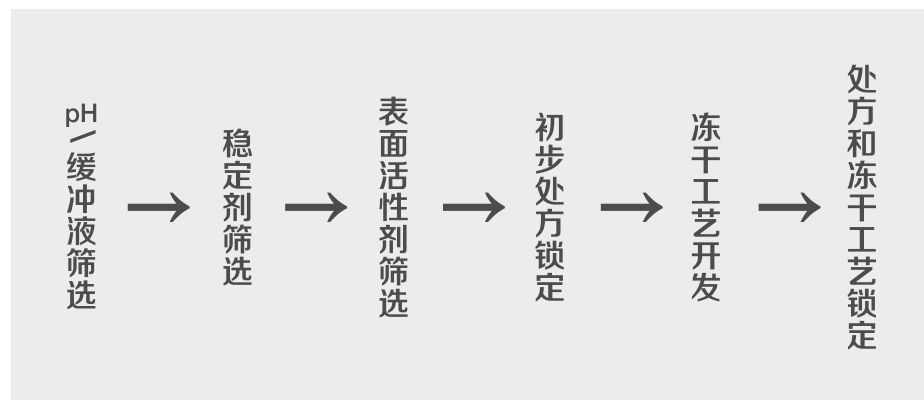


图 1

冻干工艺开发、工艺转移和放大过程中需要注意的事项和考量点



开发冻干工艺过程需要尽可能获取最大的冷冻干燥效率，同时确保产品的质量。这需要了解冻干工艺的每一步对制剂产品的影响，为最终产品开发出稳定可靠的工艺。通常来说，冻干工艺的开发流程可以大概分成以下阶段：冻干处方制剂关键温度参数分析、冻干参数设计和实验、工艺参数优化，冻干工艺循环的验证以及持续的工艺稳健性分析。

冻干工艺本身常见的步骤也可以大概分成四步：预冻、退火（如适用）、一次干燥、二次干燥。冻干工艺建立在对抗体蛋白制剂关键温度参数进行分析，包括确定玻璃化转变 T_g 和塌陷温度 T_c 、熔点和共晶温度，有了这些数据，开发冻干工艺循环的初始设定点将开始形成。无论是使用小型台式规模的还是非常先进的冻干机，利用这些数据可以指导冻干工艺循环的设定值。

1. 预冻

预冻决定了冻干处方结晶初始情况，而结晶的情况影响水分是否有通道被顺利升华。因此，预冻的设计不仅是保护冻干制剂在冻干前后质量不变，更关键的是使得冻干产品有合理的结构方便水分的升华，成为冻干工艺的顺利起点。预冻温度的设计应该低于冻干处方的共晶温度。

此外，预冻降温速度是影响结晶的重要因素。一般来讲，处方速冻时，溶液的过冷度和过饱和度大，成核速度快，易形成数量多而体积小的细小晶体。细小晶体的优点是冻干制剂成品颗粒细腻，复溶性优良；缺点是冻干水分升华时，留下的水汽通道间隙比较小，可能影响到冻干饼下层的升华效率。而在慢冻时，容易形成体积较大的冰晶，冰晶升华后形成的孔隙较大，有利于提高升华效率，但冻干制剂成品的复溶性可能较差。



2. 退火

退火的目的是确保冻干制剂中的赋性剂结晶，减少预冻过程中结晶的不均匀性，因并希望减少工艺时间。退火的温度和时间是关键工艺参数。退火温度应该在 T_g 以上来保证分子具有一定的流动性，但在 T_g 以上会导致产品质量的稳定性风险，在工艺设计中应综合历史数据进行考虑。

3. 一次干燥

一次干燥是冻干制剂去除水分的主要环节，该过程往往可以升华掉百分之九十以上的水分。一次干燥阶段的温度、腔室真空度和时间以及终点判断决定了是否能得到稳健、快速的冻干工艺。选择合适的冻干设备，可以稳定控制需要的板层温度和真空度，带来可靠的数据。

确定一次干燥终点的方法

- 传统上可以观察“水线”是否已经消失（冻干饼上部已升华的干燥部分和下部湿饼的界限）
- 通过 PAT 探头测试冻干机箱体内的样品温度，样品温度接近板层温度则终止
- 关闭干燥箱和水汽凝结器之间的阀门，观察是否有压力上升
- 冻干机配备的水分传感器，如皮拉尼等
- 冻干机配置的重量传感器，监控冻干样品重量变化等。判断干燥终点的方法往往是冻干工艺转移和稳健性的重点问题。

4. 二次干燥

一次干燥的水分为自由水，二次干燥去除的水分通常为结合水。因此二次干燥需要更高的升华温度。这一步的重点是选取的温度和时间既能满足工艺残余水分的要求，又能保证冻干制剂暴露到相对高温中的产品质量和稳定性。

在设计初步的冻干参数后，可以进行一轮或多轮冻干实验，得到冻干制剂的质量参数来逐步优化和确保冻干工艺能否符合要求。

现代的冻干设备经过不断的改进和升级，能够通过配备的在线监测技术可以实时获取数据的能力，相对于传统的试错式阶段式的抽样方法，其实时评估数据的能力可以更快地帮助开发一个周期。

通常来说，无菌制剂开发稳健的冷冻干燥循环可能是一项具有挑战性的任务。必须确定很多关键参数以及参数范围，以了解冻干工艺的最佳设计空间。了解工艺设计空间对于工艺的稳健性是很重要的，冻干技术稳健工艺的开发可能花费大量的时间和成本，并贯穿整个产品开发工艺周期。

当最初在实验室开发冻干循环时，就需要清楚地知道，后续工艺放大阶段使用的大型 GMP 设备可能无法满足相同的工艺参数条件。一般来说，冷冻干燥室越大，抽真空和升温过程所需的时间就越长。在将处方工艺从实验室设备放大到 GMP 冻干机时，保持保守是很重要的。

例如，一个典型的实验室规模 Non-GMP 的冻干机面积大约为 $0.2\text{m}^2 - 0.5\text{m}^2$ 。大多数 GMP 临床阶段到商业化生产的冻干机在 $5\text{m}^2 - 30\text{m}^2$ 的范围内，在有些情况甚至差异更大。

为了确保冻干工艺循环能够顺利的直接从小型设备转移到大型设备，在开发冻干工艺的时候要充分考虑到潜在的大型冷冻干燥机的局限性是非常重要的。这里列举了此类参数的一个典型的例子，如在预冻结束后到一次干燥前的升高温度的斜率，小型或实验室冻干机可能能够以每分钟几度的速度斜率快速升温，而大型的30m²的冻干机只能以每分钟0.5度左右的速度斜率。考虑到这一点，那么在冻干循环应该以每分钟0.5度的斜率来进行开发，以确保利于后期工艺放大。

开发稳健的冻干循环的其他关键考虑因素包括一次和二次干燥后的压力升测试，以及在探头数据显示干燥到达终点后，额外增加长一些安全缓冲干燥时间来确保工艺的可靠性。

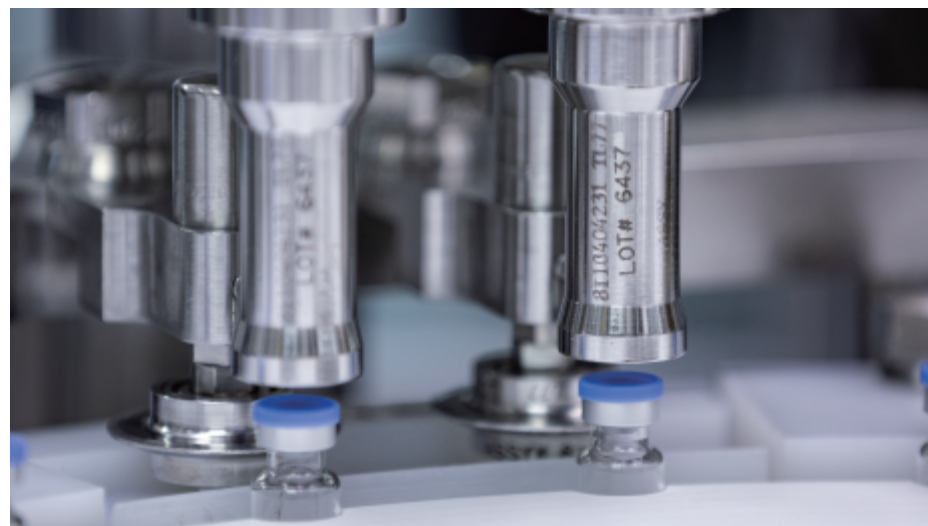
当然在实际操作过程中，对冻干工艺放大过程的每个阶段，明智的做法是在充分评估后对放大的工艺进行可行性研究批次生产，对样品进行采样和测试，以确认冻干工艺循环仍然是可接受的，并且整个批次具有一致性。遵循这些技术将有助于构建一个稳健的冻干工艺循环，并支持成功的技术转移和放大。

抗体蛋白类药物冻干制剂的展望

对蛋白质生物活性至关重要的精细三维结构在制备存储并准备用于治疗目的时，通常容易受到各种变性或降解模式的影响。在生产工艺、存储和运输的过程中，蛋白质可能经历各种物理化学变化，包括氨基酸水平的微观变化（氧化、异构等）到宏观变化（如聚集沉淀等）。降解的后果包括蛋白药物的活性丧失和不良免疫反应。这种不良免疫反应涉及到体内抗药物抗体的产生或干扰原蛋白的效果而进一步影响治疗能力。

鉴于稳定性的需求，抗体蛋白类药物的冻干工艺是用于制剂研究最广泛的方法之一。近60%的生物药（包括疫苗、抗体和血浆产品）是冻干制剂。然而，冻干制剂处方和工艺的早期开发需要大量的设备资金投入、平台经验和相匹配的分析技术，以帮助MAH快速推动项目进入临床。后期的开发和生产则需要高水平的质量系统、充足的产能、适配平台经验和与之匹配的分析技术（包括过程分析和表征等）来保障报产和市场供应。

赛默飞 Patheon™ 制药服务具有完整的冻干处方和工艺开发、冻干制剂生产能力，保障从早期开发到商业化的全流程交付。赛默飞拥有丰富经验的生物制剂开发专家和生产管理团队，保证技术的先进性和稳定性，可以为客户提供多途径的合作方式，帮助客户加快研发进程，加速产品上市。



关于我们

赛默飞通过我们的 **Patheon™** 品牌为客户提供行业领先的药物开发、临床试验物流和商业化生产等制药服务解决方案。我们在全球拥有超过 **65** 个分支机构，在开发的各个阶段提供一体化、端到端的支持，包括原料药、生物制药、病毒载体、**cGMP** 质粒、制剂、临床试验解决方案、物流服务和商业化生产及包装。我们以世界闻名的卓越科技为基础，各种规模的制药和生物技术公司都可随时访问我们遍布美洲、欧洲、亚洲和澳大利亚的全球设施和技术专家网络。通过 **Quick to Care™** 计划，我们为您的药物开发工作定制一体化的药物开发和临床服务。我们的大分子和小分子药物 **Quick to Care™** 计划帮助您在早期开发阶段实现速度与风险的平衡，快速成功地完成 **IND** 申报。**mysupply Platform** 和 **Pharma 4.0** 等数字创新工具提供实时数据和流畅体验。我们与客户合作，迅速将制药行业的可能性变为现实。

参考文献

- 1.Smith, S. L. (1996). Ten years of Orthoclone OKT3 (muromonab-CD3): a review. *Journal of Transplant Coordination*, 6(3), 109-121.
- 2.Xiaochen Lyu etc (2022). The global land scape of approved antibody therapies. *Antibody Therapeutics*, Vol. 5, No. 4 233–257
- 1.Wei W (2000). Review lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutics* 203 (2000) 1–60
- 2.Crommelin, D. J., Hawe, A., & Jiskoot, W. (2019). Formulation of biologics including biopharmaceutical considerations. In *Pharmaceutical Biotechnology* (pp. 83-103). Springer, Cham.
- 3.Park, J., Nagapudi, K., Vergara, C., Ramachander, R., Laurence, J. S., & Krishnan, S. (2013). Effect of pH and excipients on structure, dynamics, and long-term stability of a model IgG1 monoclonal antibody upon freeze-drying. *Pharmaceutical research*, 30(4), 968-984.
- 4.Li, J., Krause, M. E., Chen, X., Cheng, Y., Dai, W., Hill, J. J., ... & Zhu, L. (2019). Interfacial stress in the development of biologics: fundamental understanding, current practice, and future perspective. *The AAPS journal*, 21(3),1-17.

想了解更多？欢迎[点击联系赛默飞冻干制剂专家。](#)



关注赛默飞 Patheon™中国
获取更多资源

+86 21 6865 4588 • thermofisher.com/www.patheon.cn • pharmaservices@thermofisher.com
© 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.
Published 02/23

ThermoFisher
SCIENTIFIC