

单抗工作参考品的活性赋值研究

于传飞[#], 刘春雨[#], 王 兰^{*}

(中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要: 利用一级参考品对工作参考品的多次标定, 对工作参考品进行生物学活性的赋值。本文先理论计算应标定次数, 若工作参考品多次标定的均值位于预设相对效价水平内时, 则定义工作参考品的效价为 100%。结果显示: 在活性方法的总中间精密度的 11.66%、预设效价水平为 95%~105%、置信水平为 95% 时, 应进行至少 21 次标定。实际 22 次标定的均值为 101.96%, 故定义工作参考品与一级参考品效价一致即 100%。结果提示采用先计算应标定次数后进行标定的方式, 通过判断均值是否位于预设效价水平对工作参考品进行活性赋值, 该策略对于生物制药企业具有一定的参考意义。

关键词: 一级参考品; 二级参考品; 工作参考品; 单克隆抗体; 生物学活性赋值

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)02-0565-05

Value assignment study on bioactivity of monoclonal antibody working reference standard

YU Chuan-fei[#], LIU Chun-yu[#], WANG Lan^{*}

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: The bioactivity of a working reference standard was determined by replicate bioassays with calibration against a primary reference standard. In this study the number of bioassay replicates needed for calibration first was calculated theoretically, and if the mean value of the experimental bioassay replicates fell within the predefined bioactivity level the bioactivity of the working reference was defined as 100%. Our results showed that when the total intermediate precision of the bioassay method was at 11.66% and the predefined bioactivity level was set at 95%-105% with a confidence level of 95%, 21 bioassay replicates should be carried out for calibration. The average value of the 22 experimental bioassay replicates was 101.96%, so the bioactivity of the working reference standard was consistent with that of the primary reference standard at 100%. The results suggest that a strategy of first calculating the number of bioassay replicates needed for calibration and then determining whether the resulting experimental mean value is within the predefined bioactivity level will be of value to the biopharmaceutical industry.

Key words: primary reference standard; secondary reference standard; working reference standard; monoclonal antibody; bioactivity assignment

ICH Q7 中对于一级参考品 (primary reference

standard) 的定义为通过一系列分析实验表明其为真实性的高纯度物质, 可由以下方式得到: ① 来自于认可的官方; ② 单独合成制备; ③ 来自于现有的高纯度的生产产品; ④ 对现有生产产品进行进一步纯化。二级参考品 (secondary reference standard) 或工作参考品 (working reference standard) 的定义为通过与一级参考品的比对表明具有确定的质量和纯度的物质, 作为日

收稿日期: 2020-09-03; 修回日期: 2020-12-03.

基金项目: “重大新药创制”国家科技重大专项课题“抗体偶联药物的质量评价方法和质控标准研究平台”(2019ZX09732002-015-001).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: wanglan@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1437

常实验室分析的参考品之用。当无法从官方认可的单位获得标准品时,应制备“内部一级参考品”。必须对其进行必要的检测以确保其结构和纯度,这种检测需记录在案。工作参考品必须合理制备、鉴定、检测、批准和贮存。在每一批工作参考品初次使用前,应用一级参考品加以比对以确定其适用性。每批工作参考品应按照书面规程进行定期论证^[1]。参考品的建立不仅对保持临床试验中不同批次样品的一致性至关重要,还能保证拟市售产品与临床试验样品的可比性,并且为工艺研发与商业化生产提供联系纽带^[2]。

但是对于生物制品,ICH Q6B中指出,新的分子实体作为药品申报,一般不可能获得国际标准品或国家标准品作对比。生产者应建立经适当表征的内部一级参考品,该参考品应采用具有工艺代表性批次和临床样品作为原料制备而成。也就是说采用高纯度原料并不适合生物制品,而工艺和临床代表性则更为重要。另外用于产品批检验的内部工作参考品同样应采用一级参考品标定^[3]。

ICH Q2中指出,在整个验证研究过程中,应使用具有记录纯度并良好表征的参考物质^[4],良好表征意味着应不限于如产品原液或成品的放行检验,应用正交方法对其不同质量属性进行充分的研究^[5]。在单抗等重组治疗产品中,参考品在表征、批放行、可比性及稳定性研究中都发挥着不可替代的作用;在产品研发过程中,应充分应用参考品作为临床数据的桥梁作用;在商业化生产过程中,参考品同样起着保持产品质量相对稳定的重要作用。

一般来说在非临床及早期临床时,需建立过渡期参考品(interim reference standard),而在III期或者关键临床期间应建立一级参考品。一级参考品一般来说应尽量保持不变,除非重大的工艺变更显著影响了产品的关键质量属性。所建立的工作参考品都应该采用一级参考品进行标化,这样可以避免参考品质量属性的漂移(drift)(图1)。FDA规定工作参考品建立的规程应以附录信息的形式提交,相应检测结果可以年报形式上报,足见其重要性^[6]。

对于生物治疗产品,活性一般为其最为关键的质

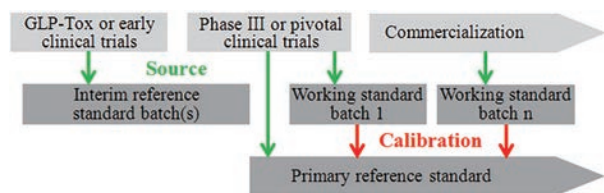


Figure 1 The different types of reference standards during the life cycle of biopharmaceuticals, from the non-clinical study to commercialization

量属性之一,一般采用可以模拟体内作用机制的体外模型进行测定,产品的活性一般采用与参考品的相对效价表示^[7,8]。一级参考品若具有商业工艺及关键临床批次代表性并对其进行充分表征,一般其活性可直接指定为100%。由于细胞测活方法具有相对较大的变异性,在进行工作参考品的建立或者换批时,生物制品产业界对其活性的赋值会采用不同的策略,如直接采用多次测定的相对效价进行赋值或者直接赋予与一级参考品相同的效价即100%,对于前者,应确认新的赋值确实为活性差异而不是源自方法学变异,对于后者,不能简单的预设符合产品活性质量标准就可以作为工作参考品^[9,10]。

生物制药企业对于工作参考品的建立或换批时其活性的赋值经常有较大的疑问,所采用的策略也不尽相同,如若标定值处于预设范围内保持与一级参考品相同或赋予其实际的标定值。但是不管何种策略,均应向监管机构说明其合理性。本研究针对抗TNF- α 单抗建立工作参考品时对其活性进行赋值研究,以实例说明如何采用预设范围赋予工作参考品与一级参考品相同的活性,希望给予相应研究者以参考。

材料与方法

供试品、试剂、材料和仪器 抗TNF- α 单抗样品、一级参考品以及候选工作参考品为本室留样,WEHI-164细胞购自ATCC,放线菌素D购自AAT Bioquest公司,TNF- α 购自Sigma公司,胰酶(含0.25% EDTA)、RPMI 1640培养基、胎牛血清及PBS购自Gibco公司,CCK8购自DojinDO公司,96孔平底细胞培养板购自Nest公司、酶标仪为MD公司的Spectra Max i3x。

细胞培养 用完全培养基(含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基)对WEHI-164细胞进行培养,以 $0.2 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的密度进行传代,每3天传代1次。

细胞杀伤抑制实验 用胰酶(含0.25% EDTA)将WEHI-164细胞消化后,用完全培养基重悬,计数后调整至每毫升 1.2×10^6 ,每孔50 μL 接种于96孔细胞培养板中,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育5~6 h。用样品稀释液(含800 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ActD的完全培养基)将样品预稀释至12 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,按1:3进行梯度稀释得到9个梯度稀释样品。每个梯度稀释样品与TNF- α 溶液(含20 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ TNF- α 的样品稀释液)等体积混合后,以每孔50 μL 接种于96孔细胞培养板中,每个浓度梯度3个复孔。将细胞培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 培养箱中孵育20 h。每孔加入显色液50 μL ,继续于培养箱中孵育1 h。用酶标仪进行读数,检测波长为450 nm,参比波长为620 nm。

效价的计算 以样品的蛋白浓度 ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标, 检测波长与参比波长读数差值作为纵坐标, 通过四参数拟合得到剂量反应曲线以及四参数值 (A 、 B 、 D 值)、 EC_{50} (C 值)、 R^2 值等。其中当①每条拟合曲线的相关系数 $R^2 \geq 0.97$; ② $(B_{\text{参考品}}/B_{\text{待测样品}}) \times 100\%$ 为 $70\% \sim 130\%$; ③ $(D_{\text{参考品}}/D_{\text{待测样品}}) \times 100\%$ 为 $70\% \sim 130\%$; ④ $(D_{\text{参考品}} - A_{\text{参考品}})/(D_{\text{待测样品}} - A_{\text{待测样品}}) \times 100\%$ 为 $70\% \sim 130\%$; ⑤ 三个复孔读数的 $\text{RSD} \leq 20\%$ 时, 则系统适用性成立, 实验有效。待测样品的生物学活性用参考品的 EC_{50} 值与待测样品的 EC_{50} 值的比值进行计算。

方法学验证 将样品分别预稀释至 18、15、12、9 和 $6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为待测样品, 另取一份预稀释至 $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品作为参考品, 采用上述细胞杀伤抑制实验测定 5 份不同水平待测样品的效价。每天做 3 次测定, 两个人分别进行 3 天测定, 以评估 150%、125%、100%、75% 和 50% 相对效价水平的准确性、精密度、线性和范围。

工作参考品活性赋值策略 首先对上述细胞杀伤抑制实验按照 ICH Q2 指导原则^[4]进行完整的方法学验证, 获得中间精密度值 (IP)。其次通过中间精密度值计算不同标定次数 (n) 的标准误 (IP/\sqrt{n}), 按照此标准误以及 100% 均值查阅正态分布表, 计算 95% 置信区间的效价分布范围。最后按照此分布范围位于效价水平在 95%~105% 之内时的标定次数进行相应次数实验。若最后实验结果位于 95%~105% 的效价范围内时, 则对工作参比品赋值为 100%。

结果

1 实验精密度的验证

对于单抗产品生物学活性方法的验证, 主要包括专属性、准确性、精密度、线性和范围等。按照上述方法学验证的设计, 如图 2A 所示, 实测和理论相对效价

的相关性良好 ($R^2 > 0.99$), 在 50%~150% 效价范围内准确性和精密度均良好, 专属性与本文主题无关, 故未展示, 均满足验证要求。

对于预稀释至 $12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的待测样品, 其对应的理论相对效价水平为 100%, 其实测相对效价水平如图 2B 所示, 均位于 80%~120% 之间。所有结果的总中间精密度为 11.66%。

2 工作参考品效价测定次数的理论计算

工作参考品建立或者换批时, 均应采用一级参考品进行标定。在本研究中, 对一级和候选工作参考品已进行了大量的头对头表征和理化特性比较, 结果证明二者高度相似 (结果未展示)。在此前提下, 本研究对于候选工作参考品活性赋值的策略是当候选工作参考品的相对效价水平为一级参考品的 95%~105% 时, 可将工作参考品的活性定义为 100%; 而偏离此范围时, 则认为此候选工作参考品不合适, 应另挑选别的批次作为候选工作参考品继续进行活性标定。

活性应标定的次数与所采用活性方法的中间精密度、预设的效价水平以及所期望的置信水平密切相关。本研究采用的活性测定方法的中间精密度为 11.66%, 可认为若采用该活性方法测定 100% 水平样品的效价, 得到的结果是以 100% 为均值, 11.66% 为标准差的正态分布。标定 n 次相对活性的均值则是以 100% 为均值, $11.66\%/\sqrt{n}$ 为标准误的正态分布。以此正态分布计算, 如表 1 所示, 当 n 为 15~22 时, n 次实验结果所测得的相对效价均值位于 95%~105% 的概率为 90.30% 至 95.56%; 效价均值的 95% 置信区间则从 94.10%~105.90% 至 95.13%~104.87%。当标定 22 次时, 只有 4.44% 的可能性落到预设的 95%~105% 的效价水平之外 (图 3A), 属于小概率事件。对于本研究, 只有当测定次数 n 至少为 21 时, 才有大于等于 95% 的概率使所标定参考品的效价水平位于 95%~105% 之内。

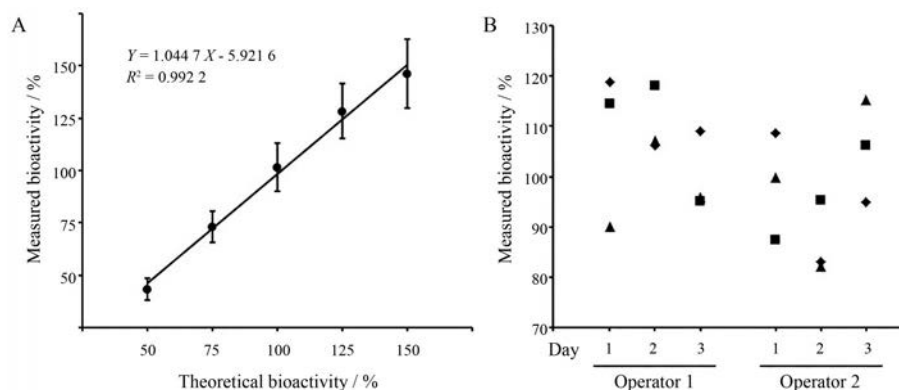


Figure 2 The correlation between theoretical and measured relative bioactivity as indicated (A) and the demonstration of measured relative bioactivities of sample at 100% bioactivity level for three times a day and three days by two operators respectively

Table 1 Theoretical probability of no more than 5% bioactivity shift and relative bioactivity width of 95% confidence for different number of bioassay replicates for working reference standard with 100% relative bioactivity

Number of bioassay replicates	Probability of a $\leq 5\%$ shift/%	Relative bioactivity width of 95% confidence/%
15	90.30	94.10–105.90
16	91.28	94.29–105.71
17	92.32	94.46–105.54
18	93.12	94.61–105.39
19	93.86	94.76–105.24
20	94.52	94.89–105.11
21	95.00	95.01–104.99
22	95.56	95.13–104.87

3 工作参考品的实际效价测定和赋值

按照上述理论计算,共设计了22次实验,以采用一级参考品标定候选工作参考品。第1~3天每天做3次测定,第4天做2次实验,4天共11次实验(四天只是说明做的天数,而非连续四天),由两个人分别进行上述11次实验,共22次实验,所测得的实验结果如图3B所示。22次实验均满足上述系统适用性要求(数据未展示),故均纳入统计。22次实验所测得的候选工作参考品效价的均值为101.96%,位于预设的95%~105%效价水平之内。因此,将候选参考品的效价水平定值为100%,认为该工作参考品可以代表商业化工艺及临床批次产品,不用再筛选别的批次作为工作参考品进行生物学活性标定赋值。另外值得注意的是,22次测定值的相对标准差为9.65%,与验证的中间精密度11.66%值较为接近,说明了验证工作中中间精密度值的可靠性。

讨论

在本文的实例中,先通过细胞生物学活性的方法学验证,得到相应的中间精密度。在已知方法中间精密度的情况下,计算要做多少次标定才能确保有至少

95%的概率使候选参考品(在假设其活性与一级参考品活性一致的情况下)的多次相对效价测定均值位于95%~105%之间(预设范围)。然后进行相应的次数标定,若均值位于预设范围的区间,则可认候选参考品为与一级参考品一致,即为100%;若位于预设范围之外,则认为候选参考品不具有商业工艺和关键临床批次代表性,应继续筛选其他批次进行标定。值得提出的是,在方法学验证中,短时间内的验证由于方法学参数变异有限,可能会过低的估计中间精密度的数值。工作参考品的建立或换批可能在方法学已经充分验证后很长一段时间之后,所以充分评估活性方法的中间精密度是十分重要的,本文中对于中间精密度的验证也应针对不同的活性实例进行充分优化。一般来说,变异较小的活性方法需要标定的次数较少,而变异较大的活性方法则需要标定的次数较多。

对于生物活性的赋值,所有的工作参考品批次均应与一级参考品进行比较标定,而不应采用前一批次工作参考品去标定后一批次参考品,以避免活性赋值的漂移。在进入商业化阶段以后,产品很可能具有很长的生命周期,所有批次工作参考品对标一级参考品的实际意义还在于商业化后的所有产品均可以溯源至关键临床,具有十分重要的现实意义。一级参考品的商业工艺和关键临床批次的代表性十分重要,所以在建立一级参考品时应进行充分评估。有生物制药企业采用关键临床的不同批次进行混合作为一级参考品,以使其具有充分的工艺代表性,有一定的借鉴意义^[8,9]。

在对工作参考品进行生物学活性进行赋值时,相应的指导原则相对比较缺乏,美国FDA在生物类似药的药学相似性指导原则中举例指出,对于新批次参考品,若多次测定相对效价均值在95%置信区间内位于原批次参考品90%~110%时,则可以将新批次参考品相对活性赋值为100%,并且不建议在相对效价测定中对参考品的赋值赋予校正系数^[11]。在本研究实例中,

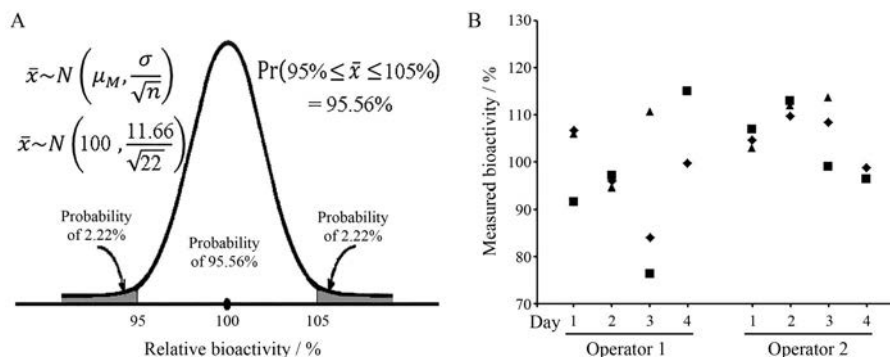


Figure 3 The normal distribution of mean values of relative bioactivity when the number of bioassay replicates are 22 (A) and the value distribution of measured relative bioactivities of candidate working reference standards as indicated (B)

把 90%~110% 缩小至 95%~105%, 对工作参考品的要求更高。在实际单抗研发中, 不同的厂家可能会采用不同的策略, 如也有制药企业做多次标定后取均值进行赋值, 或者多次测定的相对活性值的 95% 置信区间位于预先设定的合理范围时, 赋值工作参考品相对效价为 100% 等。但是不管什么方式, 均应向监管部门阐明其合理性。本研究的目标虽然是治疗性单抗, 但是对于其他治疗性重组蛋白同样是适用的, 希望本文对工作参考品生物学活性所进行标定赋值的策略, 可以为相应的生物制药企业起到一定的参考作用。

作者贡献: 于传飞负责设计实验思路、完成实验的主要部分、数据分析和文章撰写; 刘春雨负责完成实验的主要部分、数据分析和文章润色; 王兰负责设计实验思路和文章润色; 所有作者均对本文有所贡献。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

- [1] ICH Q7: Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients [M/OL]. 2000-11-10 [2020-09-01]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q7_Guideline.pdf.
- [2] EMA: Guideline on the Requirements for Quality Documentation Concerning Biological Investigational Medicinal Products in Clinical Trials [M/OL]. 2018-11-01 [2020-09-01]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-requirements-quality-documentation-concerning-biological-investigational-medicinal_en-0.pdf.
- [3] ICH Q6B: Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products [M/OL]. 1999-03-10 [2020-09-01]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q6B_Guideline.pdf.
- [4] ICH Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [M/OL]. 2005-11 [2020-09-01]. https://database.ich.org/sites/default/files/Q2_R1_Guideline.pdf.
- [5] FDA: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics [M/OL]. 2015-07 [2020-09-01]. <https://www.fda.gov/media/87801/download>.
- [6] FDA: Guidance for Industry: INDs for Phase 2 and Phase 3 Studies Chemistry, Manufacturing, and Controls Information [M/OL]. 2003-05 [2020-09-01]. <https://www.fda.gov/media/70822/download>.
- [7] White JR, Abodeely M, Ahmed S, et al. Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals [J]. *Biotechniques*, 2019, 67: 126-137.
- [8] Rieder N, Gazzano-Santoro H, Schenerman M, et al. The roles of bioactivity assays in lot release and stability testing [J]. *Bioprocess Int*, 2010, 8: 33-42.
- [9] Mire-Sluis A, Ritter N, Cherney B, et al. Reference standards for therapeutic proteins: current regulatory and scientific best practices and remaining needs, Part 1 [J]. *Bioprocess Int*, 2014, 12 (3): 26-36.
- [10] Mire-Sluis A, Ritter N, Cherney B, et al. Reference standards for therapeutic proteins: current regulatory and scientific best practices and remaining needs, Part 2 [J]. *Bioprocess Int*, 2014, 12 (5): 12-31.
- [11] FDA. Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations, Guidance for Industry [S/OL]. 2019-05 [2020-09-01]. <https://www.fda.gov/media/125484/download>.