

# 人用单克隆抗体质量控制技术指导原则

二 00 三年三月

# 人用单克隆抗体质量控制技术指导原则

本要点适用于供治疗的体内诊断用的利用杂交瘤技术制备的单克隆抗体，适用于在人体内应用的利用重复 DNA 技术制备的基因工程抗体

## 一、杂交瘤技术制备的单克隆抗体

### （一）杂交瘤细胞

#### 1. 亲本细胞

##### （1）骨髓瘤细胞

SP2/0 或其他适宜的骨髓瘤细胞系。应为不合成或不分泌免疫球蛋白链型，具有符合骨髓瘤细胞的染色体特征，并有明确的来源历史及符合要求的保存条件。

##### （2）免疫亲代细胞

经抗原免疫的鼠脾 B 淋巴细胞或外周血 B 淋巴细胞。

应有明确的免疫原来源、性质及动物种系，免疫原详细的制备过程。

适宜的免疫方案及免疫淋巴细胞制备的方法。

#### 2. 细胞融合与克隆化

采用适宜的方法进行融合、筛选及克隆化。

#### 3. 杂交瘤细胞检定

##### （1）抗体分泌稳定性

连续克隆化后抗体阳性率达 100%，经体外连续传代 3 个月以上和反复冻存、复苏，细胞系能保持稳定分泌特异性抗体。

##### （2）细胞核学特征

检查细胞分裂中期染色体，应符合杂交瘤细胞特征。

#### 4. 鼠源病毒检查

按附录要求检测鼠源病毒。

#### 5. 支原体检查

按现行《中国药典》生物制品无菌试验规程进行。

#### 6. 无菌试验

按现行《中国药典》生物制品无菌试验规程进行。

## （二）单克隆抗体的检定

### 1. 免疫球蛋白类及亚类

用免疫双扩散法或其他适宜的方法测定。

### 2. 亲和力

用可靠、准确的方法测定单克隆抗体（以下简称为单抗）的亲合常数或相对亲和力。一般情况下，对于免疫原为可溶性的单抗，测其亲合常数，对于免疫原为颗粒性抗原的单抗，测其相对亲和力。

### 3. 特异性

测定单抗对靶抗原的特异性；对多株单抗识别的抗原决定簇进行相关性分析。

### 4. 交叉反应

按附录要求。

免疫组织化学法测定单抗与人体组织交叉反应，用冰冻及石蜡包埋的各种正常脏器组织测定。来源于肿瘤相关抗原的单抗应进行与各种肿瘤组织的交叉反应试验。

### 5. 效价测定

用适宜方法测定。

## （三）其他原材料

### 1. 细胞培养用小牛血清

支原体检测应为阴性。经小量试验适于杂交瘤细胞生长。

### 2. 培养液

应有培养液来源，质量指标。

### 3. 化学试剂

规格应达到分析纯以上。

## 二、基因工程抗体

参考《人用重组 DNA 制品质量控制技术指导原则》和本指导原则中的有关要求进行。

## 三、细胞库的建立

应分别建立原始细胞库、主细胞库、工作细胞库的三级管理细胞库，一般情况

下主细胞库来自原始细胞库、工作细胞库来自主细胞库。各级细胞库应有详细的制备过程、检定情况及管理规定等。

#### 四、单抗生产

包括用小鼠腹水法和细胞培养法制备。

##### （一）小鼠腹水法

###### 1. 小鼠

制备腹水必需使用合格的 SPF 级 BACB/C 小鼠或 BACB/C 和瑞士小鼠杂交子一代。

###### 2. 动物实验设施

动物实验设施应有相关部门颁发的二级以上合格证。

###### 3. 腹水制备

取适量扩增培养的杂交瘤细胞注射小鼠腹腔制备腹水，小鼠可以预先用液体石蜡或降植烷等处理。

##### （二）细胞培养法

可以采用发酵罐培养，亦可用细胞培养瓶培养收集上清液制备单克隆抗体。培养基用无牛血清或低牛血清培养基，不能用-内酰胺类抗生素。

##### （三）抗体纯化

可采用盐析法、分子筛层析、离子交换亲和层析等适宜的方法。

1. 尽可能选用一些不引起免疫球蛋白聚合、变性等的纯化方法及条件。

2. 应验证所用的纯化方法能去除可能存在的非目标产物污染，如不需要的免疫球蛋白分子、宿主 DNA、用于生产腹水抗体的刺激物、内毒素、其它热原质、培养液成分或层析柱析出成分等。

3. 应验证所用的纯化方法能有效的去除/灭活病毒。

4. 连续产生的各批产品必须符合质检要求，批间具有良好的重复性。

###### 5. 纯化后处理

必要时对纯化后抗体采用适宜方法进行处理。

##### （四）半成品、成品制备

#### 五、检定

包括原液（小鼠腹水、细胞培养上清液、纯化抗体）、半成品及成品的

检定等。

(一) 物理化学检测

1. 外观

液体制剂应为接近无色微带乳光的澄清液体，不应含有异物、浑浊或摇不散的沉淀。

2. pH 值

电位法测定

3. 蛋白质含量的测定

用 Lowry 法或其它适宜的方法测定。

4. 纯度测定

(1) 电泳法

用还原和非还原条件 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳法。扫描后免疫球蛋白含量应达到 95%以上，二聚体 $\leq$ 10%。

(2) HPLC 法

纯度应 $\geq$ 95%。

(3) 多聚体测定

用 FPLC 或 HPLC 法，用适宜的分子筛层析，多聚体应 $\leq$ 10%。

5. DNA 含量测定

用 DNA 分子杂交法。每一剂量残余鼠骨髓 DNA 含量不高于 100pg。

6. 水分

产品如为冻干制品，应进行残余水分测定，其含量应 $\leq$ 3%。

(二) 生物学检定

1. 活性及效价测定

用适宜方法进行。

2. 鼠源病毒检定

同上鼠源病毒检查。

3. 无菌试验

同上无菌试验。

4. 支原体检定

同上支原体检定。

## 5. 安全试验

用小白鼠和豚鼠进行试验。

## 6. 热原质试验

按照现行版《中国药典》生物制品热原质试验规程进行。采用家兔法时，家兔注射剂量=（人用剂量/50）\*20\*家兔体重（kg）。也可用鲎试剂法，1mg/mL 蛋白浓度不应检测出有凝集活性。

## 7. 异常毒性实验

### （三）非免疫球蛋白杂质分析

包括来源于细胞基质、培养基和下游工艺的相关杂质，采用适当的技术和方法进行分析检测。

## 六、经修饰的单克隆抗体

为了提高单克隆抗体在治疗和体内诊断中的作用，常用单抗与毒素、药物、放射性核素或其它物质偶连形成免疫结合物，或在同一段多肽链包含非免疫球蛋白和免疫球蛋白序列的嵌合重组蛋白来获得。研究者除对前面提到的有关未偶连单克隆抗体（未修饰单克隆抗体）的要求外，还应提供下列内容：

### （一）免疫结合物的构建

应提供构建免疫结合物所用试剂和过程的详细资料，包括：

1. 描述与单克隆抗体连接的成分如：毒素、药物、酶及细胞因子，包括：所有成分的来源、结构、制法、纯度及特征。

2. 制备免疫结合物所用化学试剂的描述，如连接剂和螯合剂。这些资料应该包括试剂来源、制备方法，以及合成或纯化时残留杂质的测定等内容。还应提供合成反应途径的图解，以及与免疫结合物中所用化学试剂毒性相关资料。

3. 在确定成品的标准时应首先确定该原料与抗体的平均结合率及每个抗体被结合部分的数量，并揭示免疫球蛋白置换数量、效力和稳定性间的关系。

4. 用重组 DNA 技术制备的制品（如来源于转染细胞系或微生物培养基，嵌合的、易形的，互补决定区 [CDR] 接合的及单链 Fv 抗体，以及重组免疫结合物）应提供构建和置备过程的全部资料。重组免疫结合物的稳定性应认

真研究。因聚合物形成构形改变或变性而减弱了特异免疫反应性（如通过重组 Fvs 形成“双抗”）可能导致药代动力学的改变和/或与靶组织结合。

#### （二）免疫结合物的纯度

1. 应采取特殊措施保证抗体尽可能无外源免疫球蛋白或非免疫球蛋白污染，因这些污染物质在构建免疫结合物过程中，能与核素、毒素或药物发生反应。

2. 应规定最终产品中游离抗体或游离组分的限量。活性中间体应被灭活或去除。

#### （三）免疫结合物的免疫反应性，效力及稳定性

毒素或药物偶联至抗体上会改变其中任一成分的活性。

1. 应采用适当的方法；评估偶联前后的免疫反应性。

2. 免疫结合物非免疫球蛋白成分的活性应在适当的时候用效力试验来进行评估（例如，毒素、细胞因子或酶等），用于造影的放射性免疫结合物除外。

3. 免疫结合物构建后，应确定免疫反应性变化的百分率限值，并作为产品规格的组成部分。

4. 应通过在合并的人血清中 37℃ 无菌条件下孵育，来检测免疫结合物在体外的稳定性。假如所用抗凝剂不会影响免疫结合物的稳定性，血浆可以用来代替血清。经过规定间隔时间分析样品中完整免疫结合物及分解产物的浓度。应详细说明评估产品的稳定性的条件及所用阴、阳对照。

#### （四）与放射性核素偶联单克隆抗体的特殊问题

免疫结合物应用标准化的、严格控制并经过验证的方法制备。应建立检测游离同位素、结合单克隆抗体、标记的非免疫球蛋白物质的放射性百分率的方法。

1. 放射性标记单克隆抗体的初始研究用新药申报包含连续 3 次放射标记试生产的分析结果，应证明所制备的产品未改变免疫特异性、无菌、无热原质。放射性标记试生产应由在研究中对单克隆抗体进行放射性标记及使用试剂的同一组人员进行。

2. 制备免疫结合物时应使用放射性药品及同位素并提供其无菌及无热原质的分析证书及横向参比的信函。

3. 在标记试生产过程中，应测定最终产品中共价结合的和游离的同位素的浓度，以及标记试剂及其分解产物的残留水平。

4. 应描述给每一个病人应用前后进行的质控试验。

5. 适当的时候，应检测免疫结合物形成胶体的情况，并对其进行限定。

6. 有关单抗制备中放射性标记物的质控标准参考国家关于放射性药品规定。

## 七、产品稳定性

产品稳定性应满足临床方案制定的要求。加速稳定性试验资料可作为产品审批及标定用，但不能代替实际的稳定性资料。

(一) 应制定稳定性检定规划，包括在规定效期全过程中，每间隔一定时间进行制品的物理化学完整性试验（如断裂或聚合），效力试验，无菌试验，以及水分、pH 和防腐剂的稳定性测定。

(二) 确保制品生物活性的稳定性试验（例如定量体外效率试验）应包括厂内参比品。如可能在试验的全过程中只使用一批试验抗原（如：纯化的抗原、细胞或组织）。应用定量效力试验使对生物活性进行有意义的比较成为可能。

(三) 加速稳定性试验，既将制品储存在温度高于常规储存温度后的稳定性试验，可能有助于鉴定及建立稳定性指示试验。表示稳定性的特定参数应通过对每一批制品用趋向分析方法进行监测。

## 八、临床前研究

由于生产条件或配方的改变可引起制品生物活性的明显变化。因此，建议在临床前研究中所使用的单抗应与临床试验中拟使用的单抗的生产工艺一致。

### (一) 交叉反应性试验

当相同或相关抗原决定簇在人的非预定的细胞或靶组织表达时，可观察到抗体与它们结合。非靶组织结合可能具有严重后果，特别是使用药理活性抗体或细胞毒性免疫结合物时。因此，一般在 I 期临床试验前应经过用人组织或细胞进行交叉反应性或非靶组织结合的实验室检测。对于双特异性抗体，除检测双特异性产品外，还应对每株亲本抗体进行逐个评估。

### 1. 检测交叉反应性的体外试验

目前，用人细胞或组织进行免疫细胞化学及免疫组织化学技术检测，应使用有效的并被确认的新技术（参照 1. 2. 4）。

### 2. 测定交叉反应性的体内试验

当有适当模型时，单克隆抗体与非靶人组织的交叉反应性应在动物中进行一次综合的体内试验。试验结果，特别是对具有溶细胞性的免疫结合物或具有 ADCC 活性的抗体，通常要求进行更广泛的临床前试验，包括用一种以上动物超剂量及重复剂量进行动物试验。设计临床试验时应考虑对非靶组织的定位。

## （二）临床前药理学和毒性试验

1. 设计单克隆抗体临床前安全试验是为了预测在人体中可能的毒性评估在人体中潜在不良反应副作用的可能性和严重程度，并可能确定安全初始剂量和逐步提高剂量。有关单克隆抗体的临床前试验，包括免疫原性、稳定性、组织交叉反应性和效应功能。

### 2. 动物毒理学研究

当设计单克隆抗体的毒理学试验时，应考虑如下：

（1）若被试样品为未偶联抗体，且无合适的动物模型或无携带相关抗原的动物，且与人组织交叉反应性试验明显阴性，则毒理学试验不是必须的。

（2）动物体内相关抗原的性质与人体内相关抗原的生物学分布、功能及结构应具有可比性。但是，对于所用的动物模型，不必要求对单克隆抗体的抗原密度或亲和力绝对相等。例如，结合力差异可通过增加剂量或服药频率来弥补。应鉴定动物和人之间存在的抗原数，单克隆抗体的抗原亲和力或对单克隆抗体结合的细胞应答反应等方面存在的差异。这可以更精确的推断人用的安全初始剂量, 并评估安全范围。

（3）对单克隆抗体通常不要求进行常规诱变性的评估。

（4）拟给育龄妇女反复或长期使用的产品，应该用适当的动物模型进行反复的深入的研究包括致畸试验。

### 3. 药效学和动物药代动力学

（1）当有动物模型时，则应尽可能证明药理学效应与剂量的依赖性，以及有效剂量的范围，可以更好地预测治疗指数；当无适合动物模型时，则应尽可能以人外周血、组织器官等进行体外药效学研究。当有动物模型时，药代

动力学的有关资料（生物学分布，半衰期等）可以从动物模型中得到；当无适合动物模型时，动物药代动力学可以考虑不做，加强临床试验时药代动力学方面的监控。

（2）下列方面可以指导药代动力学及药效学试验动物种类的选择：

①最好选择与人有交叉反应或相同靶抗原的动物模型来进行试验。对于仅抗人而未在动物模型中表达的人抗原或外源抗原（细菌，病毒等）的未偶联单克隆抗体，可以不必用缺乏靶抗原的动物做试验。

②当有抗原结合资料表明灵长类为最相关种属时，则对未偶联的单克隆抗体的试验采用非人灵长类动物是适宜的。

③应对使用正常啮齿类动物和鼠异源移植模型精确预测单克隆抗体在人体的药代动力学行为的可能性进行严格评估。异源移植模型对评估单克隆抗体与人体内肿瘤结合的能力更有意义。

（3）鼠源抗体对于小鼠为非免疫原性物质，但在人体内具免疫原性，这就使得在鼠内所得的重复剂量结果难以推至拟在人体内使用的重复剂量。使用完全人源的、嵌合的或“人源化的”单克隆抗体将出现相应的问题，在这种情况下用啮齿类动物进行重复剂量的研究意义不大。

#### 4. 用免疫结合物进行的临床体内研究

（1）应在体内试验免疫结合物的稳定性

①应测定免疫结合物中每个组分在动物体内药代动力学和组织分布，并且与未偶联抗体的分布相比较。

②不同组分的靶组织和他们能引起的潜在的毒性应被证实。

（2）由于免疫结合物可能被降解或作用位点的活性不是单克隆抗体与靶抗原结合的结果，应对含有放射性核素、毒素或药物的免疫结合物进行动物毒性实验，尽管该种动物不存在靶抗原。根据免疫结合物组分的性质和其偶联的稳定性，对组分分别进行试验是有道理的。应充分描述每个组分的毒性情况、副反应的发生和严重程度。所得结果应与结合物稳定性试验密切相关。如可能，应用具有相关靶抗原或疾病模型动物体内进行免疫结合物试验，如果不存在靶抗原阳性动物就在啮齿类动物体内进行。游离毒素或核素的毒性试验可在不同类动物中进行。

(3) 对于放射性核素的免疫结合物:

①动物生物分布的资料可被用于对初始人用剂量的评估。

②如可能, 表达靶抗原的动物模型更有可能发现抗原“减少”或带有在生物分布和/或毒性方面表现意外抗原的组织。

③异源移植模型可以组织定位和抗原非特异放射性免疫结合物分布问题, 但对确定一般组织交叉反应范围没有帮助。

④应研究适宜的动物数量以用一个可接受的变异系数(通常小于 20%)对放射性剂量进行评估。

⑤对于使用放射性总量的新陈代谢和测定从早到晚清除期时间点的适当数值应有完整计算。

⑥放射性免疫结合物应通过在血清或血浆中孵育检测体外稳定性。应建立方法来评估游离表位, 偶联单克隆抗体, 标记的非单克隆抗体三种中每成分存在的放射性百分比。

说明: 对局部外用和制备体外诊断试剂盒单克隆抗体要求参照上述相关部分执行, 但其生产条件、小鼠清洁级别、抗体纯度和安全试验可根据实际需要降低或减少要求。

#### 附录: 鼠源性病毒检测

##### 1. 被检病毒

人用鼠源性单抗制品中可能含有潜在污染的病毒见下表。

组	病毒	受影响动物
I	出血热病毒	大鼠, 小鼠
I	淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)	大鼠
I	3 型呼肠孤病毒 (REO)	大鼠, 小鼠
I	大鼠轮状病毒	大鼠
I	仙台病毒	大鼠, 小鼠
II	脱脚病病毒	小鼠

II	KITHAM 氏大鼠病毒 (KRV)	大鼠
II	小鼠腺病毒 (MAV)	小鼠
II	小鼠肺炎病毒 (PVM)	小鼠
II	逆转录病毒	大鼠, 小鼠
II	TOOLAN 病毒 (HI)	大鼠

前五种病毒属 I 组, 为能够感染人与灵长类动物的病毒, 后六种属 II 组, 为目前尚无迹象表明感染人, 但对人类具有潜在危险性, 能在体外培养的人和猿、猴源性细胞中进行复制, 这些病毒应作为重点进行检测。

## 2. 样品

包括细胞株、腹水、动物血清、单抗半成品和成品等, 用适宜方法预处理。

## 3. 试验方法

包括细胞试验、动物抗体产生试验、鸡胚感染试验等。

### 3. 1 细胞实验

细胞及培养上清液分别接种人 2BS、Vero 细胞, 培养, 传两代后制片, 用间接免疫荧光法检测病毒抗原。

### 3. 2 动物抗体产生试验

样品接种出生 24 小时以内乳鼠 10 只 (i. m); 15~20g 成年小鼠 20 只 (i. mti. p: 10 只接种样品, 10 只作为对照); 小鼠 20 只 (i. c: 10 只接种样品, 10 只作为对照)。观察 4 周存活率应在 80% 以上, 用 ELISA 或其他适宜的方法检测血清中病毒抗体。

### 3. 3 鸡胚感染试验

应用鸡胚接种进行检查, 可用 9~11 天龄的鸡胚, 将样品注射于 10 个鸡胚的绒毛尿囊膜、尿囊腔及卵黄囊中。接种后鸡胚至少在 5 天后才能进行检查。并用豚鼠、鸡或其它禽类的红细胞检查尿囊液中是否含有血凝素。

## 4. 检测范围

---

样品	细胞实验	动物抗体产生试验	鸡
胚感染试验	备注		

原始细胞					
库	+	-		+	每批检
查					
主细胞					
库		+	-		+
		每批检查			
工作细胞					
库	+	-			+
		每批检查			
鼠					
群		-	+		
	-	定期抽查			
腹					
水		-	+		-
+		每批检查			
细胞培养法制					
备					
			每批检查		
单抗的上清液					

---