

冷冻干燥技术及冻干抗体药物的研究进展

靳力 刘春红 韩军 王庆鹏 张宁 张瑞岩

(聊城大学 生物制药研究院, 山东 聊城 252059)

摘要 近年来,恶性肿瘤等疾病的发病率不断上升,造成极大的社会和经济负担.抗体药物,特别是单克隆抗体药物有效克服了传统药物的缺点,具有靶向性好、毒副作用低、疗效显著等特点,在这些疾病的治疗中得到了广泛的应用.由于抗体药物在液体制剂中不够稳定,极大的限制了抗体药物应用,冷冻干燥技术有效解决了这一问题,显著提高了抗体药物的稳定性,已成为抗体药物制剂的研究热点.该论文综述了冷冻干燥技术的研究进展并介绍了已上市的冻干抗体药物,为提高抗体制剂的稳定性以及抗体药物冻干制剂的研发提供参考依据.

关键词 冷冻干燥;单克隆抗体;药物制剂;抗体-偶联药物(ADC)

中图分类号 R944

文献标识码 A

0 引言

冷冻干燥(Freeze-Drying),全称真空冷冻干燥(Vacuum Freeze Drying),简称冻干(lyophilization),是在低温减压的条件下利用水的升华性能,使药物低温脱水而达到干燥目的的一种技术^[1].自诞生以来,冻干就被应用于各行各业,尤其在生物医药方面应用广泛.抗体药物亦称为治疗性抗体,特指单克隆抗体治疗药物(单抗药物).如今,抗体虽然在医药领域应用越来越广泛,但是抗体药物制剂面临诸多挑战.因为许多抗体药物在液体状态下不够稳定,并且易于发生化学和物理降解,导致抗体药物治疗活性降低或者产生潜在免疫原性产物^[2].冻干作为目前一种相对有效的技术,可将抗体制剂转化为固体形式,从而使抗体药物化学或物理降解反应受到抑制,提高其长期稳定性,同时使药物活性损失最小.此外,固体剂型药物还具有易于搬运和储存,显著降低运输成本等优点^[3].1998年,冻干药物占有可注射或可输注药物的11.9%,到2015年,冻干药物占有此类药物的近一半,表明冻干技术在药物制剂中的应用愈发广泛^[4].与此同时,其在抗体药物制剂中的应用越来越得到人们的重视.截止2018年12月,已有80多种不同剂量规格的抗体治疗药物获准上市^[5],其中抗体冻干制剂有26种(表1).

冻干技术虽然在抗体药物制剂中的应用越来越广泛,但是抗体冻干也存在不足之处.如生产成本低、产量低、冻干时间长及效率低等.因此,如何利用冷冻干燥及新型辅助技术进行抗体冻干,达到既保证抗体的质量,又能提高冻干效率和降低生产成本的目的,是冷冻干燥技术在抗体药物制剂领域发展的重要研究课题.为了对冷冻干燥技术有一个全新的了解,本文综述了冻干技术的研究进展,并介绍了已上市的冻干抗体药物.以期对冻干技术在抗体药物制剂中的应用和研发有所助益.

1 冻干工艺过程的研究

冻干是一种以从液体配方中去除溶剂为核心原理的工艺过程,是目前制造和储存抗体等蛋白质类药物的重要手段.从配方中除去或抑制溶剂中促进化学和物理降解途径的各种影响因素,可以显著延长药物制剂的保质期.尽管冻干价格昂贵,但仍然是保持这些高活性分子稳定性的一种非常温和的制剂方法.冻干工艺涉及两个重要的过程:(1)冷冻,在此过程中大部分溶剂转化为冷冻固体;(2)干燥,在此期间几乎所有溶剂(冷冻和未冷冻)从配方中除去.基于干燥的机理,将干燥过程进一步分为两个步骤,即初级干燥和二次干燥.

收稿日期:2019-04-14

基金项目:国家自然科学基金项目(21807056);山东省科技计划项目(2014GSF118121);山东省自然科学基金项目(ZR2013HZ002);山东省抗体制药协同创新中心开发课题(CIC-AD1834, CIC-AD1829, CIC-AD1839)资助

通讯作者:张瑞岩,男,汉族,博士,讲师,研究方向:蛋白质结构与功能, E-mail: zry147896@163.com.

表1 已上市冻干抗体药物

商品名	活性成分	给药途径	剂型	剂量/规格	稳定剂	其他辅料
Adcetris	Brentuximab Vedotin	IV	Lyophilisate	50 mg/vial	Trehalose	Polysorbate80
Benlysta	Belimumab	IV	Lyophilisate	120 mg,400 mg	Sucrose	Polysorbate80
Besponsa	Inotuzumab ozogamicin	IV	Lyophilisate	0.9 mg/vial	Sucrose	Polysorbate80
Blinicyto	Blinatumomab	IV	Lyophilisate	35 mcg	Trehalose	Polysorbate80
Cimzia	Certolizumab pegol	SC	Lyophilisate	200 mg	Sucrose	Polysorbate
Cosentyx	Secukinumab	SC	Lyophilisate	150 mg/mL	L-histidine/L-histidine hydrochloride/Sucrose	Polysorbate80
Empliciti	Elotuzumab	IV	Lyophilisate	300 mg,400 mg	Sucrose	Polysorbate80
Entyvio	Vedolizumab	IV	Lyophilisate	300 mg	L-histidine/L-histidine monohydrochloride/L-arginine hydrochloride/Sucrose	Polysorbate80
Herceptin	Trastuzumab	IV	Lyophilisate	21 mg/mL	Trehalose /L-histidine HCl monohydrate /L-histidine	Polysorbate20
Herzuma	Trastuzumab-pkrb	IV	Lyophilisate	420 mg	Trehalose /L-histidine HCl monohydrate /L-histidine	Polysorbate20
Ilaris	Canakinumab	SC	Lyophilisate	180 mg	Sucrose/L-histidine HCl monohydrate /L-histidine	Polysorbate80
Inflectra	Infliximab-dyyb	IV	Lyophilisate	100 mg	Sucrose	Polysorbate80
Ixifi	Infliximab-qbtx	IV	Lyophilisate	100 mg/vial	Sucrose	Polysorbate80
Kadcyla	Ado-trastuzumab emtansine	IV	Lyophilisate	100 mg,160 mg	Sucrose	Polysorbate20
Keytruda	Pembrolizumab	IV	Lyophilisate	50 mg	Sucrose/L-histidine	Polysorbate80
Lumoxiti	Moxetumomab pasudotox-tdfk	IV	Lyophilisate	1 mg/vial	Glycine/Sucrose	Polysorbate80
Mylotarg	gemtuzumab ozogamicin	IV	Lyophilisate	4.5 mg	Dextran 40/Sucrose	
Nucala	Mepolizumab	SC	Lyophilisate	100 mg	Sucrose	Polysorbate80
Ogivri	Trastuzumab-dkst	IV	Lyophilisate	420 mg/vial	D-sorbitol/L-Histidine/L-Histidine hydrochloride	Polyethylene glycol 3350/Macrogol 3350.
Ontruzant	Trastuzumab-dttb	IV	Lyophilisate	150 mg	Trehalose/ L-histidine HCl monohydrate/L-histidine	Polysorbate20
Remicade	Infliximab	IV	Lyophilisate	100 mg	Sucrose	Polysorbate80
Renflexis	Infliximab-abda	IV	Lyophilisate	100 mg	Sucrose	Polysorbate80
Simulect	Basiliximab	IV	Lyophilisate	10 mg,20 mg	Sucrose/Glycine	Mannitol
Sylvant	Siltuximab	IV	Lyophilisate	100 mg,400 mg	Sucrose/L-histidine	Polysorbate80
Synagis	Palivizumab	IM	Lyophilisate	50 mg/vial,100 mg/vial	Histidine/glycine	Mannitol
Xolair	Omalizumab	SC	Lyophilisate	150 mg/vial	Sucrose/L-histidine hydrochloride	Polysorbate20
					monohydrate/L-histidine	

注:IV 静脉注射,SC 皮下注射,IM 肌肉注射,以上数据来源于美国 FDA 官网。

1.1 冷冻和退火过程的研究

在冷冻干燥装置中,首先对药物制剂进行冷冻,将液态的物料冷冻结晶成固态的形式.其目的是为了创造一个最佳的冰晶结构,以促进蒸汽从固态骨架扩散,使大部分溶剂(95%以上)转化为冷冻固体^[6].一般来说,冷冻过程分为三个阶段,即冷却阶段,液体配方从初始温度冷却至凝固点温度;相变阶段,即第一冰核形成和冰晶生长的阶段;凝固阶段,即所有冰晶都完成生长^[7].在这三个阶段,控制过冷程度的能力对于生产具有一致和相似冷冻行为的批次是至关重要的.在形成第一个冰核之前,溶液保持过冷状态的程度称为过冷

度^[8]. 而过冷度是平衡冻结温度^[9]与成核温度(T_n)之间的温差,因此, T_n 是冷冻过程中需控制的主要关键参数. 因为水冻结成冰核是一个随机过程,所以 T_n 的差异不仅存在于不同批次之间,而且存在于同一批次不同瓶之间,导致产品冻结差异性^[10]. 较低的 T_n 使冰核形成较小的孔,导致产品耐受性更高,干燥时间更长. 但较高的 T_n 并不一定会使初级干燥时间减少,相比之下,一个适合的 T_n 可以确保药品在西林瓶中完全成核^[10]. 另一方面,由于环境更清洁(100级)生产规模的冻干机中的冰成核温度通常远低于实验室规模的冻干机. 因此, T_n 的合理选择既是工艺开发问题也是工艺放大问题^[11].

近年来,控制成核技术取得一些新的研究成果. 例如,用惰性气体对药品进行加压或减压,使其在所需温度下实现自发冰成核^[12]. Rambhatlae等^[11]和Patel等^[13]描述了一种使用冰雾在真空冷冻干燥过程中诱导成核的方法. 他们分别在大气压和真空压力下将冷氮气引入潮湿的冻干箱药品室中,产生冰雾,进而在药品容器中形成冰核. 在满载生产规模的冻干机中,冰雾在药品容器中形成冰核的均匀性是具有挑战性的. 因为很难确保每个西林瓶中同时注入有效晶种. 另外,超声波诱导成核的有效性已在实验室规模上得到验证^[14,15,16]. 还有一些成核技术可以通过控制冰成核温度来解决工艺开发和扩大问题^[17,18]. 尽管这些技术对控制冰成核取得一定的效果,但应用于生产规模的冻干机仍需继续深入研究^[19]. 另外,Awotwe-Otoo D等研究表明,控制单克隆抗体(IgG3 κ)在冻干过程中冰成核有助于更高效冻干循环,也有利于提高冻干药品的质量^[20]. 另一项研究表明,冷冻过程的控制成核有利于总干燥时间的缩短,更好的控制冻干制品的均匀性^[21]. 药品冷冻的好坏与否,直接会影响接下来两个阶段的干燥特性. 此外,冷冻是影响原料药特别是蛋白药物的生物活性和稳定性的关键步骤. 所以冷冻对冻干工艺的优化至关重要.

在冻结过程特别是快速冻结过程中,配方中有些结晶成分往往不能完全结晶. 如果该成分能为冻干药品结构提供必要的支撑或抗体在该成分完全结晶后会更稳定,那么在升华干燥前必须将其结晶. 因此,为了使这些成分结晶,将货架温度提高到玻璃化转变温度 T_g 以上,并保持预定的时间,这个过程称为退火. 退火通常用于促进活性或膨化剂的结晶,同时也可以提高瓶间冰晶尺寸的一致性和干燥程度^[22-25]. 它不仅能够显著提高初级干燥速率和改善冻干饼状物外观,还可通过允许大的冰晶生长以牺牲小的晶体(奥斯特瓦尔德成熟)来减少批间的异质性^[26]. 如果应用退火,则退火温度和时间的选择是至关重要的. 这是因为退火期间的较高温度增加了退火物质的扩散流动性,并且增加了退火过程的时间,使熔化的冰晶扩散到存活的冰晶中^[27]. 另外,有研究表明退火可能促使某些蛋白质结构的构象变化,或晶相-非晶相分离而导致蛋白质不稳定^[28]. 但最近Jun Yeul Lim等研究报道,对依那西普进行冻干时引入退火的步骤,通过圆二色光谱观察和分析依那西普(蛋白类药物)二级结构含量的变化,发现退火有利于保持蛋白质的稳定性,并缩短冻干过程的时间^[29]. 因此,对于蛋白质药物可以谨慎选择退火操作.

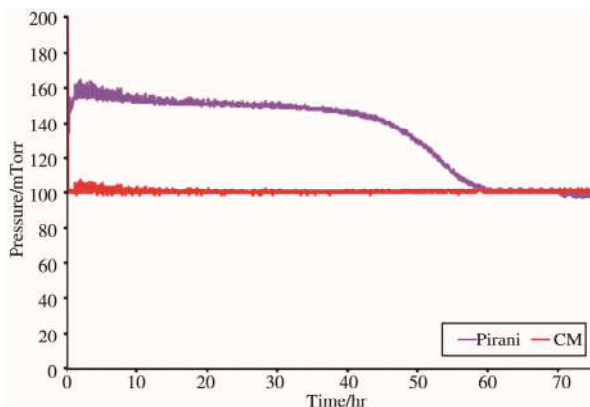
1.2 干燥过程的研究

干燥,是冻干过程的核心步骤. 干燥分为初级干燥和二次干燥. 初级干燥也称为升华干燥,是在真空的条件下,将固态药物保持在 $-60\text{ }^\circ\text{C}$ 或更冷的冷凝器中使其升华的过程. 这个过程是通过降低室内压力和略微升高隔板温度来实现的. 升华干燥是冻干周期最长的部分. 因此缩短干燥时间和提高干燥速率是干燥过程需要解决的问题. Julian H. Gitter等研究表明,微波辅助冷冻干燥(MFD)能够将IgG1单抗冻干过程缩短75%以上. 此外,MFD还适用于各种相关的抗体制剂,在保持产品质量的同时,能显著缩短干燥时间. MFD有潜力成为传统冷冻干燥(CFD)的替代方法,是未来持续药物冷冻干燥的重点研究内容^[30]. 另外,Swapnil K. Pansare等提出采用单步干燥的方法,他们研究发现与传统的冷冻干燥工艺(两步干燥法)相比,单步干燥方法确实可以使冻干过程具有较高的产量. 并且在实验室和中试规模的冻干机上采用单步干燥的方法,与两步干燥方法相比,干燥时间显著缩短(至少40%)^[31]. 然而,对于单步干燥过程,大部分干燥都是在非稳态传热传质过程中完成的. 加之,单步干燥过程可能会出现阻塞流和冷凝器过载等现象. 因此,需要仔细评估单步干燥工艺从实验室到中试再到商业规模化的转移.

由于初级干燥时间不足会过早进入二次干燥而导致产品塌陷或回熔,而初级干燥时间过长则会导致不必要的周期延长. 所以,准确判断初级干燥的终点至关重要. 目前,有几种技术可用于判断初级干燥的终点^[32,33]. 但这些技术应用于生产规模的冻干机仍不多见. 皮拉尼压力仪(Pirani Gauge)是一种廉价且可靠的判断干燥终点的仪器,用于在实验室和生产规模的冻干机上确定一次干燥的终点. 在初级干燥过程中,由于水蒸气的导热系数约为氮气的1.6倍,所以皮拉尼压力计的读数比电容式压力计(Capacitor Pressure Gauge)高约60%. 在一次干燥结束时,皮拉尼压力急剧下降,因为气体成分从大部分水蒸气变为大部分氮气,图1显示了一次干燥过程中典型的皮拉尼压力曲线^[32]. Hidenori Kawasaki等采用升华速率测温系统(Temperature Measurement by Sublimation Rate, TMbySR)进行温度测量,监测产品温度(T_b)值,并确定

初级干燥的终点. 实验表明, TMbySR 系统是实验室规模有前景的初级干燥终点的判断工具^[33].

二次干燥, 也称解吸干燥, 是指在初级干燥除去冰(自由水)后, 在二次干燥过程中除去未冻结的结合水(吸附在干燥的滤饼表面). 在初级干燥结束时, 搁板温度会随着时间的增加而升高, 应注意不要使搁板温度升高过快而使冻干制品塌陷. 此外, 应保持解吸压力与初级干燥时的压力相同. 虽然一些研究报道了在冻干设备可以达到的最低压力下进行二次干燥, 但是没有任何证据证明最低压力可以加速脱附过程^[34]. 另外, 只有在初级干燥完成后才开始二次干燥, 因此, 确定初级干燥结束的时间尤为重要. 在二次干燥过程中, 冻干药品的最终残余水分需要精确控制, 因为许多产品可能会被过度干燥所破坏, 从而导致储存时药物活性的损失, 以及随着时间的推移, 残余的水分会加速药物降解^[35]. 在大多数情况下, 二次干燥后需要将水分控制在 1% 以下^[36].



注: Pirani: 皮拉尼压力, CM: 电容压力
图1 典型的皮拉尼压力曲线^[32]

1.3 边缘瓶效应和临界配方温度

在冻干过程中, 药品溶液通常是被装在西林瓶中. 没有被其他六个小瓶包围的任何小瓶被定义为边缘瓶. 在初级干燥期间, 边缘瓶通过来自冻干机内壁和门的辐射接收额外的热传递, 其温度高于搁板. 与同批次的其余部分(即中心小瓶)相比, 该温度差异使边缘小瓶获得更高的产品温度, 从而导致更短的初级干燥时间. 在初级干燥过程中, 关键是要确保产品温度保持在最大允许限值以下, 以保持批次间的产品质量, 这不仅适用于中心样品瓶, 而且还适用于边缘样品瓶. 此外, 由于有机玻璃门和具有高发射率的表面, 边缘小瓶效应在实验室规模的冻干机中更明显. 在生产规模的冻干机中, 门和表面是高度抛光的不锈钢, 具有相对低的发射率. 因此, 在扩大冷冻干燥过程时需要考虑干燥机设计中的这些差异, 以确保边缘瓶和中心样品瓶的药品热性能不会发生变化^[37,38].

初级干燥的关键参数是临界配方温度, 它限制了冻干药品所能承受的最大热量. 对临界配方温度的测量是冻干工艺优化的必经之路, 研究显示, 在运行过程中产品温度增加 1°C 可使初级干燥时间缩短 13%^[39]. 新的分析技术和分析仪器为获得更好的冻干药品和缩短循环时间提供了有力保障. 近几十年来, 差示扫描量热法(DSC)常用来确定冻干样品的玻璃化转变温度 T_g , 以用作临界配方温度. 如今人们知道, 冻干显微镜(FDM)测得的塌陷温度 T_c 能更好地反映干燥和崩塌的情况^[24]. T_c 和 T_g 相比, T_c 值比相应的 T_g 值高很多(通常情况 2-5 °C)^[40]. 对于冻干工艺设计和优化来说, T_c 代表了与现实更贴近的温度. 另一方面, T_g 是一个温度区间, 而不是单个温度^[41]. 显然, 如何使用一个玻璃化转变的“开始”或“终点”进行工艺设计, 需要进一步的研究. 如今, 冷冻干燥显微镜对于冻干工艺研究和开发越来越重要, 同时也提出了最佳的方法、解释和设备等问题. 如 Korang-Yeboah M^[42] 等人研究显示, 应用光学相干层析成像冷冻干燥显微镜(Oct-FDM)测得的 T_c 值设计的冷冻干燥循环比传统循环具有更高的升华率和质量流量, 明显提高了冻干工艺效率和产品质量. Oct-FDM 在冻干工艺设计和性能上具有良好的适用性. 采用 Oct-FDM 技术预测的冷冻干燥临界过程控制极限高于 DSC 测量的 T_g 值, 对于所研究的模型分子, Oct-FDM 允许在较高的货架温度下进行冻干, 这大大减少了加工时间和生产成本. 目前, 针对这项技术正在进行更多的研究. 另外, Jacqueline H^[43] 和 Kasper J C^[44] 等研究光纤系统(OFS)作为分析 T_c 和 T_g 的替代新型技术. 与传统的技术相比, OFS 具有更高的灵敏度、更快的反应速度和更好的分辨率. OFS 可以同时分析 T_c 和检测赋形剂的结晶行为. 这些优点使 OFS 在冻干工艺中成为一种极具价值的过程监测工具. 合理的冻干工艺设计是建立在具有代表性和准确性的临界配方温度测量的基础上, 因此采用新型的技术研究确定临界配方温度等关键参数, 对冻干工艺的优化起着至关重要的作用.

1.4 冻干工艺研发的主要目标

冻干是一个动态的过程, 检测得到的参数也应是一个区间, 通常分为起点和终点, 而不是我们经常认为的某一个临界点. 所以应该对测得的参数进行综合的分析, 用来指导配方及工艺的设计, 而不是仅仅依靠某一个点或者参数进行判断. 对于冻干工艺的设计与开发主要是为了以最小的批内和批间异质性获得稳定而良好的冻干制品, 尽量减少加工的成本, 并开发一种可扩大且易于在不同冻干机之间转移的工艺. 为了能够实现这些目标, 定义和控制过程关键参数至关重要, 表 2 列出了几种广泛用于监测和控制关键工艺参数的技术.

表 2 冻干工艺 PAT 的应用

步骤	物理参数	过程分析技术(PAT) 工具	可能影响冻干制品质量的因素
冻结	成核温度	冰雾法 控制成核技术	
		压力测温方法:Manometric Temperature Measurement(MTM)[45],Dynamic Parameters Estimation(DPE)[46]	
升华	产品温度	无线温度测控系统(TEMPRIS)[47]	产品外形
	干燥时间		残余水分
干燥	升华速率	冻干控制系统	复溶时限
	气体流速	皮拉尼真空计	物理稳定性
解吸干燥	产品升华阻力	残余气体分析技术(RGA)[48]	
	西林瓶传热系数	光谱技术	
	残余水分		
	产品温度	可调谐激光吸收光谱技术(TDLAS)[49,50]	
	干燥时间		

2 采用冻干形式的抗体药物研发现状

2.1 单抗药物

单抗即单克隆抗体(Monoclonal antibody, Mab),治疗性单克隆抗体的商业开发始于20世纪80年代初,自1986年第一个单抗药物问世以来,全球已有80多个单抗上市.如今单克隆抗体药物已发展成为市场上的主导产品之一,广泛应用于肿瘤和自身免疫疾病等治疗.目前,市售的单抗制剂中冻干制剂有很多,如曲妥珠单抗(Trastuzumab,商品名 Herceptin)、博纳吐单抗(Blinatumomab, Blincyto)、英夫利昔单抗(Infliximab, Remicade)、赛妥珠单抗(Certolizumab Pegol, Cimzia)、苏金单抗(Secukinumab, Cosentyx)等.近年来,生物类似药正受到前所未有的关注,针对巨大的生物类似药市场,各国纷纷出台相关政策,促进生物类似药行业更快更好的发展.2017年,作为由FDA批准的第一个曲妥珠单抗生物类似药(也称生物仿制药)的Trastuzumab-dkst(Ogivri)上市. Trastuzumab-pkrb(Herzuma)和Trastuzumab-dttb(Ontruzant)分别以冻干制剂的形式相继进入市场.这些生物类似药被批准用于治疗曲妥珠单抗的所有适应症(<https://www.herceptin.com/>).除了传统的只能结合单一抗原的抗体类药物,双特异性抗体研究也取得了新进展.如博纳吐单抗,2014年经FDA批准上市,是首个上市的双特异性抗体.博纳吐单抗是一种BiTE抗体药物(Bispecific T-cell engager),可同时针对肿瘤细胞表面的CD19抗原和T细胞表面的CD13抗原,用于治疗急性淋巴细胞白血病(ALL).临床应用的博纳吐单抗存放在一次性西林瓶中,是无菌、不含防腐剂的白色至米白色冻干粉(<https://www.blinicyto.com/>).

除了抗肿瘤类药物,以自身免疫性疾病为适应症的单抗药物中,也有很多冻干粉剂形式的单抗.如英夫利昔单抗、赛妥珠单抗和贝利木单抗等. TNF α 靶点是治疗自身免疫疾病的重要靶点,目前批准上市的抗TNF α 单抗药物仅有四个,其中有两个是冻干制剂.如1998年经FDA批准的英夫利昔单抗,是由杨森制药研发的首个上市的TNF α 拮抗剂.英夫利昔单抗是一种特异性阻断 α 肿瘤坏死因子的人鼠嵌合型单克隆抗体,其与TNF高效特异结合,治疗类风湿关节炎、强直性脊柱炎、银屑病性关节炎和克罗恩病等疾病(<https://www.remicade.com/>).同样作用于TNF α 靶点的还有UCB制药公司研发的赛妥珠单抗,2008年获FDA批准用于克罗恩病、类风湿性关节炎、银屑病关节炎及强直性脊柱炎的治疗.赛妥珠单抗是人源化抗体Fab片段经聚乙二醇化的TNF α 抑制剂.外观是一种无菌的白色冻干粉末(<https://www.cimzia.com/>).除了TNF α 靶点,白介素(IL)也是治疗自身免疫疾病的重要靶点.2015年,诺华制药研发的苏金单抗冻干制剂被批准,成为全球首个上市的白介素(IL)-17A单抗药物.用于治疗接受全身治疗或光疗的成人患者中至重度斑块型银屑病(<https://www.cosentyx.com/>).

如今单抗类药物是国内生物药市场份额最大且增速最快的品类,未来发展空间巨大.冻干技术可以显著提高单抗药物的稳定性和储存时间,同时满足了治疗方便的需求.其对单抗药物等生物药行业的发展具有举足轻重的作用.

2.2 抗体-偶联药物

抗体-偶联药物(ADC)作为目前发展最快的癌症治疗药物之一,结合了抗体识别靶标的特异性和偶联

药物针对癌细胞的毒性双重优势,在癌症治疗等领域成果初现.已经有四款抗体偶联药物经FDA批准上市,同时还有60种以上ADC药物在临床试验的各个阶段^[51].偶联了抗体的药物,与未偶联抗体的药物相比较,在多种癌症模型中被证明更加有效,目前已成为癌症治疗领域的研究热点.

与裸(单克隆)抗体药物相比,ADC药物具有不同的物理化学特性.对应的ADC药物在水分散体系中更倾向于聚合,而且药物总体的偶联效率(Drug Antibody Ratio, DAR)越高,在溶液中聚集的倾向更高.因此,为了确保接头药物的化学稳定性以及具有足够的保质期,ADC药物通常制备成冻干粉剂^[52].目前已上市的四款ADC药物都是采用冻干制剂的形式.早在2000年,Gemtuzumab ozogamicin(商品名 Mylotarg)作为首个ADC药物被批准上市,但由于缺乏有效性于2010年撤出市场,在时隔七年之久又被重新批准上市.Mylotarg是一种靶向CD33的ADC药物,由重组人源化IgG4单抗与细胞毒抗肿瘤抗生素剂袍霉素键合而成,用于治疗急性粒细胞白血病(AML)(<https://www.mylotarg.com/>).另外,Brentuximab vedotin(Adcetris),Ado-trastuzumab emtansine(Kadcyla)和Inotuzumab ozogamicin(Besponsa)分别于2011,2013,2017年批准上市.Adcetris是近30年来首个FDA新批准的用于治疗霍奇金淋巴瘤药物和首个用于治疗罕见疾病系统性间变性大细胞淋巴瘤的药物(<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm268781.htm>, 2011.),它是一种靶向CD30的新型ADC药物,由一种蛋白酶可裂解的连接器共价的将MMAE(一种微管抑制剂)连接到嵌合IgG1抗体CAC10上(<https://www.adcetris.com/>).Kadcyla是批准用于治疗实体肿瘤的第一个抗体偶联药物,也是个体化治疗的一大突破.它是一个靶向HER2的ADC药物,含有人源化抗HER2的曲妥珠单抗和微管抑制剂DM-1,两者通过稳定的硫醚连接物(MCC)共价连接,适用于HER2阳性转移性乳腺癌治疗(<https://www.kadcyla.com/>).Besponsa是一种CD22靶点导向的ADC药物,主要用于治疗成人复发或难治性前体B细胞急性淋巴细胞白血病(ALL)(<https://www.besponsa.com/>).此外,ADC的研究也有了新的突破.如美国Ambrx公司通过定点嵌入非天然氨基酸,实现在单克隆抗体上定点、定量接入抗肿瘤的小分子药物,以获得单一的ADC纯品.这相当于在“生物导弹”上精确地装上了“核弹头”,使得治疗更加安全、有效和靶向,这一创新技术将为新一代ADC药物的研发提供广阔的思路^[53].

3 结语

随着越来越多的抗体和ADC药物进入临床,对这些药物制剂的研究已取得了丰硕的成果和实践经验,但同时也面临更多新的问题和挑战.例如,保持药物的活性和保质期等.冷冻干燥技术是维持抗体等蛋白质类药物稳定性的有效手段,而在冻干工艺过程中控制并优化关键参数对此技术的发展尤为重要.近些年来,采用新技术辅助冻干工艺的优化取得了显著的成果.如冷冻过程中的控制成核技术,干燥过程中的微波辅助冷冻干燥技术及PG和TMbySR判断一次干燥终点的技术等,显著提高了冻干效率和冻干药品的质量.同时这些技术也存在不足,其中一些技术还难以应用于生产规模,所以仍需广泛而深入的研究.药物冷冻干燥虽然是一个相对耗能的过程,但在抗体药物制剂中的应用具有显著优势,是抗体类药物研发的重要一环.

参 考 文 献

- [1] 姚静,张自强.药物冻干制剂技术的设计与应用[M].1版.北京:中国医药科技出版社,2007.
- [2] Moussa E M, Panchal J P, Moorthy B S, et al. Immunogenicity of therapeutic protein aggregates[J]. J Pharm Sci, 2016, 105 (2):417-430.
- [3] Walters R H, Bhatnagar B, Tchessalov S, et al. Next generation drying technologies for pharmaceutical applications[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014, 103(9):2673-2695.
- [4] Shanley A. Modernizing lyophilization[J]. Biopharm Int, 2017, 30(12):50-52.
- [5] Hélène Kaplon, Reichert J M. Antibodies to watch in 2019[J]. MAbs, 2019, 11(2): 219-238.
- [6] Tang X, Pikal M J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice[J]. Pharmaceutical Research (Dordrecht), 2004, 21(2):191-200.
- [7] Dalvi-Isfahan M, Hamdami N, Xanthakis E, et al. Review on the control of ice nucleation by ultrasound waves, electric and magnetic fields[J]. Journal of Food Engineering, 2017, 195:222-234.
- [8] Mackenzie A P. Non-equilibrium freezing behaviour of aqueous systems[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 1977, 278(959):167-189.
- [9] Kasper J C, Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2011, 78(2): 248-263.
- [10] Vollrath I, Friess W, Freitag A, et al. Comparison of ice fog methods and monitoring of controlled nucleation success after freeze

- drying[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, 558:18-28.
- [11] Rambhatla S, Ramot R, Bhugra C, et al. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze drying; II. Control and characterization of the degree of supercooling[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2004, 5(4):54-62.
- [12] Konstantinidis A K, Kuu W, Otten L, et al. Controlled nucleation in freeze-drying; Effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011, 100(8):3453-3470.
- [13] Patel S M, Bhugra C, Pikal M J. Reduced pressure ice fog technique for controlled ice nucleation during Freeze-drying[J]. *Aaps Pharmscitech*, 2009, 10(4):1406-1411.
- [14] Aurélie Hottot, Nakagawa K, Andrieu J. Effect of ultrasound-controlled nucleation on structural and morphological properties of freeze-dried mannitol solutions[J]. *Chemical Engineering Research & Design*, 2008, 86(2):193-200.
- [15] Saclier M, Peczalski R, Andrieu J. Effect of ultrasonically induced nucleation on ice crystals' size and shape during freezing in vials[J]. *Chemical Engineering Science*, 2010, 65(10):3064-3071.
- [16] Passot S, Trelea I C, Marin M, et al. Effect of controlled ice nucleation on primary drying stage and protein recovery in vials cooled in a modified Freeze-dryer[J]. *Journal of Biomechanical Engineering*, 2009, 131(7):074511.
- [17] Geidobler R, Winter G. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying; fundamentals and technology review[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 85(2):214-222.
- [18] Pisano R. Alternative methods of controlling nucleation in freeze drying[J]. *Lyophilization of Pharmaceuticals and Biologicals*, 2019, PP79-111.
- [19] Sajal Manubhai Patel, Brian Lobo, Ambarish shah. practical considerations for freeze-drying process design, development and scale-up[J]. *American Pharmaceutical Review*, 2013, 1:25-30.
- [20] Awotwe-Otoo D, Agarabi C, Read E K, et al. Impact of controlled ice nucleation on process performance and quality attributes of a lyophilized monoclonal antibody[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 450(1/2):70-78.
- [21] Irene Oddone, Antonello A Barresi, Roberto Pisano. Influence of controlled ice nucleation on the freeze-drying of pharmaceutical products; the secondary drying step[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2017, 524(1/2):134-140.
- [22] Fonte P, Lino P R, Seabra, Vitor, et al. Annealing as a tool for the optimization of lyophilization and ensuring of the stability of protein-loaded PLGA nanoparticles[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2016, 503(1/2):163-173.
- [23] Searles J A, May J C. *Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization*[M]. 3rd ed. London: Informa Healthcare, 2010.
- [24] Liu, Jinsong. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states; techniques and applications in freeze-drying development[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2006, 11(1):3-28.
- [25] Searles J A, Carpenter J F, Randolph T W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine $T(g)$ in pharmaceutical lyophilization[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 90(7):872-887.
- [26] Chang B S, Patro S Y. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals[J]. *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 2004, 1:113-138.
- [27] Assegehegn G, Brito-de la Fuente E, Franco J M, et al. The Importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process performance[J]. *J Pharm Sci*, 2018, 125:301-306.
- [28] Heller M C, Carpenter J F, Randolph T W. Manipulation of lyophilization-induced phase separation; implications for pharmaceutical proteins[J]. *Natame*, 1997, 13(5):590-596.
- [29] Lim J Y, Lim D G, Kim K H, et al. Effects of annealing on the physical properties of therapeutic proteins during freeze drying process[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017(107): 730-740.
- [30] Gitter J H, Raimund G, Ingo P, et al. Significant drying time reduction using microwave-assisted freeze-drying for a monoclonal antibody[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 107(10):2538-2543.
- [31] Swapnil K. Pansare, Sajal M. Patel lyophilization process design and development; a single-step drying approach[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 108(4):1423-1433.
- [32] Patel S M, Doen T, Pikal M J. Determination of end point of primary drying in freeze-drying process control[J]. *Aaps Pharmscitech*, 2010, 11(1):73-84.
- [33] Hidenori Kawasaki, Toshinori Shimanouchil, Hiroyuki Sawada, et al. Temperature measurement by sublimation rate as a process analytical technology tool in lyophilization[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 86:105-111.
- [34] Pikal M J, Shah S, Roy M L, et al. The secondary drying stage of freeze drying; drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure[J]. *International Journal of Pharmaceutics (Kidlington)*, 1990, 60(3):203-207.
- [35] Pisano R, Rasetto V, Barresi A A, et al. Freeze-drying of enzymes in case of water-binding and non-water-binding substrates[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, 85(3):974-983.
- [36] May J C. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*[M]. Products; Importance and Evaluation of Residual Moisture, 2010.
- [37] Rambhatla S, Pikal M J. Heat and mass transfer scale-up issues during freeze-drying, I: atypical radiation and the edge vial effect[J]. *Aaps Pharmscitech*, 2003, 4(2):22-31.
- [38] Pikal M J, Bogner R, Mudhivarthi V, et al. Freeze-drying process development and scale-up; scale-up of edge vial versus center vial heat transfer coefficients, K_v [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(11):3333-3343.
- [39] Gieseler H, Erlangennuremberg U S. A significant comparison between collapse and glass transition temperatures[J]. *European*

- Pharmaceutical Review, 2008, 12:38-42.
- [40] Pikal M J, Shah S. The collapse temperature in freeze drying: Dependence on measurement methodology and rate of water removal from the glassy phase[J]. International Journal of Pharmaceutics, 1990, 62(2):165-186.
- [41] Meister E, Gieseler H. Freeze-dry microscopy of protein/sugar mixtures; drying behavior, interpretation of collapse temperatures and a comparison to corresponding glass transition Data[J]. Journal of pharmaceutical sciences, 2009, 98(9):3072-3087.
- [42] Korang-Yeboah M, Srinivasan C, Siddiqui A, et al. Application of optical coherence tomography freeze-drying microscopy for designing lyophilization process and its impact on process efficiency and product quality[J]. AAPS PharmSciTech, 2017, 19(1):448-459.
- [43] Jacqueline H, Wolfgang F. Detection of collapse and crystallization of saccharide, protein, and mannitol formulations by optical fibers in Lyophilization[J]. Frontiers in Chemistry, 2018, 6:4-10.
- [44] Kasper J C, Wigggenhorn M, Resch M, et al. Implementation and evaluation of an optical fiber system as novel process monitoring tool during lyophilization[J]. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik E V, 2013, 83(3):449-459.
- [45] Robert E J, Megan E O. Use of manometric temperature measurements (MTM) to characterize the freeze-drying behavior of amorphous protein formulations[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2010, 99(6):2863-2873.
- [46] Velardi S A, Rasetto V, Barresi A A. Dynamic parameters estimation method: advanced manometric temperature measurement approach for freeze-drying monitoring of pharmaceutical solutions[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2008, 47(21):8445-8457.
- [47] Schneid S, Gieseler H. Evaluation of a new wireless temperature remote interrogation system (TEMPRIS) to measure product temperature during freeze drying[J]. AAPS Pharm Sci Tech, 2008, 9(3):729-739.
- [48] 贺素艳, 李云飞. 冻干工艺中升华结束点和残余水分测量方法简述[J]. 真空与低温, 2002, 8(3):35-41.
- [49] 张亮, 刘建国, 阚瑞峰, 等. 基于可调谐半导体激光吸收光谱技术的高速气流流速测量方法研究[J]. 物理学报, 2011, 61(3):1-7.
- [50] Puneet Sharma, William J K, Robin Bogner, et al. Applications of the tunable diode laser absorption spectroscopy: in-process estimation of primary drying heterogeneity and product temperature during lyophilization[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2019, 108(1):416-430.
- [51] Zhao Wenbin, Liu Wenhui, Xu Yingchun, et al. Progress in research on antibody-drug conjugates[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2016, 33(2):238-245.
- [52] Synthon Biopharmaceuticals B V. Compositions comprising antibody-duocarmycin drug conjugates[P]. US:US20180200382A1. 2018-07-19.
- [53] Jackson D, Atkinson J, Guevara C I, et al. In vitro and in vivo evaluation of cysteine and site specific conjugated herceptin antibody-drug conjugates[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e83865.

The Research Progress of Freeze-Drying Technology and Lyophilized Antibody Drugs

JIN Li LIU Chun-hong HAN Jun WANG Qing-peng ZHANG Ning ZHANG Rui-yan

(Institute of Biopharmaceutical Research, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract In recent years, the incidence of malignant tumors and other serious diseases has been on the rise, resulting in a great social and economic burden. Antibody drugs, especially monoclonal antibody drugs, effectively overcome the shortcomings of traditional drugs. They have the characteristics of good targeting, low toxic, less side effects, and remarkable curative effects etc. Antibody drugs have been widely used in the treatment of various diseases. However, they are not stable enough in liquid preparations, which greatly limits their application. Freeze-drying technology effectively solves this problem and significantly improves the stability of antibody drugs. It has become the research hotspot of antibody drug preparation. In this paper, the research progress of freeze-drying technology was reviewed and the freeze-dried antibody drugs on the market were introduced. The purpose of this study is to provide references for improving the stability of antibody preparation and for developing freeze-drying technology of antibody drug.

Key words freeze-drying; monoclonal antibodies; pharmaceuticals; antibody-drug conjugate(ADC)