

凝胶法检查地舒单抗注射液细菌内毒素的可行性研究^{*}

王燕妮, 蒋惠源, 罗亦灵, 杨宇, 钮晓淑^{**}

(泰州市药品检验院, 江苏 泰州 225300)

摘要 **目的:**探索凝胶法检查地舒单抗注射液细菌内毒素的可行性。**方法:**参照《中华人民共和国药典》2020年版三部通则1143和美国注射剂协会发布的《第82号技术报告:低内毒素回收率》,采用动态浊度法检测地舒单抗注射液细菌内毒素并考察其是否存在LER现象,以所得不同稀释度样品的内毒素回收率大小预测其对鲎试剂的干扰程度;再选用不同灵敏度的凝胶法鲎试剂进行干扰预实验;最后用不同厂家鲎试剂对三个不同批号的地舒单抗注射液分别进行凝胶法干扰试验。**结果:**地舒单抗注射液对细菌内毒素无掩蔽作用,但高浓度对鲎试剂与细菌内毒素的凝集反应有干扰作用。用BET用水稀释至浓度不大于 $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,即可认为对 $0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 灵敏度及以上的凝胶法鲎试剂反应无干扰。**结论:**凝胶法检查地舒单抗注射液细菌内毒素的方法可行,可作为常规质量控制手段。

关键词:地舒单抗注射液;细菌内毒素;凝胶法;动态浊度法;低内毒素回收率

中图分类号:R 921.2 文献标识码:A 文章编号:1009-3656(2024)06-0590-06

doi:10.19778/j.chp.2024.06.010

Study on feasibility of Gel-clot method for bacterial endotoxin test of denosumab injection^{*}

WANG Yanni, JIANG Huiyuan, LUO Yiling, YANG Yu, NIU Xiaoshu^{**}

(Taizhou Institute for Drug Control, Jiangsu Taizhou 225300, China)

Abstract **Objective:** To explore the feasibility of gel-clot method for bacterial endotoxin test of denosumab injection. **Methods:** Referring to general chapter 1143 in ChP 2020. Vol III and Technical Report No. 82 on Low Endotoxin Recovery published by PDA, bacterial endotoxin was detected by turbidimetric kinetic method and the endotoxin recovery of denosumab injection with different dilutions was calculated. Then based on the recovery, it was judged whether there was a LER issue and it was predicted how well the samples interfered the reaction between TAL reagent and bacterial endotoxin. Pre-experiment of gel-clot interference test was performed with TAL reagents of different sensitivity. The gel-clot interference test was performed for three batches of samples and the bacterial endotoxin was tested with TAL reagents from different manufacturers separately. **Results:** Denosumab injection had no LER issue, and whose high concentration had the interference on the reaction between TAL reagent and bacterial endotoxin. The interference of gel-clot TAL reagent having a sensitivity of not less than $0.25\text{ EU}\cdot\text{mL}^{-1}$, was eliminated by diluting the samples to $6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ with BET water. **Conclusion:** The gel-clot method for the detection of bacterial endotoxin in denosumab injection is feasible and can be used as a routine quality control method.

Key words: denosumab injection; bacterial endotoxin; gel-clot method; turbidimetric kinetic method; LER

^{*} 基金项目:泰州市科技计划项目(No. SSF20230159)

第一作者简介:王燕妮,药理学硕士,副主任药师,执业药师。研究方向:药品安全和质量控制。Tel:18351014947;E-mail:529939529@qq.com

^{**} 通讯作者简介:钮晓淑,药理学硕士,副主任药师。研究方向:药品检验和毒理学研究。Tel:18168555299;E-mail:549217767@qq.com

地舒单抗是一种主要靶点为人 RANKL 的人免疫球蛋白 G2 单克隆抗体,用于治疗不可手术切除或手术切除可能导致严重功能障碍的骨巨细胞瘤、骨折高风险的绝经后妇女骨质疏松等多种适应证^[1],由美国安进公司首先研发,于 2010 年法国和美国上市,2019 年进入我国,目前在美国、欧盟、日本等 80 多个国家和地区都有销售^[2]。我国目前除原研进口外,已有三个国产制剂上市,还有其他 17 个厂家在研^[3-4]。2023 年国内该品种医院累计销售额达 10.06 亿元,其中国产制剂仅 87.1 万元,占比不足 1%(药融数据)。

地舒单抗注射液的细菌内毒素检查方法现为动态浊度法,检测精度高,但成本高昂,操作相对复杂,且药典规定^[5]若细菌内毒素测定结果有争议,一般以凝胶限度试验结果为准。因此本文在动态浊度法的研究基础上,探讨建立更为简便的凝胶法的可行性,以期进一步增强检测手段的可靠性,降低监管门槛,更好的保障公众用药安全。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

ET-96 内毒素凝胶法测定仪(天津天大天发科技有限公司);Robot 100 全自动细菌内毒素检测系统(湛江安度斯生物有限公司);ZH-2 型自动漩涡混合器(天津药典标准仪器厂);XW-80A 型自动漩涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

表 1 鲎试剂灵敏度复核/标准曲线可靠性试验结果

Tab. 1 The test results of confirmation of TAL sensitivity and assurance of the standard curve criteria

Batch No. of TAL	λ_c / (EU · mL ⁻¹)	Endotoxin concentration) / (EU · mL ⁻¹)						Negative control	λ_c / (EU · mL ⁻¹)
		1	0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 25		
22033012	0.5	++++	+++ -	----	----	/	/	--	0.59
2209223	0.25	/	++++	++++	+++ -	----	/	--	0.15
2210174	0.25	/	++++	++++	----	----	/	--	0.25
2211211	0.125	/	/	++++	++++	----	----	--	0.125
2302280	10 ~ 0.005	Take 0.005, 0.05, and 0.5 as three concentrations, and make standard curves with 3 parallel tubes for each concentration. Use 2 parallel tubes for the negative control. Results: The reaction time of the negative control is greater than the reaction time of the 0.005 concentration point; r = 0.997 7.							

2.2 动态浊度法试验

依据国家药品监督管理局药品注册标准 YBS00262023,地舒单抗注射液细菌内毒素限值为 5.0 EU · mL⁻¹,采用药典^[5]中供试品溶液最大有效

1.2 试剂

地舒单抗注射液(规格 60 mg(1.0 mL)/支,批号 2220230405、2220230002、2220230003,江苏泰康生物医药有限公司)。动态浊度法鲎试剂(turbidimetric-kinetic TAL,批号 2302280,规格 1.25 mL,检测范围 10 ~ 0.005 EU · mL⁻¹,湛江安度斯生物有限公司)。凝胶法鲎试剂(gel-clot TAL,批号 2211211,规格 0.1 mL,灵敏度 0.125 EU · mL⁻¹,湛江安度斯生物有限公司;批号 2209223,规格 0.1 mL,灵敏度 0.25 EU · mL⁻¹,湛江安度斯生物有限公司;批号 2210174,规格 0.1 mL,灵敏度 0.25 EU · mL⁻¹,湛江博康海洋生物有限公司;批号 22033012,规格 0.1 mL,灵敏度 0.5 EU · mL⁻¹,福州新北生化工业有限公司)。细菌内毒素工作标准品(规格 90 EU/支,批号 150601-202191,中国食品药品检定研究院;规格 80 EU/支,批号 150601-202393,中国食品药品检定研究院)。细菌内毒素检查用水(BET 用水,批号 2110260、2211080,湛江安度斯生物有限公司)。pH 试纸(批号 20220812,检测范围 5.5 ~ 9.0,上海三爱思有限公司)。细菌内毒素检查微孔反应板(批号:221015-078-F,货号 S-0520,湛江安度斯生物有限公司)。

2 方法与结果

2.1 鲎试剂灵敏度复核/标准曲线可靠性试验

按《中国药典》2020 年版三部通则 1143 方法分别复核凝胶法用鲎试剂的灵敏度及光度测定法用鲎试剂的标准曲线可靠性,结果均符合规定。见表 1。

稀释倍数(MVD)的算法,结合所用动态浊度法鲎试剂检测范围及试验过程中所用标准曲线的最低浓度值,得出地舒单抗注射液原液 MVD 为 1 000 倍。

参照药典^[5]方法 2 光度测定法的干扰试验和检

查法进行检测,供试品批号为 2220230405,设标准曲线组、阴性对照组(NC, negative control)、供试品组(NPC, negative product control)和供试品阳性组(PPC, positive product control),每组平行 2 孔,预设 OD (optical density, 光密度) 值 0.02, 检测波长

405 nm, 反应时间 90 min, 温度 37.0 °C, 供试品各稀释度样品与动态浊度法鲎试剂等量混合后的溶液 pH 值均为 6.0 ~ 8.0。所有试验结果的阴性对照反应时间均大于随行标准曲线最低点反应时间, 具体结果见表 2。

表 2 动态浊度法试验结果

Tab. 2 The test results of turbidimetric kinetic method

Dilution factor	Concentration of sample solution/(mg · mL ⁻¹)	Endotoxin recovery /%	Effective range of the standard curve)/(EU · mL ⁻¹)	r	Conclusion
1 000	0.06	98.88	0.5 - 0.005	0.997 7	meet the criteria
500	0.12	86.26			meet the criteria
200	0.3	79.88	0.5 - 0.005	1.000 0	meet the criteria
40	1.5	84.86			meet the criteria
20	3	67.12			meet the criteria
10	6	60.72			meet the criteria
4	15	50.68	5 - 0.005	0.985 6	meet the criteria
2	30	18.78			not up to criteria

2.3 LER Hold-Time 试验

参照《Technical Report No. 82 on Low Endotoxin Recovery》^[6]中“3.0 LER Hold-Time Studies”, 采用动态浊度法测试地舒单抗注射液是否对内毒素有掩蔽作用, 加标样品内毒素回收率是否会随时间降低而出现低内毒素回收率现象(low endotoxin recovery, LER)。

2.3.1 标准曲线溶液的制备 取细菌内毒素工作标准品, 按说明书溶解并混匀, 参照药典^[5]方法, 以 BET 用水稀释至 40、5、0.5、0.05、0.005 EU · mL⁻¹ 系列浓度。

2.3.2 样品溶液的制备 加标样(spiked sample solution, SSS): 取 2.2 同批注射液 3 mL, 混匀后精密量取 0.45 mL, 分别放入同规格的 6 支无热原试管中, 按表 3 时间点在其中 5 支分别加入 0.05 mL 40 EU · mL⁻¹ 的细菌内毒素工作标准品稀释液并混匀, 在(21 ± 1) °C 静置规定时长。

对照样: 取表 3 中 0 h 未加标样, 加入 0.05 mL 的 BET 水, 混匀。

加标水(spiked control solution, SCS): 取 BET 用水代替地舒单抗注射液加入同浓度的细菌内毒素工作标准品稀释液, 在同规格容器及相同条件下与表 3 各加标样同法平行操作。

对照水: BET 用水。

2.3.3 检测与结果 表 3 中各加标样静置规定时间后, 与同法制成的加标水和对照样以相同步骤用 BET 用水稀释 80 倍, 按 2.2 方法检测, 并使用以下

表 3 加标溶液的制备方法

Tab. 3 The preparation method of spiked solution

SSS/SCS	Spiking time point	Storage time/h
0 h	/	/
2 h	14:00	2
4 h	12:00	4
8 h	8:00	8
16 h	16:00	16
24 h	8:00	24

公式计算每个时间点的内毒素回收率, 结果均大于 50%, 表明样品不存在 LER 现象^[6]。结果见表 4。

时间 t 的内毒素回收率(%) = 时间 t 的加标样浓度/时间 t 的加标水浓度 × 100

2.4 干扰预实验

当供试品内毒素的回收率在 50% ~ 200%, 则认为在此试验条件下供试品溶液不存在干扰作用^[5]。从表 4、表 2 结果可以看出, 地舒单抗注射液对细菌内毒素无掩蔽作用, 稀释到 15 mg · mL⁻¹ 以下即可认为对动态浊度法鲎试剂无干扰; 现市售凝胶法鲎试剂灵敏度为 0.5 ~ 0.015 EU · mL⁻¹, 对应的地舒单抗注射液最大可稀释浓度为 6 ~ 0.18 mg · mL⁻¹; 药典规定^[7]建立细菌内毒素凝胶检测法所使用鲎试剂灵敏度不得低于 0.03 EU · mL⁻¹。综上, 选取灵敏度为 0.5、0.25、0.125 EU · mL⁻¹ 的鲎试剂, 使用表 2 四个回收率合格的最高可稀释浓度进行预实验, 结果见表 5。

表4 LER Hold-Time 试验结果

Tab. 4 The test results of LER Hold-time

Hold-time	Endotoxin recovery/%	Concentration value/(EU · mL ⁻¹)	Effective range of the standard curve/(EU · mL ⁻¹)	r	Endotoxin recovery of time t/%
2 h	SSS	90.50	0.048 73	5-0.005	0.998 0
	SCS	99.44	0.053 20		
4 h	SSS	91.46	0.049 21		96.9
	SCS	94.56	0.050 76		
8 h	SSS	90.42	0.048 69		100.8
	SCS	89.68	0.048 32		
16 h	SSS	102.96	0.051 87	0.995 0	95.2
	SCS	108.20	0.054 49		
24 h	SSS	87.30	0.044 04		94.7
	SCS	92.20	0.046 49		

表5 凝胶法干扰预试验结果

Tab. 5 The pre-interference test results of gel-clot method

Batch No. of TAL	Concentration of sample solution/(mg · mL ⁻¹)	Positive product control/(EU · mL ⁻¹)			Negative product control	Negative control	Positive control
		0.5	0.25	0.125			
22033012	15	--	/	/	--	--	++
	6	--	/	/	--	--	++
	3	++	/	/	--	--	++
	1.5	++	/	/	--	--	++
2209223	15	/	--	/	--	--	++
	6	/	++	/	--	--	++
	3	/	++	/	--	--	++
	1.5	/	++	/	--	--	++
2211211	15	/	/	-+	--	--	++
	6	/	/	++	--	--	++
	3	/	/	++	--	--	++
	1.5	/	/	++	--	--	++

从表5结果看,供试品浓度大于6 mg · mL⁻¹时,对灵敏度为0.5、0.25、0.125 EU · mL⁻¹的鲎试剂均有干扰;为6 mg · mL⁻¹时,仅对灵敏度为0.5 EU · mL⁻¹的鲎试剂有干扰;小于6 mg · mL⁻¹时,均未出现干扰。灵敏度为0.5 EU · mL⁻¹的鲎试剂为市面上凝胶法灵敏度最低的鲎试剂,日常工作中使用较少,常用的鲎试剂灵敏度一般为0.25 EU · mL⁻¹及以上。综上,采用灵敏度为0.25 EU · mL⁻¹的鲎试剂的最大不干扰浓度6 mg · mL⁻¹进行正式干扰试验。

2.5 干扰试验

根据预试验结果,用BET用水将地舒单抗注射液稀释至12 mg · mL⁻¹,再与相应浓度的细菌内毒素标准品溶液等量稀释制成2λ、1λ、0.5λ、0.25λ的供试品内毒素溶液。使用灵敏度为0.25 EU · mL⁻¹的两

个厂家鲎试剂与上述供试品内毒素溶液反应,同时制备相应的鲎试剂标示灵敏度对照、供试品溶液对照和阴性对照,依法^[5]进行干扰试验。结果见表6。

表6结果表明,采用不同厂家的鲎试剂分别对三批地舒单抗注射液进行细菌内毒素检查凝胶法干扰试验,结果均符合规定。供试品溶液在6 mg · mL⁻¹及以下浓度,对两种鲎试剂和内毒素的凝集反应均无干扰。

2.6 细菌内毒素检查

根据干扰试验结果和本品细菌内毒素限值5.0 EU · mL⁻¹,使用灵敏度为0.25 EU · mL⁻¹的两个不同厂家的鲎试剂,将地舒单抗注射液用BET用水稀释至6 mg · mL⁻¹,依法^[5,7]对上述3批样品进行内毒素检查,试验结果成立,均符合规定。具体结果见表7。

表 6 凝胶法干扰试验结果

Tab. 6 The interference test results of gel-clot method

Batch No. of TAL	Batch No. of sample	Concentration of sample solution/ (mg · mL ⁻¹)	Endotoxin concentration)/(EU · mL ⁻¹)				Negative control	E _t	E _t /λ
			0.5	0.25	0.125	0.062 5			
2209223	BET water Shui	/	+	+	+	-	-	/	meet the criteria
	2220230405	6	+	+	+	+	-	0.420	1.7
	2220230002	6	+	+	+	+	-	0.500	2.0
	2220230003	6	+	+	+	+	-	0.354	1.4
2210174	BET water	/	+	+	+	-	-	/	meet the criteria
	2220230405	6	+	+	+	+	-	0.354	1.4
	2220230002	6	+	+	+	+	-	0.420	1.7
	2220230003	6	+	+	+	+	-	0.354	1.4

注: E_t 为供试品溶液制成的内毒素溶液系列的反应终点浓度的对数值。

Note: E_t is the logarithm of the endpoint concentration of the endotoxin solution prepared from the sample solution.

表 7 凝胶法细菌内毒素检查结果

Tab. 7 The test results of bacterial endotoxin with gel-clot method

Batch No. of TAL	Batch No. of sample	Concentration of sample solution/(mg · mL ⁻¹)	Negative control	Positive control	Positive product control	Negative product control	Conclusion
2209223	2220230405	3	-	-	+	+	meet the criteria
	2220230002	3	-	-	+	+	meet the criteria
	2220230003	3	-	-	+	+	meet the criteria
2210174	2220230405	3	-	-	+	+	meet the criteria
	2220230002	3	-	-	+	+	meet the criteria
	2220230003	3	-	-	+	+	meet the criteria

3 结论

高浓度的地舒单抗注射液对鲎试剂与内毒素的凝集反应有干扰作用。用 BET 用水将其稀释至 6 mg · mL⁻¹ 及以下浓度时,即可排除对 0.25 EU · mL⁻¹ 灵敏度及以上的凝胶法鲎试剂的干扰。试验表明,凝胶法检查地舒单抗注射液的细菌内毒素项是可行的。

4 讨论

动态浊度法与凝胶法的凝集反应原理和反应路线基本是一致的,不同之处主要在于前者可以实时监测鲎试剂与内毒素形成凝胶颗粒的过程并实现定量^[8]。因此,本文利用动态浊度法试验中供试品内毒素的回收率大小预测其对凝胶法鲎试剂的干扰程度,进而决定样品是否需进行前处理及如何选择适宜灵敏度的鲎试剂。试验结果表明,地舒单抗注射液稀释 4 倍以上回收率即符合动态浊度法检测要求,而凝胶法对干扰的敏感程度也较低,推测地舒单抗注射液对凝胶法鲎试剂干扰也很小。因此,本文

未对供试品进行前处理,直接选取适宜灵敏度的鲎试剂进行了凝胶法干扰预实验,最终的试验结果也印证了推测的正确性。

LER,即低内毒素回收率^[6],是指对已添加细菌内毒素标准品的生物制药产品采用基于 C 因子方法(鲎试剂法和重组 C 因子法)进行细菌内毒素检查时加标内毒素检出失败的现象,与温度和时间高度相关,通常表现为回收率过低,内毒素被掩蔽。地舒单抗注射液作为蛋白质药物,且含有已知 LER 引起因素聚山梨酯,但实际并未发现对内毒素有掩蔽作用,原因可能是多方面的。首先,辅料中的稳定剂聚山梨酯 20 虽普遍被认为是一种能够引起或加剧 LER 现象的成分,但在与之相关的报道研究中配合使用的缓冲剂多是磷酸盐或柠檬酸盐,而非本制剂中的醋酸盐(数据来自药品说明书),而磷酸盐和柠檬酸盐本身也是 LER 引起因素,但醋酸盐还未见报道;其次,聚山梨酯 20 和单抗蛋白本身的浓度高低对是否形成 LER 也很关键,有研究发现适当浓度的聚山梨酯不但不会增

加 LER 的倾向,反而可以预防其发生;另外,地舒单抗注射液较低的 pH 值(不大于 5.5,数据来自药品说明书和药品国家标准)和控制良好的生产贮藏温度均有利于保持自身溶液体系的稳定性,避免 LER 的发生^[6]。

试验过程中发现,不同厂家相同灵敏度的鲎试剂对同一批次样品的干扰试验结果存在一定差异。这可能主要与鲎试剂的灵敏度复核要求^[5]较宽泛有关:复核结果在 0.5λ-2.0λ 范围内的均以标示灵敏度 λ 计。这样不同厂家不同批次的标示灵敏度虽然都一样,但实际灵敏度却可能有较大出入。对于那些临界样品来说,由于标示灵敏度和实际灵敏度不一致而计算 MVD 时出现的偏差就很可能导致出现假阳性或假阴性的结果。因此,建议在鲎试剂说明书中明确注明该批次鲎试剂未修约的实测灵敏度值,以供试验人员实际工作中参考。

参考文献

- [1] Alison Brayfield. Martindale: The Complete Drug Reference. 38th ed. Vol A[S]. London: Pharmaceutical Press, 2014: 1182.
- [2] 日本药品医疗器械管理局. 第一三共株式会社药品申请资料概要[DB/OL]. (2013-3-25) [2024-3-13]. <https://www.pmda.go.jp/drugs/2013/P201300022/index.html>.
PMDA. Drug Application form of Daiichi Sankyo Co., Ltd. [DB/OL]. (2013-03-25) [2024-03-13]. <https://www.pmda.go.jp/drugs/2013/P201300022/index.html>.
- [3] 国家药品监督管理局. 国产药品数据库[DB/OL]. (2024-03-13) [2024-03-13]. <https://www.nmpa.gov.cn/datasearch/search-result.html>.
NMPA. Domestic Drug Database [DB/OL]. (2024-03-13) [2024-03-13]. <https://www.nmpa.gov.cn/datasearch/search-result.html>.
- [4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 受理品种信息[DB/OL]. (2024-03-13) [2024-03-13]. <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/9f9c74c73e0f8f56a8bfb646055026d>.
CDE. Database of Accepted Drug Varieties [DB/OL]. (2024-03-13) [2024-03-13]. <https://www.cde.org.cn/main/xxgk/listpage/9f9c74c73e0f8f56a8bfb646055026d>.
- [5] 中国药典 2020 年版. 三部[S]. 2020: 538.
ChP 2020. Vol III [S]. 2020: 538.
- [6] CHEN DY, VON WINTZINGERODE F, BARLASOV-BROWN J, et al. Technical Report No. 82 on Low Endotoxin Recovery [R]. Maryland in USA; Parenteral Drug Association, Inc., 2019: 1-117.
- [7] 中国药典 2020 年版. 四部[S]. 2020: 指导原则 9251.
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: Guiding Principles 9251.
- [8] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2017:614.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Guidance on Analysis and Testing Technology of Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2017: 614.

(收稿日期:2024-05-21)