

药学报
Acta Pharmaceutica Sinica
ISSN 0513-4870, CN 11-2163/R

《药学报》网络首发论文

题目： 曲妥珠单抗生物类似药质量“相似性评价标准”探讨
作者： 崔靖，韩冬梅，徐隆昌，韦薇
收稿日期： 2021-07-06
网络首发日期： 2021-09-09
引用格式： 崔靖，韩冬梅，徐隆昌，韦薇. 曲妥珠单抗生物类似药质量“相似性评价标准”探讨. 药学报.
<https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2163.R.20210908.1740.002.html>



网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

曲妥珠单抗生物类似药质量“相似性评价标准”探讨

崔靖，韩冬梅，徐隆昌，韦薇*

(国家药品监督管理局药品审评中心，北京 100022)

摘要：近年来，我国已经批准了多个生物类似药注册上市。在开展生物类似药药学研究与评价时，候选药与原研药的质量相似性是“生物类似药”药学研究的核心，也是其作为类似药开展注册临床试验及支持上市申请的基础和前提。但是，工业界与监管界在建立质量“相似性评价标准”面临诸多挑战，如：原研药物可获得批次有限；原研药物在其生命周期内可能发生质量漂移；不同厂家的关键质量属性的检测方法存在差异；用于评价标准制定的统计方法难于统一，等等。本文以曲妥珠单抗为例，系统整理了原研药生产企业及9家生物类似药生产企业累计的69批原研药数据并进行统计分析，结合产品关键质量属性的风险识别，拟定了曲妥珠单抗质量“相似性评价标准”。该标准经已披露的类似药质量数据验证了其合理性，以期为国内曲妥珠单抗生物类似药的药学开发与评价提供参考。

关键词：曲妥珠单抗；生物类似药；质量相似性评价标准；关键质量属性；药学评价

中图分类号：R917 **文献标识码：**A

收稿日期：2021-07-06；修回日期：2021-09-01.

基金项目：国家“重大新药创新”课题(2015ZX09501008).

*通讯作者 Tel: 86-10-85243036, E-mail: weiw@cde.org.cn

**The discussion on a proposed quality “similarity assessment criteria” of
trastuzumab biosimilar**

CUI Jing, HAN Dong-mei, XU Long-chang, WEI Wei*

*(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing
100022, China)*

Abstract: In recent years, many biosimilars have been approved marketing authorization in our country. When conducting research and evaluation of biosimilar, the quality similarity between the candidate drugs and the original drugs is the key point of “biosimilar”, meanwhile it is the basis for clinical and marketing authorization of biosimilar. However, the industry and regulatory agencies are facing many challenges in establishing quality “similarity assessment criteria”, such as: limited batches of original drugs; quality drift caused by manufacture process changes in the life cycle; analytical method of critical quality attributes is different from different manufactures; statistical methods used for establishing assessment criteria are difficult to unify. In the article, the datas obtained from 69 lots of chemistry, manufacturing and control (CMC) dossier of trastuzumab originator company and dossiers of 9 biosimilar companies were analyzed. Furthermore, combined with the risk identification of the critical quality attributes of the product, quality “similarity assessment criteria” have been proposed. This standard has been verified by the disclosure of biosimilar quality data, aim to promote the development and evaluation of trastuzumab biosimilar.

Key words: trastuzumab; biosimilar; quality similarity assessment criteria; critical quality attributes; chemistry, manufacturing and control review

生物类似药在提高药物可及性、减少医保负担、促进医药市场良性竞争发展方面起重要作用。单抗药物由于其作用机制明确，靶点特异性强，在肿瘤、免疫及抗感染领域得到广泛的临床应用，因而近年来多款单抗生物类似药成为全球各大医药企业研发和申报的热点。2013 年在欧洲药品监督管理局（European Medicines Agency, EMA）第一个抗 TNF- α 靶点单抗生物类似药英夫利昔单抗

(infliximab) 获批上市，随后又批准了多款单抗生物类似药如利妥昔单抗 (rituximab)、阿达木单抗 (adalimumab)、贝伐珠单抗 (bevacizumab)、曲妥珠单抗 (trastuzumab)，截至目前共批准了单抗生物类似药 30 个^[1,2]。2016 年美国食品和药品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 也批准了抗 TNF- α 靶点的英夫利昔单抗生物类似药上市，截至目前批准了利妥昔单抗、阿达木单抗、贝伐珠单抗以及曲妥珠单抗等 19 款单抗生物类似药上市^[3]。我国药品监管机构 (National Medical Products Administration, NMPA) 2019 年也批准了国内第一款生物类似药-利妥昔单抗^[4]，截至目前已有 10 个单抗生物类似药获批，包括阿达木单抗、贝伐珠单抗以及曲妥珠单抗等^[5]。

与创新药研发策略不同，生物类似药的开发是以原研药物的关键质量属性为目标，依据确定的“目标产品质量概况”利用“反向工程”进行“迭代式”工艺开发^[6]。生物类似药评价思路是以比对试验证明其与参照药的相似性为基础，支持其安全、有效和质量可控，其基本原则包括比对原则、逐步递进原则、一致性原则和相似性评价原则^[7]。但在实际产品开发与药物评价时，设定合理的质量“相似性评价标准”面临诸多挑战，如：原研药物可获得批次有限；原研药物在其生命周期内可能发生质量漂移；不同厂家的关键质量属性的检测方法存在差异；用于评价标准制定的统计方法难于统一，等等。因而，仅采用有限批次的参照药质量数据无法获得参照药在整个生命周期的质量属性区间，这也为生物类似药的研发与评价提出了挑战。近年来，随着单抗药物专利期临近，我国单抗生物类似药的数量急剧增加。因此，拟定合理的“相似性评价标准”对于指导我国生物类似药的开发与评价具有重要的现实意义。

本文通过统计和分析曲妥珠单抗原研药 (原研厂检测数据、生物类似药申报企业检测参照药数据以及中检院检测参照药数据) 及目前国内 9 家生物类似药生产企业的原研质量研究数据，结合本品作用机制进行关键质量属性的识别与分级，初步拟定了曲妥珠单抗关键质量属性的接受范围，同时采用国外已公开原研品数据验证“相似性评价标准”的合理性，旨在为国内曲妥珠单抗生物类似药的药学开发与评价提供参考。

1 曲妥珠单抗及其生物类似药研究进展

1.1 曲妥珠单抗原研药注册情况及作用机制

曲妥珠单抗恒定区系人 IgG1 亚型，可变区特异性结合原癌基因人类表皮生长因子受体 2（human epidermal growth factor receptor 2, HER2）的胞外部分。通过阻断 HER2 形成同源二聚体并干扰 HER2 与其他酪氨酸激酶受体家族成员形成异源二聚体，阻止细胞内酪氨酸激酶的活化，抑制依赖 HER2 的肿瘤细胞的增殖和存活；另外，恒定区介导的抗体依赖细胞毒反应（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC）也是曲妥珠单抗的重要作用机制。罗氏公司的注射用曲妥珠单抗（Herceptin®）于 1998 年 9 月 25 日获 FDA 批准上市，然后于 2000 年 8 月获 EMA 批准上市，随后于 2002 年 9 月在中国获得批准，拟定适应症为单药治疗 HER2 过度表达转移性乳腺癌（包含 440 mg 和 150 mg 两种规格），目前还分别获批了联合紫杉醇或多西他赛用于 HER2 过度表达转移性乳腺癌的治疗、用于 HER2 阳性的可手术乳腺癌患者的辅助治疗、治疗 HER2 过度表达的转移性胃癌的治疗等适应症。

1.2 曲妥珠单抗原研药工艺变更情况

本品上市后存在较多的工艺变更，其注册变更事项包括原液和制剂生产场地、质量标准、内包材、延长有效期、新增细胞库等，上述变更尤其是重大工艺变更对其产品质量可能造成影响。

据文献^[8]报道，曲妥珠单抗原研药某些批次（有效期从 2018 年 8 月至 2019 年 11 月）发生去岩藻糖基化降低和高甘露糖水平升高，而且使得免疫球蛋白超家族成员 FcγIIIa 和 ADCC 活性发生漂移。EMA 在批准 Samsung Bioepis 的生物类似药 Ontruzant®时，也发现曲妥珠原研药的一些批次（有效期至 2018 年 8 月（US）或 2018 年 10 月（EU）的批次开始），总去岩藻糖基化和高甘露糖糖基化以及 ADCC 活性发生了明显变化。在 EMA 公开审评报告中可知，从临床的角度进一步对 ADCC 质量属性的漂移进行了评估，根据暴露在参照药 ADCC 质量属性漂移前后批次的人群进行亚组分析，认为在候选药和参照药的临床有效性方面未观察到明显的差异^[9]。

1.3 已获批曲妥珠单抗生物类似药

曲妥珠单抗在欧盟的专利已于 2014 年 7 月到期,美国专利于 2019 年 6 月到期,中国专利目前也已到期,现已成为生物类似药研发的热点。统计各国药品监管机构的审批信息,目前已经获批的曲妥珠单抗生物类似药如下:EMA 在 2018 年分别批准了 Celltrion 公司研发的 Herzuma®^[10],Mylan 公司研发的 Ogivri®^[11], Samsung Bioepis 公司研发的 Ontruzant®^[9], Pfizer 公司研发的 Trazimera®^[12]以及 Amgen 研发的 Kanjinti®^[13], FDA 分别在 2017 年和 2018 年批准了 Ogivri®^[14]和 Herzuma®^[15]作为曲妥珠单抗生物类似药。NMPA 于 2020 年批准了上海复宏汉霖生物技术有限公司的曲妥珠单抗生物类似药(商品名:汉曲优®),为国内首个获批的曲妥珠单抗生物类似药,适应症为用于转移性乳腺癌、早期乳腺癌、转移性胃癌的治疗。同时这款生物类似药在同年也获得 EMA 批准,商品名 Zercepac®^[16]。

2 曲妥珠单抗质量“相似性评价标准”的建立

2.1 各国监管机构对于质量“相似性评价”的考虑

生物类似药相对分子量大、结构复杂,具有独特的免疫原性和活性,其药学开发与评价面临很大挑战。国内外监管机构已发布的技术指南和规范文件^[7,17-21]均强调了证明候选药与参照药具有质量相似性是生物类似药开发的基础和前提,应基于充分的参照药表征数据建立质量“相似性评价标准”。

FDA 在 2017 年 9 月发布了《Statistical Approaches to Evaluate Analytical Similarity》^[18],该方法主要强调基于风险评估对参照药质量属性进行排序,采用分级的方法进行统计评价。根据参照药质量属性与临床安全性、有效性、药物代谢动力学(pharmacokinetics, PK)和免疫原性的相关性,对其潜在风险进行分类,分为高、中、低三个级别, Tier 1 采用等效性检验法,评价标准为候选药和参照药均值差值的 90%置信区间处于等效界值范围内即为等效,等效界值取值为 ± 1.5 倍参照药标准差 ($\pm 1.5 SD$); Tier 2 采用质量范围法,评价标准为 90%以上候选药批次落在参照药质量范围内 ($Mean \pm 3 SD$) 即为相似; Tier 3 采用图谱对比法或描述法,根据图谱对比或数据对比结果判定是否相似。该指南草案由于其

要求的参照药和候选药批次较多（一般大于 10 批）以及其计算方法可能导致“相似性评价标准”限度变宽等问题，FDA 在 2018 年 6 月撤销了该指南草案，但目前生物类似药相似性评价中仍具有一定的参考和指导意义。2019 年 5 月 FDA 更新的《Development of therapeutic protein biosimilars: comparative analytical assessment and other quality-related considerations》(draft guidance)^[19]中提出两个相似性评价标准：即 $\text{Mean} \pm X \text{ SD}$ ，以及原始图谱/数据相似，同时对参照药批次提出了要求，如参照药批次至少 10 批，且应涵盖有效期不同时间段的样品，不允许将不同来源参照药的分析数据建立“相似性评价标准”等。

EMA 一般要求依据原研药与候选药实测结果区间范围（最大/小值、平均值等）进行比对分析^[20]，相似性评价范围不得大于参考品批次的可变性范围，同时还应进行相似性评价范围合理性的分析，考虑因素一般包括参考品批次、有效期和分析方法等。

世界卫生组织（WHO）在最新征求意见的草案中也提及“相似性评价标准”的统计学方法，包括最小值-最大值、容许区间以及 $\text{Mean} \pm X \text{ SD}$ 法，分析了不同方法受生物类似药或参照药数量增加或减少而导致的假阳性的风险，推荐使用 $\text{Mean} \pm X \text{ SD}$ 法，但强调 X 值选择应科学合理，对于较为关键的质量属性应采用较小的 X 值。

我国在 2021 年发布的《生物类似药相似性评价和适应症外推技术指导原则》^[21]也强调基于对参照药质量属性的认知程度及其与临床风险获益的相关性，采用合适的风险评估工具对质量属性进行分级，也提及对不同风险等级质量属性采用不同的评价策略，定量评估的统计学方法采用 $\mu R \pm X \sigma R$ （ μR 为检测样本的平均值， σR 为标准偏差，系数 X 的设定应根据质量属性的风险等级进行科学论证），对于和产品作用机制或临床表现直接相关的质量属性（如生物学活性），可根据质量风险分级和相似性评价目标，采用其他统计方法进行数据分析，如等效性检验。

综上，以上指南对于质量“相似性评价标准”均强调了基于质量属性风险等级评估，并采用适宜的方法建立可比性范围，对于质量相似性定量评估建议采用

Mean±X SD 法，因而本文在建立参照药的“相似性评价标准”时，对于定量指标采用 Mean±3 SD，部分定性指标采用图谱比对等以“确证”是否一致。

2.2 曲妥珠单抗质量“相似性评价标准”的建立

曲妥珠单抗的质量属性一般包括：一级结构（氨基酸序列）、高级结构、二硫键和翻译后修饰、生物功能 [ADCC、补体依赖的细胞毒性（complement-dependent cytotoxicity, CDC）]、抗原/抗体结合、免疫球蛋白超家族 Fc 相关受体(FcγR)结合、补体相关蛋白 C1q 结合、靶向亲生子 Fc 受体(FcRn)结合，纯度（分子大小变异体、电荷变异体）、杂质（产品相关杂质如聚合物、片段、非糖基化重链等；工艺相关杂质如残留宿主蛋白、残留 DNA、浸出物、培养基成分等）、糖基化修饰（去岩藻糖基化修饰、高甘露糖修饰、唾液酸化、半乳糖化修饰等）、制剂相关特性（辅料、可见异物、不溶性微粒等）等。

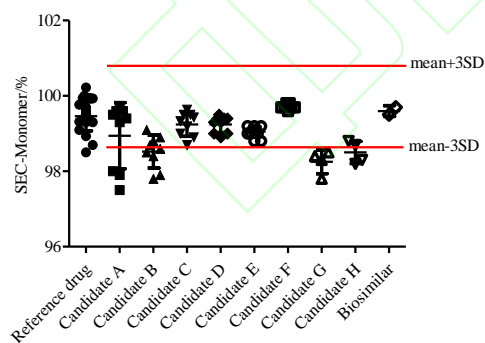
根据曲妥珠单抗的作用机制，并参考 FDA 和 EMA 已批准的 Herceptin®的生物类似药的相关审评报告，对曲妥珠单抗的质量属性进行风险分析（表 1）。针对不同的质量属性采用不同的分析策略，如氨基酸序列应“确证”；完整分子量、纯度（分子大小变异体、电荷变异体等）及糖型修饰和比例（如岩藻糖基化、去岩藻糖基化、高甘露糖、半乳糖等）采用统计学方法计算变异区间（一般采用 Mean±3SD）；二级及高级结构图谱比对应一致；FcγR、FcRn 相关受体、C1q 亲和力和生物学活性由于活性单位表示方式存在差异且检测方法变异性较大，仅统计“数量级”或“未统计”（表 1）。

Table 1 Quality attributes, method, risk-based ranking, statistic analysis and similarity assessment criteria of trastuzumab. LC-ESI-MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; BLI: Bio-layer interferometry; ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay; CEX-HPLC: Ion exchange-high performance liquid chromatography; CIEF: Capillary isoelectric focusing; HILIC-UPLC: hydrophilic interaction chromatography-ultra performance liquid chromatography; NP-HPLC: Normal phase-high performance liquid chromatography; RP-HPLC: Reversed phase-high performance liquid chromatography; “+++”: Highest risk; “++”: Medium risk; ND: Not detected

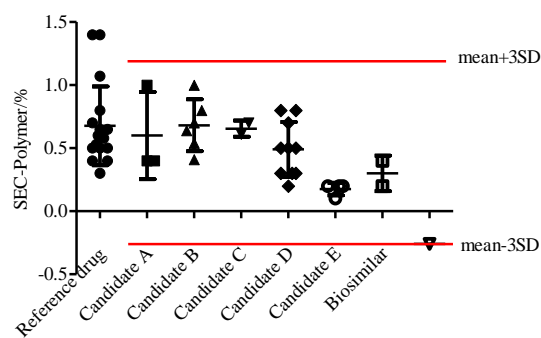
Quality attributes	Method	Criticality	Statistic analysis	Similarity assessment criteria
Primary structure	Peptide mass fingerprinting / intact molecular/reduced molecular (LC-ESI-MS)	+++	Identical	Identical
Potency	HER2 binding assay by flow cytometry Inhibition of proliferation ADCC	+++	ND	ND
Fc-receptor binding and function	Fc γ R I a binding affinity (BLI)	++	Order of magnitude	ND
	Fc γ R II a binding affinity	++	Order of magnitude	ND
	Fc γ R II b binding affinity	++	Order of magnitude	ND
	Fc γ R III a binding affinity	+++	Order of magnitude	1×10^{-7} mol L ⁻¹
	Fc γ R III b binding affinity	++	Order of magnitude	ND
	FcRn binding affinity	+++	Order of magnitude	1×10^{-7} mol L ⁻¹
	CDC	++	ND	ND
	C1q binding assay (ELISA)	++	ND	ND
Purity	Size variants/aggregates	+++	Mean \pm 3SD	
	SEC-HPLC	+++	Mean \pm 3SD	99.72 \pm 0.360 3; 0.676 7 \pm 0.312 1
	R-CE-SDS	++	Mean \pm 3SD	98.59 \pm 0.755 1; 0.815 9 \pm 0.181 3
	NR-CE-SDS			96.62 \pm 2.278
	Charge variants (CEX-HPLC/CIEF)			22.93 \pm 4.529; 69.73 \pm 4.795; 8.866 \pm 2.079
Glycosylation	Afucosylation, galatossylation, Man5, sialylation, etc (HILIC-UPLC/NP-HPLC/RP-HPLC)	+++	Mean \pm 3SD	7.992 \pm 2.244; 41.85 \pm 9.024; 2.241 \pm 1.253

Higher order structure	Near and far UV circular dichroism (CD)	++	ND	ND
	Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	++	ND	ND
	Disulfide bond characterization (LC-ESI-MS)	++	ND	ND
	Differential scanning calorimetry (DSC)	++	ND	ND

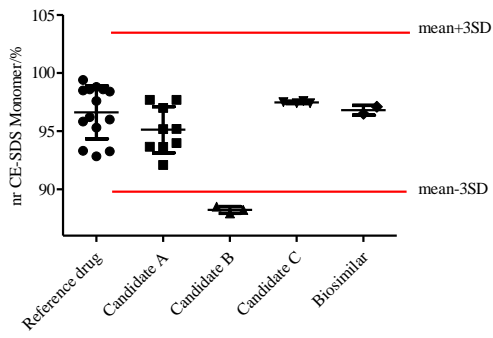
截至目前，与原研药 Herceptin®序列相同的重组抗 HER2 人源化单克隆抗体注射液申报单位有 11 家，其中 10 家申报临床（2 家企业撤回，8 家批准临床），1 家批准上市。采用原研药生产厂家、中检院、获批临床和上市生物类似药生产厂家的原研药检测数据作为原始统计数据建立“相似性评价标准”，主要是针对可量化的检测数据进行统计。原研药统计数据中，一级结构表征数据共 10 批；分子排阻色谱（size exclusion chromatography, SEC）单体纯度共 26 批，聚体 18 批；非还原毛细管区域电泳（non-reduce capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate, NR-CE-SDS）单体纯度数据共 14 批，还原毛细管区带电泳（reduce capillary electrophoresis-sodium dodecyl sulfate, R-CE-SDS）轻重链之和纯度 20 批，NGHC 17 批；酸碱变异体酸性峰数据共 21 批，主峰 73 批，碱性峰 38 批；糖型方面，去岩藻糖基化数据共 11 批，半乳糖 10 批，高甘露糖 11 批（图 1）。



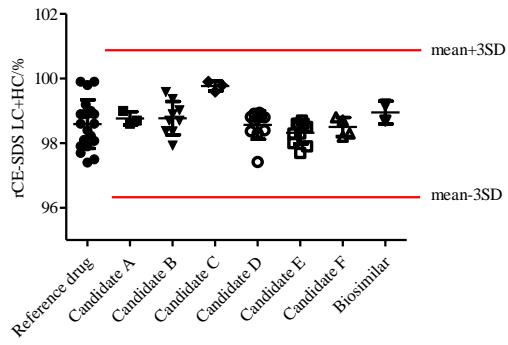
A



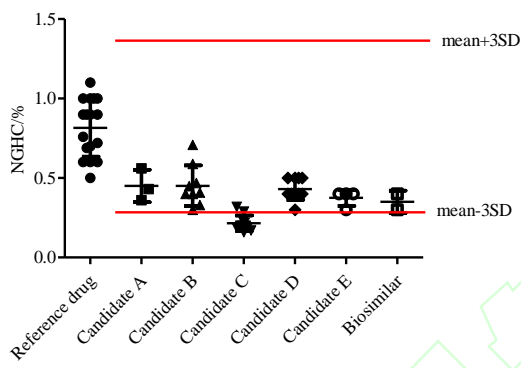
B



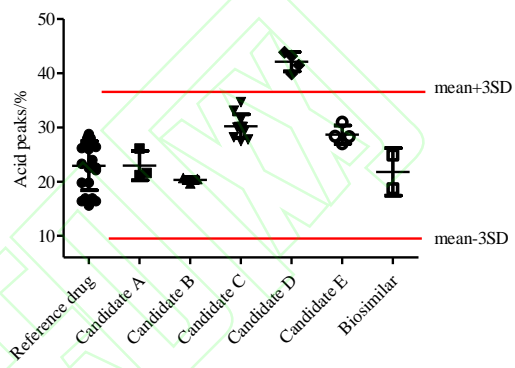
C



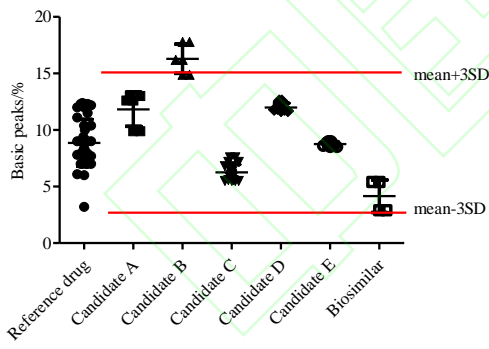
D



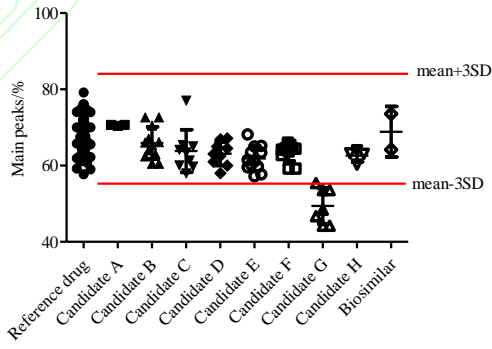
E



F



G



H

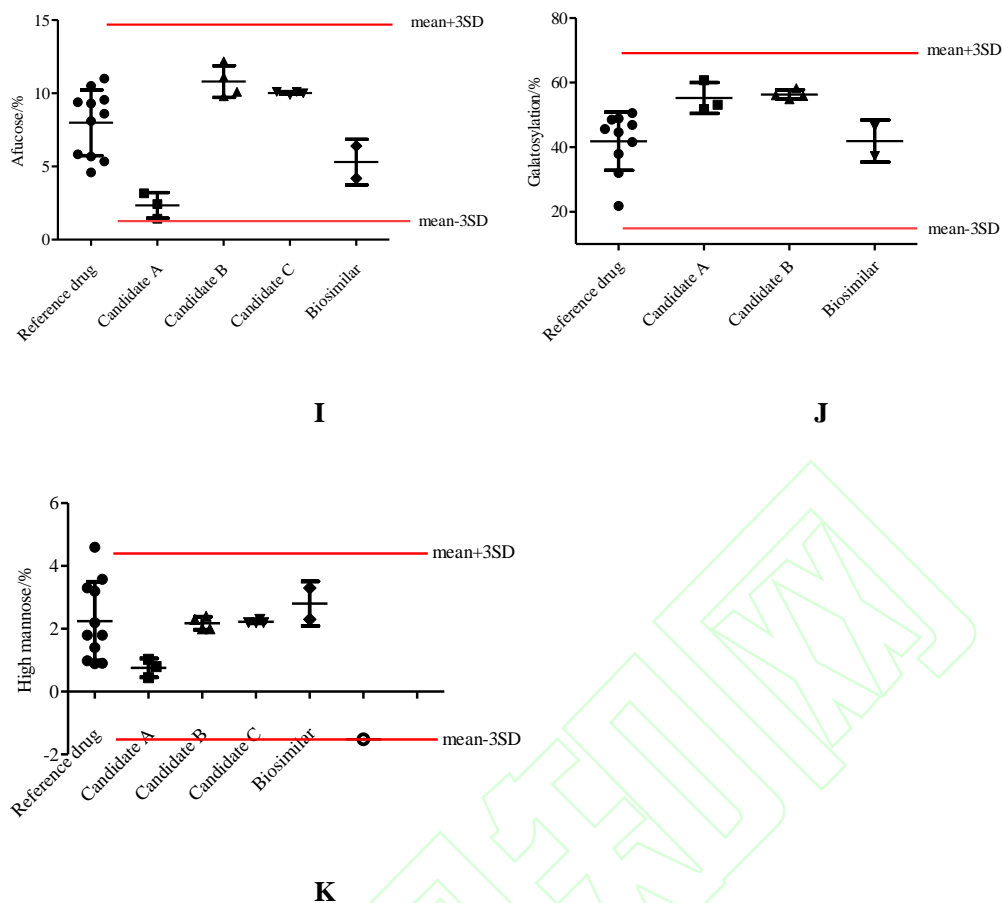


Figure 1 Comparison of trastuzumab, proposed biosimilars, and approved biosimilar characterization data by proposed quality similar criteria. A: Monomer percent by SEC-HPLC; B: Polymer percent by SEC-HPLC; C: Monomer percent by NR-CE-SDS; D: LC+HC percent by R-CE-SES; E: NGHC percent by R-CE-SES; F: Acid peaks percent by CEX-HPLC or CIEF; G: Basic peaks percent by CEX-HPLC or CIEF; H: Main peaks percent by CEX-HPLC or CIEF; I: Afucose percent by HILIC-HPLC or RP-HPLC; J: Galactosylation percent by HILIC-HPLC or RP-HPLC; K: High mannose percent by HILIC-HPLC or RP-HPLC

2.3 曲妥珠单抗质量“相似性评价标准”的验证与应用

根据目前已经发表的多篇关于曲妥珠单抗生物类似药的文献资料，以及在 FDA 和 EMA 已获批的 Herceptin®生物类似药的审评报告，初步分析原研药部分质量属性的范围，然后与本文多批次原研药计算得到的标准范围进行分析和探讨，

以验证“相似性评价标准”的合理性。

2.3.1 结构确证

生物类似药研发的前提是氨基酸序列的一致性，一是需要进行肽图图谱、质谱序列的确认，二是需要结合完整蛋白分子量、去糖完整蛋白分子量以亚单位分子量等进行确认。据文献报道，ABP980 与原研药一级结构对比研究中，分别对比了完整分子量、还原和去糖基化的重轻链分子量、肽图图谱和寡糖图谱等，其中在分子量的研究数据中显示 ABP980 与原研药的实测数据与理论数据差异均小于 50 ppm^[22]。在 CT-P6 公开文献资料中，也分析了本品与原研药在一级结构上存在相似性^[23]。在 FDA 公开的 Ogivri® 审评报告中，对比了候选药与 EMA、FDA 来源参照药的肽图图谱、糖基化峰及完整和还原蛋白分子量等数据，显示图谱出峰位置和峰面积较为一致，完整蛋白分子量显示美国来源原研药范围 148 049~148 067 Da，欧洲来源原研药范围 148 050~148 068 Da，Ogivri® 范围 148 051~148 062 Da；还原轻链分子量显示美国来源原研药范围 23 728~23 728 Da，重链分子量 51 226~51 234 Da，欧洲来源原研药范围 23 727~23 729 Da 和 51 228~51 233 Da，Ogivri® 范围 23 727~23 728 Da 和 51 230~51 232 Da^[11]。本次统计的原研数据也显示蛋白分子量与以上数据具有较高的一致性，另外实测数据与理论值差异基本在 50 ppm 内，肽图图谱显示峰形和色谱峰保留时间较为一致。不同申报企业开发的生物类似药申报批次中发现 N/C-末端修饰比例存在一些差异，但结合文献报道，生物类似药及原研产品的开发过程中，N/C-末端修饰的差异对体外和体内活性无显著影响^[24]。

2.3.2 纯度和杂质

主要包括分子大小变异体和电荷变异体，分子大小变异体的分析方法一般包括 SEC-HPLC、还原 CE-SDS 和非还原 CE-SDS，电荷变异体一般采用 CEX 或 cIEF 的方法。在目前公开文献和审评报告中对于以上纯度指标一般采用最小值~最大值或 Mean \pm 3 SD 的统计学方法。

2.3.2.1 SEC-HPLC 纯度 在 SEC-HPLC 纯度方面，CT-P6 文献资料中显示欧洲来源原研药 SEC-HPLC 单体纯度范围为 99.5%~99.7% 和 99.6% \pm 0.09 (Mean \pm SD)，

美国来源原研药单体纯度范围为 99.5%~99.8% 或 $99.6\% \pm 0.09\%$ (Mean \pm SD)；欧洲来源原研药 HMW 纯度范围为 0.3%~0.5% 和 $0.4\% \pm 0.09\%$ (Mean \pm SD)，美国来源原研药 HMW 纯度范围为 0.2%~0.5% 和 $0.4\% \pm 0.08\%$ (Mean \pm SD)^[23]；Ogivri® 生物类似药公开审评报告显示，原研药 SEC-HPLC 单体纯度 99.2%~99.7% (Mean \pm SD，欧洲来源) 和 99.2%~99.7% (Mean \pm 3 SD，美国来源)，HMW 纯度 0.27%~0.78% (Mean \pm 3 SD，欧洲来源) 和 0.17%~0.74% (Mean \pm 3 SD，美国来源)^[11]。本次统计的原研药数据显示单体含量和 HMW 含量在以上公开的原研药数据范围之内，且国内已批准上市的一款生物类似药的 SEC-HPLC 单体和聚体的实测数据也均在以上原研数据范围内（图 1A 和 1B），进一步说明了相似性评价标准的合理性。但如图 1A 所示，部分候选药 SEC 单体纯度超出相似性标准范围，经分析可能是原研药数据集较多，且大部分的数据实测值超出 99%，使得原研药 SEC 单体均值在 99% 以上，而部分候选药的实测数据中有部分数值低于 98%，但这部分数据量较少，故导致部分候选药批次的实测数据超出标准范围。

2.3.2.2 非还原 CE-SDS 非还原 CE-SDS 方面，CT-P6 文献资料中显示欧洲来源原研药完整分子含量范围为 98.0%~98.8% 和 $98.3\% \pm 0.25\%$ (Mean \pm SD)，美国来源原研药完整分子含量范围为 97.7%~98.5% 和 $98.2\% \pm 0.23\%$ (Mean \pm SD)；欧洲来源原研药片段含量范围 1.2%~2.1% 或 $1.7\% \pm 0.25\%$ (Mean \pm SD)，美国来源原研药片段含量范围为 1.5%~2.3% 或 $1.9\% \pm 0.23\%$ (Mean \pm SD)^[23]；Ogivri® 生物类似药公开审评报告显示，片段含量 1.22%~3.00% (Mean \pm 3 SD，欧洲来源) 和 1.34%~2.69% (Mean \pm 3 SD，欧洲来源)^[11]，本次统计的非还原 CE-SDS 完整分子含量与公开的原研药数据范围略有差异，相比已公开原研数据范围较宽，其主要是由于候选药 B 厂家测定的原研药完整蛋白含量较低造成。但国内已批准上市的一款生物类似药的非还原 CE-SDS 含量的实测数据也均在以上原研数据范围内（图 1C）。

2.3.2.3 还原 CE-SDS 纯度 在还原 CE-SDS 纯度方面，CT-P6 文献资料中显示欧洲来源原研药重轻链之和范围为 99.1%~99.6% 和 $99.4\% \pm 0.11\%$ (Mean \pm SD)，美国来源原研药重轻链之和范围为 99.1%~99.6% 和 $99.3\% \pm 0.14\%$ (Mean \pm SD)；欧洲来源原研药非糖基化重链（non-glycosylated heavy chain, NGHC）含量范围为

0.5%~0.9%和 0.6%±0.10% (Mean±SD), 欧洲来源原研药 NGHC 含量范围为 0.4%~0.9%和 0.7%±0.14 (Mean±SD, 美国来源)^[23]; Ogivri®生物类似药公开审评报告显示, 美国来源原研药重链含量范围为 66.4%~68.0% (Mean±3 SD), 轻链含量范围为 31.2%~32.5% (Mean±3 SD), NGHC 含量范围为 0.17%~0.98% (Mean±3 SD), 欧洲来源原研药重链含量范围为 67.7%~68.2% (Mean±3 SD), 轻链含量范围为 31.3%~33.0% (Mean±3 SD), NGHC 含量范围为 0.21%~0.31% (Mean±3 SD)^[11]。本次统计的原研药数据显示还原重轻链含量之和在以上公开的原研药数据范围内, 但 NGHC 含量略有差异 (图 1D 和 1E)。国内已批准上市的一款生物类似药的重轻链含量之和 NGHC 含量的实测数据也均在以上原研数据范围内 (图 1D 和 1E), 进一步说明了相似性评价标准的合理性。

2.3.2.4 电荷变异体 电荷变异体研究方面, Ogivri®生物类似药公开审评报告显示, CEX 检测欧洲来源原研药酸性峰含量范围为 24.3%~32.1%、主峰含量范围为 58.8%~66.7%和碱性峰含量范围为 7.6%~11.5% (Mean±3 SD), 美国来源原研药酸性峰含量范围为 25.9%~35.3%、主峰含量范围为 53.5%~62.4%和碱性峰含量范围为 7.2%~13.7% (Mean±3 SD)^[11]; 同时资料还公开了采用 CIEF 进行酸碱变异体的检测数据, CIEF 检测欧洲来源原研药酸性峰含量范围为 3.1%~5.7%、主峰含量范围为 61.0%~68.0%和碱性峰含量范围为 28.1%~35.2% (Mean±3 SD), 美国来源原研药酸性峰含量范围为 3.2%~7.2%、主峰含量范围为 57.8%~66.7%和碱性峰含量范围为 28.6%~39.0% (Mean±3 SD)^[11]。本次统计的原研药数据范围与目前公开数据存在一定差异, 且部分候选药批次测得数据也超出标准范围, 但国内已批准上市的一款生物类似药的酸碱变异体含量的实测数据均在以上原研数据范围内 (图 1F、1G 和 1H)。经分析原因如下: ①单克隆抗体药物的电荷异质性是比较常见的, 这种异质体来源于不同的翻译后修饰, 如脱酰胺、糖基化、氧化、C-末端去除以及唾液酸化等, 以上不同的修饰变异体导致电荷分布差异; ②酸碱变异体测定方法存在不同, 有的候选药厂家采用阳离子交换色谱方法, 有的候选药厂家采用成像毛细管凝胶电泳方法, 导致实测数据存在一定差异。Ogivri®的审评报告显示采用阳离子交换色谱 (CEX) 进行酸碱变异体检测, 绝大部分 Ogivri®批次数据结果在相似性评价范围内 (Mean±3 SD), 但酸性峰和主

峰水平存在部分数据超出相似性评价范围^[11]。但通过对 Ogivri®批次中造成酸性峰和主峰差异的原因以及这些差异对 PK、免疫原性和体内效应的影响进行评估，认为这些差异不会影响产品与原研药的相似性评价^[11]。

2.3.3 生物学活性

曲妥珠单抗生物学活性研究包括 Fc 相关受体、C1q 亲和力分析、抗原结合能力研究以及基于细胞的生物学活性研究，但由于本次统计的数据中亲和力测定数据有限，生物学活性分析方法和检测结果表述方式存在差异等原因，故未进行统计学分析。基于目前有限的数据显示，不同检测实验室测定的 Fc 相关受体的亲和力数据数量级较为一致，其中与 FcRn 亲和力平衡解离常数(KD)值为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ，与 FcγRIIIa 亲和力 KD 值为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ，以上数据与 Ogivri®的审评报告中统计的原研药数据的数量级也基本一致^[11]。

2.3.4 糖基化修饰

CT-P6 文献^[23]资料显示，采用 HILIC-UPLC 检测欧洲原研药去岩藻糖基化修饰水平范围为 3.1%~7.9%和 $5.1\% \pm 1.14\%$ (Mean±SD)、高甘露糖修饰水平范围为 1.3%~3.1%和 $2.2\% \pm 0.52\%$ (Mean±SD)、唾液酸修饰水平范围为 0.3%~2.2%和 $1.2\% \pm 0.55\%$ (Mean±SD)、去岩藻糖基化修饰总和范围为 4.6%~11.1%和 $7.3\% \pm 1.59\%$ (Mean±SD)，检测美国来源原研药去岩藻糖基化修饰水平范围为 3.2%~6.7%和 $4.7\% \pm 1.09\%$ (Mean±SD)、高甘露糖修饰水平范围为 1.7%~4.1%和 $2.3\% \pm 0.68\%$ (Mean±SD)、唾液酸化修饰水平范围为 0.5%~1.7%和 $1.1\% \pm 0.41\%$ (Mean±SD)、去岩藻糖基化修饰总和范围为 4.9%~10.8%和 $6.9\% \pm 1.57\%$ (Mean±SD)。在 Ogivri®审评报告中^[11]，采用 RP-HPLC 测定去岩藻糖基化修饰水平范围为 8.8%~12.4%(Mean±3 SD, 欧洲来源)和 9.3%~14.4%(Mean±3 SD, 美国来源)、唾液酸修饰水平范围为 0.02%~0.07% (Mean±3 SD, 欧洲来源)和 0.03%~0.07% (Mean±3 SD, 美国来源)。本次统计的原研药数据显示去岩藻糖基化修饰和甘露糖修饰水平与已公开数据未见明显差异，已批准上市的一款生物类似药的糖基化修饰水平的实测数据也均在以上原研数据范围内(图 1I、1J 和 1L)，进一步说明了相似性评价标准的合理性。

3 质量“相似性评价标准”应用的局限性

上述质量“质量相似性评价标准”基于原研企业、质量复核检验机构和生物类似药研发企业等多批次原研品的表征研究结果。虽然具有纳入统计分析原研药具备批次多、生产日期跨度大等优点，但仍存在以下局限性：①不同实验室对原研药物进行表征分析时，分析方法、参比品、质量体系等因素会导致结果的变异；②原研药数据大多数来源于 2015 年之前，国内尚未正式实施《生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）》，因而对于参照药选择批次以及相似性评价中质量项目研究的深入程度尚欠缺，因而导致部分质量属性如效价研究、亲和力研究、二级和高级结构等数据采集批次较少。③用于统计某些纯度指标“相似性评价标准”的批次量较少（小于 20 批）；以上原因可能使得“相似性评价标准”较为宽泛或不准确。但总体而言，对于部分质量属性如完整蛋白分子量、纯度和杂质、糖基化修饰、亲和力研究与目前已经公开发表的文献或审评报告中原研药多批次数据对比后，基于目前数据得到的“相似性评价标准”对于后续生物类似药开发企业仍具有一定的参考意义。

4 结语

生物类似药在满足药物可及性方面具有不可替代的优势，近年来，单抗生物类似药已经成为国内生物制品注册受理数量最多的类别，目前已有将近两百个单抗生物类似药进入临床研究阶段。确保候选药物与原研药的质量相似性是生物类似药药学开发与评价的核心。但是，由于单抗药物产品上市后普遍存在工艺变更，产品质量容易发生“漂移”，通过测定有限批次原研药的表征数据难以准确定义产品目标质量属性，这就给生物类似药的开发与评价提出了挑战。因此，拟定质量“相似性评价标准”对于指导生物类似药的开发与评价具有更为重要的现实意义。2015—2019 年，在国家科技重大专项“重大新药创新”课题资助项目（2015ZX09501008）支持下，国家药品监督管理局药品审评中心生物制品药学部利用审评信息数据库，对目前申报受理数量较多的利妥昔单抗（123 批次）、阿达木单抗（99 批次）、曲妥珠单抗（69 批次）、贝伐珠单抗（103 批次）进行了原研药质量数据采集与分析^[25]。

本文基于曲妥珠单抗原研药厂家、生物类似药生产厂家以及中检院对原研药的分析数据进行了统计,并参照目前国内外相关技术指南中要求采用统计学方法对定量属性进行了统计,初步确立了部分质量属性的“相似性评价标准”,该标准经以披露类似药质量数据验证其合理性,从而为国内生物类似药注册临床及上市阶段的审评具有一定的参考价值。但需要关注在实际审评中拟定标准仅作为生物类似药质量相似性的初步评价参考标准,判定结果还应与申请人提供的多批次“头对头”表征分析比对结果互为补充。另外,生物类似药的开发应基于整体的分析数据做出相似性评价的结论,并非仅依据参照药所观察到的质量属性的范围,如果某个检测结果不满足预定的相似性评价标准,应考虑产品不同质量属性之间的关联性,并评价质量属性的微小质量差异未发现对安全性、有效性和免疫原性等存在影响的,则认为候选药与原研药整体相似。后期,随着国内生物类似药报产品种的持续增多,原研品质量数据会继续累积,基于多批次原研品表征数据的类似药质量相似性评价标准,在国内生物类似药开发与评价上将更具指导意义。

作者贡献: 本文主要有崔靖、韩冬梅撰写,徐隆昌、韦薇修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] EMA. Centrally authorised biosimilar medicine [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2021 [2021-06-15]. https://www.ema.europa.eu/en/medicines/field_ema_web_categories%253Aname_field/Human/search_api_aggregation_ema_medicine_types/field_ema_med_biosimilar.
- [2] Wang L. Advance and challenge of biosimilar's research and development [J]. Chin J New Drugs (中国新药杂志), 2020, 29: 2410-2424.
- [3] FDA. Biosimilar Product Information [EB/OL]. Rockvill: FDA, 2021 [2021-06-15]. <https://www.fda.gov/drugs/biosimilars/biosimilar-product-information>.
- [4] NMPA. The first domestical Rituximab biosimilar was approved for marking

authorization [EB/OL]. Beijing: NMPA. 2019 [2021-6-15].
<https://www.nmpa.gov.cn/zhuanti/ypqxgg/gggzjzh/20190225171901769.html>.

[5] Insight. Bevacizumab biosimilar of Hengrui will be approved soon [EB/OL]. 2021 [2021-06-15]. <https://db.dxy.cn/v5/info/free>.

[6] da Silva A, Kronthaler U, Koppenburg V, et al. Target-directed development and preclinical characterization of the proposed biosimilar rituximab GP2013 [J]. *Leuk Lymphoma*, 2014, 55: 1609-1617.

[7] NMPA. Guidelines on biosimilars: research development and evaluation [EB/OL]. Beijing: NMPA. 2015 [2021-6-15].
<https://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=2f41e8f3c64fcdad>.

[8] Kim S, Song J, Park S, et al. Drifts in ADCC-related quality attributes of herceptin (R): impact on development of a trastuzumab biosimilar [J]. *MAbs*, 2017, 9: 704-714.

[9] EMA. Human medicine European public assessment report: ontruzant [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2017 [2021-06-15].
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ontruzant>.

[10] EMA. Human medicine European public assessment report: herzuma [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2018 [2021-06-15].
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/herzuma>.

[11] EMA. Human medicine European public assessment report: ogivri [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2018 [2021-06-15].
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/ogivri#overview-section>.

[12] EMA. Human medicine European public assessment report: trazimera [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2018 [2021-06-15].
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/trazimera>.

[13] EMA. Human medicine European public assessment report: kanjinti [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2018 [2021-06-15].
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kanjinti>.

[14] FDA. FDA-Approved Drugs: Ogivri [EB/OL]. Rockvill: FDA, 2017 [2021-06-15].

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=761074>.

[15] FDA. FDA-approved drugs: herzuma [EB/OL]. Rockvill: FDA, 2018 [2021-06-15].

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>.

[16] EMA. Human medicine European public assessment report: zercepac [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2020 [2021-06-15].
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zercepac>.

[17] WHO. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBPs) [EB/OL]. Geneva: WHO, 2009 [2021-6-15].

https://www.who.int/biologicals/publications/trs/areas/biological_therapeutics/TRS_977_Annex_2.pdf?ua=1.

[18] FDA. Statistical approaches to evaluate analytical similarity [EB/OL]. Rockvill: FDA, 2017 [2021-06-15].

<https://www.fda.gov/drugs/drug-safetyand-availability/fda-withdraws-draft-guidance-industry-statisticalapproaches-evaluate-analytical-similarity>.

[19] FDA. Guidance for industry: quality considerations in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product [EB/OL]. Rockvill: FDA, 2019 [2021-6-15]. <https://www.fda.gov/media/125484/download>.

[20] EMEA. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues [EB/OL]. Amsterdam: EMA, 2014 [2021-6-15].
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guidelinesimilar-biologicalmedicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteinsactive_en-2.pdf.

[21] NMPA. Guidelines on similarity evaluation and extrapolation indications of biosimilars [EB/OL]. Beijing: CDE, 2021 [2021-6-15].
<http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=0781c768db1dbe43>.

- [22] Hutterer KM, Polozova A, Kuhns S, et al. Assessing analytical and functional similarity of proposed amgen biosimilar ABP 980 to trastuzumab [J]. *BioDrugs*, 2019, 33: 321-333.
- [23] Lee J, Kang HA, Bae JS, et al. Evaluation of analytical similarity between trastuzumab biosimilar CT-P6 and reference product using statistical analyses [J]. *MAbs*, 2018, 10: 547-571.
- [24] Brorson K, Jia YA. Therapeutic monoclonal antibodies and consistent ends: terminal heterogeneity, detection, and impact on quality [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2014, 30: 140-146.
- [25] Liu BN, Kan HJ, Bai Y, et al. The discussion on a proposed quality similarity assessment criteria of rituximan biosimilar [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2118-2125.