

基于表面等离子共振技术的生物类似药相似性评价方法的开发

曹忠莲¹, 周维², 张弛², 杨萍¹

(1.复旦大学药学院, 上海 201203; 2.东曜药业有限公司, 苏州江苏 210000)

摘要: 基于表面等离子共振原理 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 的分子间相互作用技术成为生物类似药相似性评价的首选方案。但如何建立客观、可靠的评价方法并获得国家药品监管部门的认可至关重要。本案例以生物类似药和原研药贝伐单抗与 FcRn 受体结合的相似性评价为例, 从仪器质控、测试条件的摸索与优化、指纹图谱比对、相似性打分等方面展开分析, 结果显示, 生物类似药和原研药与 FcRn 的结合、解离性质达到 99% 以上的相似性。该评价方法的建立为该药物获得上市批准提供了一定的技术支撑, 并且该方法将可应用并加速其他生物类似药的研发。

关键词: 表面等离子共振技术; 生物分子相互作用仪; 生物类似药; 相似性评价; 指纹图谱

1 引言

生物类似药研发与评价技术指导原则 (试行) 中指出, 抗体与 FcRn 等各受体的亲和力也是评价生物类似药与原研药是否具有生物等效性的一项指标。FcRn 受体可与抗体的 Fc 端以 pH 依赖的方式相互作用以减缓 IgG 的降解, 以延长其血清半衰期。以生物分子相互作用仪 Biacore 为代表的表面等离子共振原理 SPR 技术成为生物类似药相似性评价的首选方案, 该技术除了可测定亲和力外, 还可进行分子间结合、解离传感图的指纹图谱比对, 根据其重叠程度进行相似性打分, 分值越接近 100%, 表示二者相似性越高。生物类似药开发中, 建立客观、可靠的生物相似性评价方法并获得国家药品监管部门的认可至关重要。因此, 本案例以在开发生物类似药贝伐单抗的过程中, 以建立生物类似药和原研药贝伐单抗与 FcRn 受体结合的相似性评价方法为例, 从仪器质控、测试条件的摸索和优化、指纹图谱比对、相似性打分等方面展开讨论。该方法为该药物获得上市批准提供了一定的技术支撑, 并为其他生物类似药的研发打下了基础。

2 材料与方法

2.1 仪器、耗材与试剂

生物分子相互作用仪 (Cytiva, Biacore T200)、Milli-Q Advantage A10 超纯水系统 (默克密理博, Merck Millipore)

Series S CM5 芯片 (Cytiva, BR-1005-30); 氨基偶联试剂盒 (Cytiva, BR-1000-50); 抗 His 标签抗体偶联试剂盒 (Cytiva, 28-9950-56); 96 孔板 (Greiner-650101, E15073K6); 96 孔板封膜 (Cytiva, 2045469/17)

供试抗体重组人源化抗 VEGF 单抗 (东曜药业有限公司, Ab1、Ab2、Ab3、Ab4); 原研药 Avastin® (PAb1、PAb2、PAb3); FcRn (ACRO Biosystems, FCM-H5286); 10×HBS-EP+缓冲液 (Cytiva, BR-1006-69); 醋酸钠缓冲液 (Cytiva, Acetate 4.5, BR100350; Acetate 5.0, BR100351; Acetate 5.5, BR100352); 50 mM NaOH 溶液 (Cytiva, BR100358); BIAtest Solution with HBS-N (Cytiva, 210310)、Desorb solution (Cytiva, 210310)。

2.2 实验方法

1) 仪器准备

进行正式实验前, 对 Biacore T200 仪器执行 Desorb 功能, 以去除残留的样品、缓冲液中的盐类物质、执行 Prime 功能, 以排除流动室中的气泡、进行 System check, 检测项目包括 Reagent pumps and blank injection、Mix、Refractometer Performance、Injections、Noise, 以确保上述各项都显示“Pass”方可进行实验 (图 1)。

2) Anti-his 抗体的偶联

本实验采用氨基偶联法将 His Capture Kit 中抗 anti-his 抗体偶联至 CM5 芯片的 Fc1、Fc2 通道, 然后捕获 FcRn 进行实验。首先将 100 μ L EDC 与 100 μ L NHS 混匀, 以 10 μ L/min 流速活化芯片表面 420s, 然后使用 Wizard 方法偶联经 pH 4.5 的 NaAC 稀释的 anti-his 抗体, 用 1M 乙醇胺封闭芯片表面 420s (偶联过程见图 2)。偶联结束后使用上样缓冲液以 10 μ L/min 的流速冲洗芯片表面, 使基线保持稳定。

3) 供试抗体、原研药与 FcRn 受体的动力学分析

抗体与受体 FcRn 的动力学分析时, 使用 pH 6.0 的 HBS-EP+上样缓冲溶液, 首先将 2 μ g/mL 的 FcRn 捕获 20s 于 Fc2 通道上, 将抗体以 0nM, 0nM, 31.25nM, 62.5nM, 125nM, 250nM, 500nM, 500nM 的浓度上样, 结合解离时间分别为 60s, 最后使用 pH 1.5 甘氨酸盐酸对芯片进行再生 30s。

2.3 指纹图谱分析

进样结束后使用 Biacore T200 Evaluation Software 进行指纹图谱分析, 即在“Sensorgram Comparison”中选择“Multi Cycle”, 在“Curve Type”中选择“Reference Subtracted”, 然后原研药的“Sample Type Analyte”选择“Standard”, 生物类似药选择“Sample”, 然后进行相似性打分。

3 结果与分析

3.1 系统检测结果

进行实验前需要执行 System Check，保证仪器各项功能如上样泵、参比通道上样、样品混合、折光率检测、样品上样、噪音等各功能都处于“Pass”状态后方可进行实验（图 1）。

Reagent pump						
Water	-2076				(-2600 to -1400 RU)	Pass
Buffer	12				(-50 to 50 RU)	Pass
Mixing						
Mix 1	48.4				(45.0 to 55.0 %)	Pass
Mix 2	48.3				(45.0 to 55.0 %)	Pass
Difference	0.1				(<=5.0 %)	Pass
Refractometer						
	Fc 1	Fc 2	Fc 3	Fc 4		
Bla test solution	22680	22609	22324	22448		
Variation					356	(21300 to 23600 RU)
Baseline level	24209	23777	23744	24093		(<=600 RU)
Variation					465	(<=3000 RU)
Injections						
	Fc 1	Fc 2	Fc 3	Fc 4		
Rise	100	100	100	99		(>=90 %)
Fall	0	0	0	0		(<=5 %)
Leakage	3	2	2	3		(<=100 RU)
Injection	22583	22522	22315	22214		(20000 to 24000 RU)
Dual, first part			22365	22449		(21400 to 23600 RU)
Dual, second part			-1982	-1885		(-2600 to -1400 RU)
Noise						
	Fc 1	Fc 2	Fc 3	Fc 4		
Short term	0.009	0.003	0.007	0.004		(<=0.050 RU)
Long term	0.004	0.002	0.002	0.000		(<=0.050 RU/s)

图 1 系统检测（System Check）报告结果

3.2 Anti-his 抗体的偶联结果

为保证 Anti-his Fc1、Fc2 通道上偶联量一致，采用 Wizard 中的目标偶联法，将 anti-his 抗体偶联量设为 6000Ru，根据上述结果，Fc1（A）、Fc2（B）通道的偶联量达到要求（图 2）。

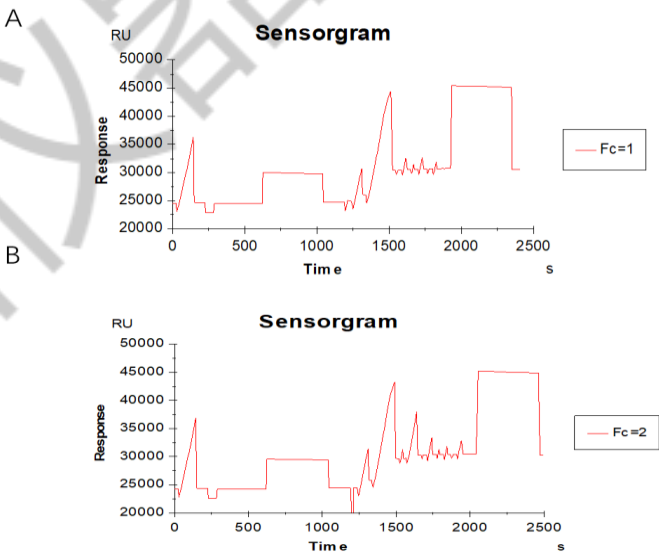


图 2 Fc1（A）、Fc2（B）通道偶联 Anti-his 抗体过程图

3.3 供试抗体、原研药与 FcRn 结合、解离的指纹图谱分析

通过对供试抗体、原研药与 FcRn 结合、解离的传感图比较获得指纹图谱（图 3），结果显示，供试抗体的图谱置于两个原研参照抗体之间，介于该置信区间范围内的生物类似药表示与原研药相似性高。

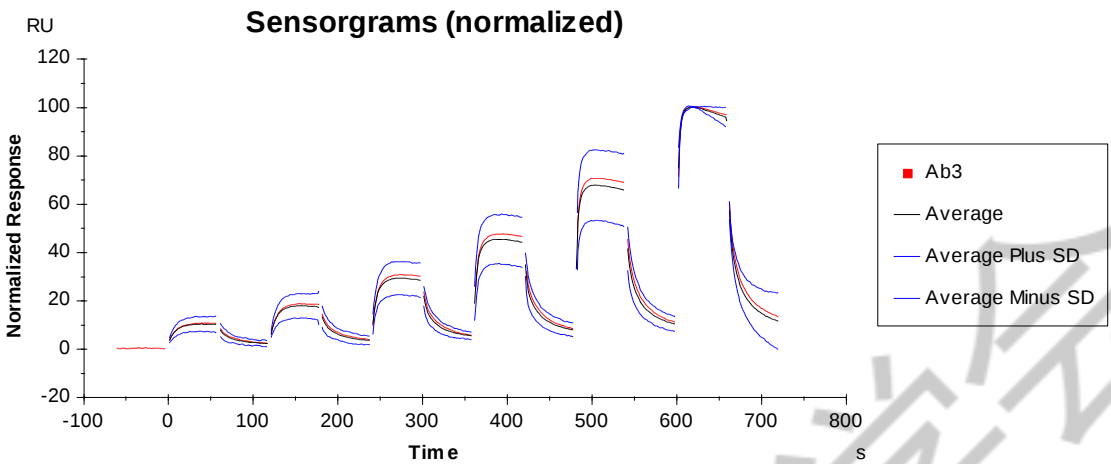


图 3 供试抗体、原研药与 FcRn 结合的指纹图谱比对分析
蓝色的表示参比原研药

对原研药（蓝色）PAb1、PAb2、PAb3 取平均值后打分为 100%，将供试抗体（绿色）Ab1、Ab2、Ab3、Ab4 与其比对，相似性达 99.95%、99.94%、99.88%、99.87%（图 4、表 1）。

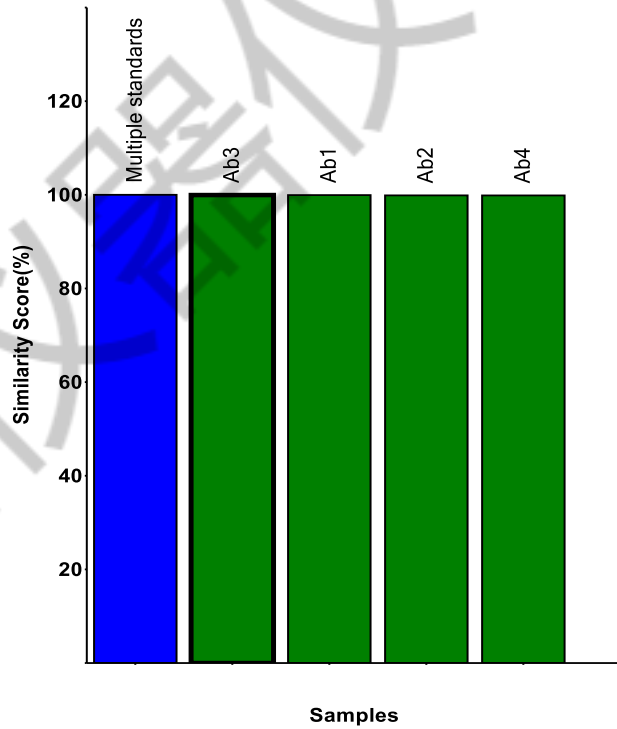


图 4 供试抗体、原研药与 FcRn 结合的相似性打分情况

原研药（蓝色），供试抗体（绿色）

表 1 供试抗体、原研药与 FcRn 结合的相似性打分结果

抗体	受体	相似性打分（%）
PAb1		
PAb2		100
PAb3		
Ab1	FcRn	99.95
Ab2		99.94
Ab3		99.88
Ab4		99.87

本案例结果表明，生物类似药、原研药贝伐单抗与 FcRn 受体结合的相似性达 99%以上，说明生物类似药与原研基本相似，符合生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）中的要求；本案例建立的相似性评价方法客观、准确，并可应用到其他生物类似药的研发中。

4 讨论

生物类似药与原研药的相似性评价极其严格，实验的每个环节都要注意，其要点如下：

4.1 实验前执行仪器 Desorb、Prime 功能

执行仪器 Desorb 功能，以去除残留的样品、缓冲液中的盐类物质

执行仪器 Prime 功能，以排除流动室中的气泡

4.2 实验前进行系统检测（System Check）

进行实验前需要执行 System Check，确保仪器各项功能和参数都处于“Pass”状态。

4.3 偶联 anti-his 抗体的量和捕获量

本实验按照偶联 anti-his 抗体、捕获 Fc 受体、抗体与受体的结合、抗体与受体的解离以及芯片表面的再生的步骤进行。

1) Anti-his 抗体在 Fc1、Fc2 通道的偶联量要基本一致，每个循环中捕获带有 His 标签蛋白的相应值 RU 要稳定，如果捕获量处于持续升高的状态，要注意缓冲体系中 P20 的浓度是否过低；

2) 再生液的选择要严格，如果抗体受体复合物没有完全再生下来，会影响抗体和受体结合时产生的信号值。

4.4 样品、缓冲液配置

生物类似药的评价极其严格，对样品制备的要求极高，稀释的样品浓度必须准确，稀释

过程中样品避免沾到管壁上、避免产生气泡，进样过程中为防止样品微量挥发，必须盖有封膜，否则都会影响相似性评价。另外，实验所需缓冲液建议现配现用。

参考文献:

[1] 《生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）》，国家食品药品监督管理总局，2015 年。

[2] Xu Y P, Xie L Q, Zhang E H, *et al.* Physicochemical and functional assessments demonstrating analytical similarity between rituximab biosimilar HLX01 and the MabThera® [J]. MAbs, 2019, 11(3): 606–620.

致谢与声明

本案例实验数据依托复旦大学药学院仪器测试中心的 Biacore T200 设备产生，数据所有权归东曜药业有限公司，本论文只用来提供方法学参考和案例分析，不涉及利益冲突。