

抗HER2单抗关键质量属性研究

王馨¹, 陈蔚东^{2*} (1. 福建省食品药品质量检验研究院, 福州 350001; 2. 福建省药品审核查验中心, 福州 350001)

摘要 目的：对国产抗人类表皮生长因子受体2 (HER2) 单抗部分关键质量属性进行质量研究，并建立质量控制方法。**方法：**根据曲妥珠的产品特性和作用机制，对质量属性进行评估分级，以7批原研曲妥珠为对照，检测7批国产抗HER2单抗部分关键质量属性。利用离子交换色谱检测电荷异质性；通过BT474细胞增殖抑制法检测生物学活性；利用生物膜干涉技术检测抗原抗体亲和力、单抗与FcRn亲和力以及利用表面等离子共振技术检测单抗与FcγR III a亲和力；利用差示扫描量热检测热稳定性。**结果：**7批原研曲妥珠的离子交换色谱主峰面积百分比、生物学活性EC₅₀值的Mean ± 3SD分别为(73.87 ± 2.21)%、(0.20 ± 0.06) μg · mL⁻¹，7批国产抗HER2单抗相应检测结果分别为(73.54 ± 3.24)%、(0.20 ± 0.05) μg · mL⁻¹。原研曲妥珠抗原抗体亲和力、单抗与FcγR III a亲和力及单抗与FcRn亲和力的平衡常数(K_D)分别为1 × 10⁻¹⁰、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁷，7批国产抗HER2单抗相应检测结果分别为1 × 10⁻¹⁰、1 × 10⁻⁶、1 × 10⁻⁷。国产抗HER2单抗与原研曲妥珠热稳定性图谱一致。**结论：**本研究建立了抗HER2单抗关键质量属性研究方法，为该类国产单抗质量控制提供参考依据。

关键词：抗人表皮生长因子受体2单克隆抗体；关键质量属性；电荷异质性；生物学活性；亲和力

中图分类号：R927.11 **文献标识码：**A **文章编号：**1002-7777(2024)09-1043-010

doi:10.16153/j.1002-7777.20240424

Study on the Critical Quality Attribute of Anti-HER2 Monoclonal Antibody

Wang Xin¹, Chen Weidong^{2*} (1. Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350001, China; 2. Center for Drug Inspection of Fujian Province, Fuzhou 350001, China)

Abstract Objective: To study and establish a quality control method for some critical quality attributes of the domestic anti human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibodies. **Methods:** Based on the product characteristics and effects mechanism of trastuzumab, the quality attributes were evaluated and graded. And some critical quality attributes of 7 batches of the domestic anti-HER2 monoclonal antibody were detected using 7 batches of reference trastuzumabs as the control. The charge heterogeneity was analyzed by ion exchange-high performance liquid chromatography (IEC-HPLC). Biological activity was determined by BT474 cell proliferation inhibition assay. Bio-Layer Interferometry (BLI) was used to measure antigen-antibody affinity, monoclonal antibody affinity with FcRn, and Surface Plasmon Resonance (SPR) was used to measure the affinity of monoclonal antibody with FcγR III a. Thermal stability was evaluated by Differential Scanning Calorimetry (DSC). **Results:** The mean±3SD values of IEC main peak areas percent and EC₅₀ of 7 batches of original trastuzumabs were (73.87±2.21)% and (0.20±0.06) μg · mL⁻¹, respectively. The results of the domestic anti-

作者简介：王馨 Tel: (0591) 87525880; E-mail: wangxinlucky1990@163.com

通信作者：陈蔚东 Tel: (0591) 87622189; E-mail: 629183342@qq.com

HER2 monoclonal antibodies were $(73.54 \pm 3.24)\%$, $(0.20 \pm 0.05) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The K_D values of antigen-antibody affinity, antibody-Fc γ R III a affinity and antibody-FcRn affinity were 1×10^{-10} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , respectively. The results of 7 batches of the domestic anti-HER2 monoclonal antibodies were 1×10^{-10} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , respectively. The thermal stability mappings of the domestic anti-HER2 monoclonal antibodies were consistent with those of the original trastuzumabs. **Conclusion:** A method for quality study of anti-HER2 monoclonal antibody is developed, which provides a reference for quality control of this class domestic monoclonal antibody.

Keywords: anti-HER2 monoclonal antibody; critical quality attribute; charge heterogeneity; bioactivity; affinity

根据WHO发布的全球癌症数据显示,乳腺癌已成为发病率最高的癌症^[1-3],是导致女性因癌症死亡的主要因素,其中HER2(Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)阳性乳腺癌占比约15%~20%,其侵袭性更高,易转移复发^[4-6]。1998年,美国FDA批准了针对HER2靶点的第一个人源化单抗药物曲妥珠的上市。曲妥珠含人IgG1亚型框架,互补决定区源自鼠抗p185 HER2抗体,能特异性地作用于HER2的细胞外部位第IV亚区,从而阻滞整个HER2网络的信号传递,起到良好的抗肿瘤疗效^[7-8];还能作为抗体依赖的细胞介导细胞毒反应(Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity, ADCC)的潜在介质,利用单抗Fc段与CD16+淋巴细胞表面的Fc γ R III a相结合,从而激活这些效应细胞杀伤肿瘤细胞的活性^[9]。曲妥珠可以有效降低HER2阳性早期乳腺癌复发的风险,还可以显著地改善并且延长晚期(转移)乳腺癌的生存期,能极大地提高HER2阳性乳腺癌患者的生存获益^[10-11]。

尽管曲妥珠具有较高的临床价值,但其价格昂贵,高昂的治疗费用限制了药物的可及性。抗HER2单抗成为国内各大药企研发的重点领域,国产抗HER2单抗的上市将降低药物成本,使更多的患者能够接受更安全高效的生物靶向治疗。目前共有4家国内企业的曲妥珠生物类似药上市,后续仍有6家企业的曲妥珠生物类似药进入新药审批流程。药学质量研究是药物开发的基础,对保障药物有效性与安全性具有重要作用,因此开展国产抗HER2单抗的关键质量属性(Critical Quality Attribute, CQA)研究至关重要。

本研究根据曲妥珠的产品特性和作用机制,对质量属性进行风险评估分级,对7批原研曲妥珠及7批国产抗HER2单抗进行关键质量属性研究,利用离子交换色谱(Ion Exchange-High Performance

Liquid Chromatography, IEC-HPLC)检测电荷异质性;通过BT474细胞增殖抑制法检测生物学活性;利用生物膜干涉技术(Biolayer Interferometry, BLI)检测抗原抗体亲和力、单抗与FcRn亲和力以及利用表面等离子共振技术(Surface Plasmon Resonance, SPR)检测单抗与Fc γ R III a亲和力;利用差示扫描量热(Differential Scanning Calorimetry, DSC)检测热稳定性,为探究抗HER2单抗质量属性差异与其功能和安全性差异的关系奠定基础,为抗HER2单抗的研发和质量控制提供技术支撑。

1 材料与仪器

1.1 主要材料

原研曲妥珠为罗氏公司产品(批号:N3703、N3697B01、N3697B06、N3790B01、N3551、N3553、N3546);国产抗HER2单抗样品为某企业生产(批号:GB221-20110201P、GB221-20110202P、GB221-20110303P、GB221-20110301、GB221-20110302、GB221-20110303、GB221-20140901);人乳腺癌细胞系BT474细胞购自美国菌种保藏中心(货号:HTB-20);含EDTA的胰蛋白酶、胎牛血清(FBS)、RPIM1640培养基购自Gibco公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、牛血清白蛋白(BSA)购自Promega公司;Cell Counting Kit-8细胞增殖毒性检测试剂盒(CCK-8)购自日本同仁化工公司;HER2抗原(货号:10004-H08H4)、Fc γ R III a蛋白(货号:10389-H27H)购自北京义翘神州公司;Anti-human IgG Fc Capture (AHC) Biosensors及Streptavidin (SA) Dip and Read™ Biosensors购自PALL Life Sciences公司;HBS-EP缓冲液、甘氨酸缓冲液购自GE Healthcare公司;生物素标记FcRn购自AcroBiosystems公司。

1.2 主要仪器

SpectraMax M5多功能酶标仪及SoftMax分析软

件 (Molecular Devices 公司); Waters2695 高效液相色谱仪、2487 紫外检测器、WatersMillennium32 分析软件 (Waters 公司); 高效液相色谱柱 TSK G3000SWXL (7.8 mm × 30 cm) (Tosoh 公司); 阳离子交换色谱柱 Dionex ProPac™ WCX (4 mm × 250 mm) (Thermo 公司); Octet RED 96 ForteBio 大分子相互作用仪及 Fortebio Data Analysis Software V8.1 分析软件 (PALL Life Sciences 公司); Biacore 生物大分子相互作用仪及 Biacore Evaluation Software V3.0 (GE Healthcare 公司); VP-CAP DSC 型差示扫描量热仪及 MicroCal Analysis Launcher 软件 (Malvern 公司)。

2 方法

2.1 IEC-HPLC 检测电荷异质性

单抗 C 末端赖氨酸切除: 先用注射用水将抗 HER2 单抗稀释到质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取 $10 \mu\text{L}$ 羧肽酶 B 加入到 $1000 \mu\text{L}$ 的抗 HER2 单抗 ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 酶切 30 min。将酶切后的单抗注入液相色谱仪进行分析, 上样体积 $50 \mu\text{L}$ 。色谱条件: 采用 Dionex ProPac™ WCX-10 (4 mm × 250 mm) 色谱柱, 流动相 A 为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠水溶液 (pH 7.5), 流动相 B 为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸钠/ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠水溶液, 梯度洗脱 (0~30 min, 15%B→55%B; 30~35 min, 55%B; 36~44 min, 55%B→100%B; 45~55 min, 100%B→15%B), 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 214 nm。用 WatersMillennium32 分析软件按面积归一化法计算主峰面积百分比。

2.2 生物学活性

BT474 细胞培养至对数生长期, 经 0.25% EDTA 的胰蛋白酶消化后, 200 g 离心 5 min, 然后以含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基 (完全培养基) 重悬细胞, 调整细胞浓度至 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 96 孔透明细胞培养板中, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 置 37°C , 5% CO_2 条件下孵育 1~3 h, 使细胞贴壁; 以完全培养基稀释抗 HER2 单抗至 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 再以完全培养基进行 2 倍稀释, 共设 11 个稀释度, 每一稀释度设 2 个复孔; 将稀释好的抗 HER2 单抗加入已接种 BT474 细胞的培养板内, 每孔 $100 \mu\text{L}$, 置 37°C , 5% CO_2 条件下孵育 5 d (110~124 h); 每孔加入 CCK-8 检测试剂 $10 \mu\text{L}$, 置 37°C , 5% CO_2 条件下孵育 1~3 h; 在 M5 酶标仪上读取吸收度值, 检测

波长为 450 nm。结果以抗 HER2 单抗浓度对数为 x 轴, 对应的吸收度值为 y 轴, 选用四参数方程回归模型 $Y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$, 拟合抗 HER2 单抗的剂量效应曲线, 得到各样品的半数有效浓度 (Concentration for 50% of Maximal Effect, EC_{50}), 即能引起 50% 最大效应的浓度。

2.3 免疫学特性

2.3.1 基于 BLI 技术检测抗原抗体亲和力

取 HEPS 缓冲液稀释 HER2 抗原至质量浓度约为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并进行 2 倍稀释, 共 7 个梯度, 取 HEPS 缓冲液稀释抗 HER2 单抗至质量浓度约为 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将 HEPS 缓冲液、稀释后的 HER2 抗原、稀释后的抗 HER2 单抗、甘氨酸缓冲液转移到特定的 96 孔板中, 每孔 $200 \mu\text{L}$ 。使用 Anti-human IgG Fc Capture (AHC) Biosensors 作为检测探头, 设置运行条件: ①平衡 1 (Baseline): 60 s; ②上样 (Loading): 80 s; ③平衡 2 (Baseline): 120 s; ④结合 (Association): 300 s; ⑤解离 (Dissociation): 900 s; ⑥再生 (Regeneration): 20 s; ⑦中和 (Neutralization): 20 s。用 Fortebio Data Analysis Software V8.1 软件以稳态模式分析数据, 以质量浓度作为横坐标, 各浓度样品的结合值作为纵坐标进行拟合, 如 $R^2 \geq 0.95$, 检测有效, 计算平衡常数 (K_D) 值。

2.3.2 基于 SPR 技术检测单抗 Fc 段与 FcγR IIIa 受体亲和力

用 HBS-EP 缓冲液稀释抗 HER2 单抗至 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并进行 2 倍稀释, 共 5 个浓度梯度。以 FcγRIIIa 为配体, 抗 HER2 单抗为分析物进行亲和力测定。配体溶液流速 $10 \mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$, 捕获时间 420 s, 捕获量约为 3000 RU; 各浓度分析物溶液流速 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 与配体结合时间 120 s, 解离时间 240 s; 以甘氨酸缓冲液 (pH 1.5) 作为洗脱液, 分别在分析物解离结束后对分析物进行洗脱, 流速 $30 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$, 洗脱时间 30 s。获取数据以 1:1 模型进行动力学 (Kinetic) 分析, 并用 Biacore Evaluation Software V3.0 进行分析。

2.3.3 基于 BLI 技术检测单抗 Fc 段与 FcRn 结合力

取生物素化的 FcRn, 用 pH 7.4 的 PBS 溶液将其稀释至 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 取抗 HER2 单抗用含 0.1% BSA/0.005% Tween 20/PBS (pH 6.0) 稀

释至终浓度为 $2320\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，然后向下进行2倍系列稀释，共8个梯度。将PBS、稀释后的生物素化的FcRn、稀释后的抗HER2单抗、含0.1%BSA+0.005%Tween 20（pH 6.0）的PBS转移到特定的96孔板中，每孔 $200\ \mu\text{L}$ 。使用Streptavidin（SA）Dip and Read™ Biosensors作为检测探头，设置运行条件如下：①平衡1（Baseline）：60 s；②上样（Loading）：300 s；③平衡2（Baseline）：30 s；④结合（Association）：300 s；⑤解离（Dissociation）：200 s；⑥再生（Regeneration）：30 s；⑦中和（Neutralization）：30 s。用Fortebio Data Analysis Software V8.1软件以稳态模式分析数据，以质量浓度作为横坐标，各浓度样品的结合值作为纵坐标进行拟合，如 $R^2\geq 0.95$ ，检测有效，计算 K_D 值。

2.4 DSC检测热稳定性

用NAP-5脱盐柱将抗HER2单抗置换到PBS缓冲液中：将NAP-5脱盐柱用PBS缓冲液平衡6个柱体积（约15 mL），吸取 $500\ \mu\text{L}$ 质量浓度为 $21\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的抗HER2单抗至脱盐柱内，待液体流尽时，加入1 mL PBS缓冲液，并收集流出液体，即得置换后的样本。将置换后的样本用PBS缓冲液稀释至 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。用VP-CAP DSC型差示扫描热量仪，以起始温度 $20\ ^\circ\text{C}$ ，最终温度 $110\ ^\circ\text{C}$ ，温

度变化率 $90\ ^\circ\text{C}\cdot\text{h}^{-1}$ 进行单抗热稳定性检测，运用MicroCal Analysis Launcher软件进行结果分析。

2.5 结果的统计分析

本文针对不同的质量属性特点及风险评级对试验结果采用不同的统计分析方法^[12]。对电荷异质性、生物学活性等能定量的高风险等级质量属性采用统计学方法计算变异区间（一般采用 $\text{Mean}\pm 3\text{SD}$ ），免疫学特性（抗原抗体亲和力、单抗与FcγRⅢa亲和力、单抗与FcRn亲和力）等由于活性单位表示方式存在差异且检测方法变异性较大的高风险等级质量属性仅统计“数量级”；对中风险等级的高级结构热稳定性采用比对原始图谱法。

3 结果与分析

3.1 离子交换色谱检测结果

7批原研曲妥珠及7批国产抗HER2单抗IEC-HPLC检测主峰（峰3+峰3*）的出峰时间、主峰面积百分比及峰形一致。7批原研曲妥珠及7批国产抗HER2单抗的IEC-HPLC主峰面积百分比、 $\text{Mean}\pm 3\text{SD}$ 、相对标准偏差（RSD）检测结果见表1，结果显示国产抗HER2单抗检测结果均落在原研曲妥珠的 $\text{Mean}\pm 3\text{SD}$ 范围内，同时对两组数据进行双样本 t 检验， $P>0.05$ ，无统计学显著差异。分别选取1批原研曲妥珠及1批国产抗HER2单抗的IEC-HPLC检测图谱如图1所示。

表 1 原研曲妥珠及国产抗 HER2 单抗 IEC-HPLC 测定结果

名称	主峰面积百分比 /%	RSD/%	Mean ± 3SD/%	P 值
原研曲妥珠（n=7）	75.12	1.00	73.87 ± 2.21	0.516
	74.36			
	74.01			
	73.02			
	74.01			
	73.32			
	73.25			
国产抗 HER2 单抗（n=7）	72.10	1.47	73.54 ± 3.24	
	73.20			
	74.36			
	72.75			
	73.15			
	75.35			
	73.85			

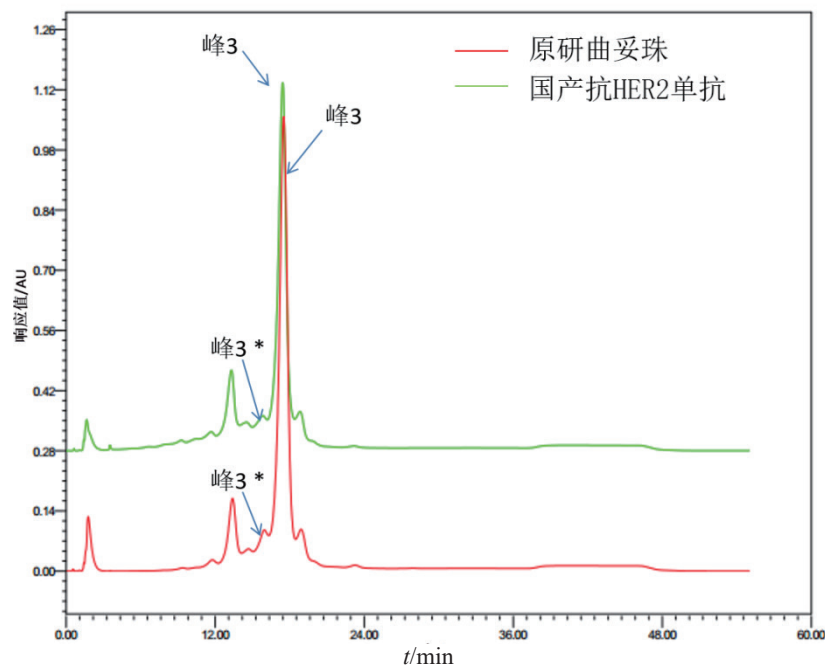


图1 原研曲妥珠及国产抗HER2单抗IEC-HPLC检测图谱

3.2 生物学活性检测结果

7批原研曲妥珠及7批国产抗HER2单抗增殖抑制生物学活性反应曲线均呈典型的S型，符合四参数方程： $Y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$ 回归模型， $R^2 > 0.99$ 。统计7批原研曲妥珠及7批国产抗HER2单抗生物学活性 EC_{50} 值、 $Mean \pm 3SD$ 、RSD，如

表2，结果显示国产抗HER2单抗检测结果均落在原研曲妥珠的 $Mean \pm 3SD$ 范围内，同时对两组数据进行双样本 t 检验， $P > 0.05$ ，无统计学显著差异。分别选取1批原研曲妥珠及1批国产抗HER2单抗在450 nm的生物学活性检测图谱如图2所示。

表2 原研曲妥珠及国产抗HER2单抗生物学活性测定结果

名称	EC ₅₀ / (μ g · mL ⁻¹)	RSD/%	Mean ± 3SD	P 值
原研曲妥珠 (n=7)	0.193	9.74	0.20 ± 0.06	0.895
	0.181			
	0.181			
	0.198			
	0.199			
	0.235			
	0.217			
国产抗 HER2 单抗 (n=7)	0.205	7.53	0.20 ± 0.05	
	0.210			
	0.187			
	0.184			
	0.225			
	0.187			
	0.197			

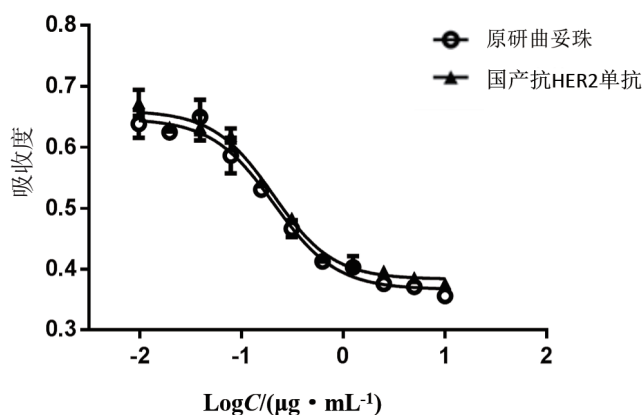


图2 原研曲妥珠及国产抗HER2单抗生物学活性检测图谱

3.3 免疫学特性检测结果

目前对ForteBio、Biacore等法检测结合活性的结果分析通常不采用传统统计学方法,行业内认可的亲和力相似的评价标准为 K_D 值差异10倍以内(即相同数量级)说明2种分子与配体间的亲和力相似。7批原研曲妥珠及7批国产抗HER2单抗的抗原抗体亲和力、单抗Fc段与FcγRⅢa亲和力及单抗Fc段与FcRn亲和力的 K_D 如表3所示。原研曲妥珠的抗原抗体亲和力、单抗Fc段与FcγRⅢa亲和力及单抗Fc段与FcRn亲和力的 K_D 值分别在 1×10^{-10} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 数量级,国产抗HER2单抗均落在相同的数量级。分别选取1批原研曲妥珠及1批国产抗HER2单抗的抗原抗体亲和力、单抗与FcγRⅢa

亲和力及单抗与FcRn亲和力图谱如图3~5所示。

3.4 热稳定性检测结果

7批原研曲妥珠与7批国产抗HER2单抗的DSC检测 T_{m1} 、 T_{m2} 值的最小值~最大值、平均值及RSD如表3,其中 T_{m1} 值反映了单抗CH2结构域的微量热变化, T_{m2} 值反映了单抗Fab段及CH3结构域的微量热变化。目前一般认为运用DSC对2种样本的热稳定性进行分析,差异结果在 1°C 以内均认为二者无差异,表4显示原研曲妥珠及国产抗HER2单抗 T_{m1} 及 T_{m2} 值相差均在 1°C 以内。分别选取1批原研曲妥珠及1批国产抗HER2单抗DSC分析图谱如图6所示,2个产品图谱一致。

表3 原研曲妥珠及国产抗HER2单抗免疫学特性检测结果

抗原抗体亲和力 K_D 值		单抗与FcγRⅢa亲和力 K_D 值		单抗与FcRn亲和力 K_D 值	
原研曲妥珠	国产抗HER2单抗	原研曲妥珠	国产抗HER2单抗	原研曲妥珠	国产抗HER2单抗
3.98×10^{-10}	3.34×10^{-10}	1.707×10^{-6}	2.610×10^{-6}	5.84×10^{-7}	5.61×10^{-7}
2.63×10^{-10}	3.49×10^{-10}	1.113×10^{-6}	2.959×10^{-6}	9.09×10^{-7}	6.55×10^{-7}
2.75×10^{-10}	3.29×10^{-10}	1.359×10^{-6}	2.954×10^{-6}	4.86×10^{-7}	5.83×10^{-7}
2.60×10^{-10}	2.78×10^{-10}	1.562×10^{-6}	3.141×10^{-6}	5.45×10^{-7}	8.67×10^{-7}
2.53×10^{-10}	4.49×10^{-10}	1.497×10^{-6}	3.050×10^{-6}	5.98×10^{-7}	4.51×10^{-7}
2.96×10^{-10}	4.22×10^{-10}	1.661×10^{-6}	3.131×10^{-6}	5.22×10^{-7}	5.73×10^{-7}
2.70×10^{-10}	3.30×10^{-10}	1.531×10^{-6}	2.809×10^{-6}	5.77×10^{-7}	4.58×10^{-7}

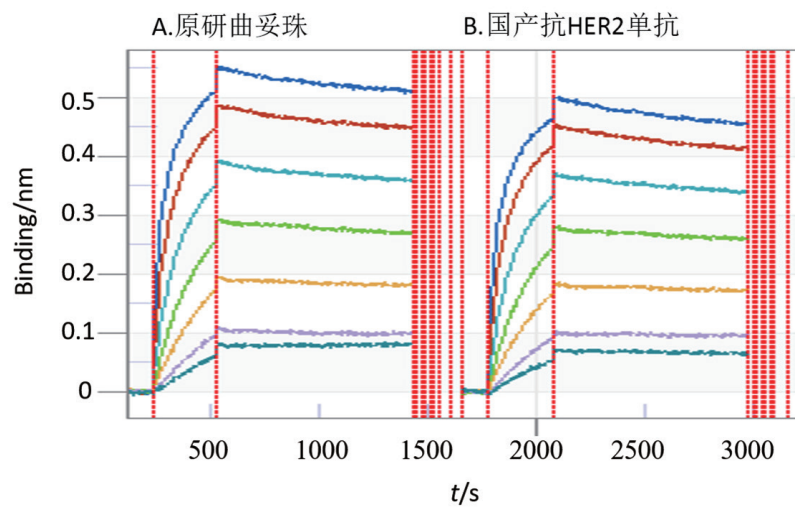


图 3 原研曲妥珠及国产抗 HER2 单抗与抗原亲和力测定信号图

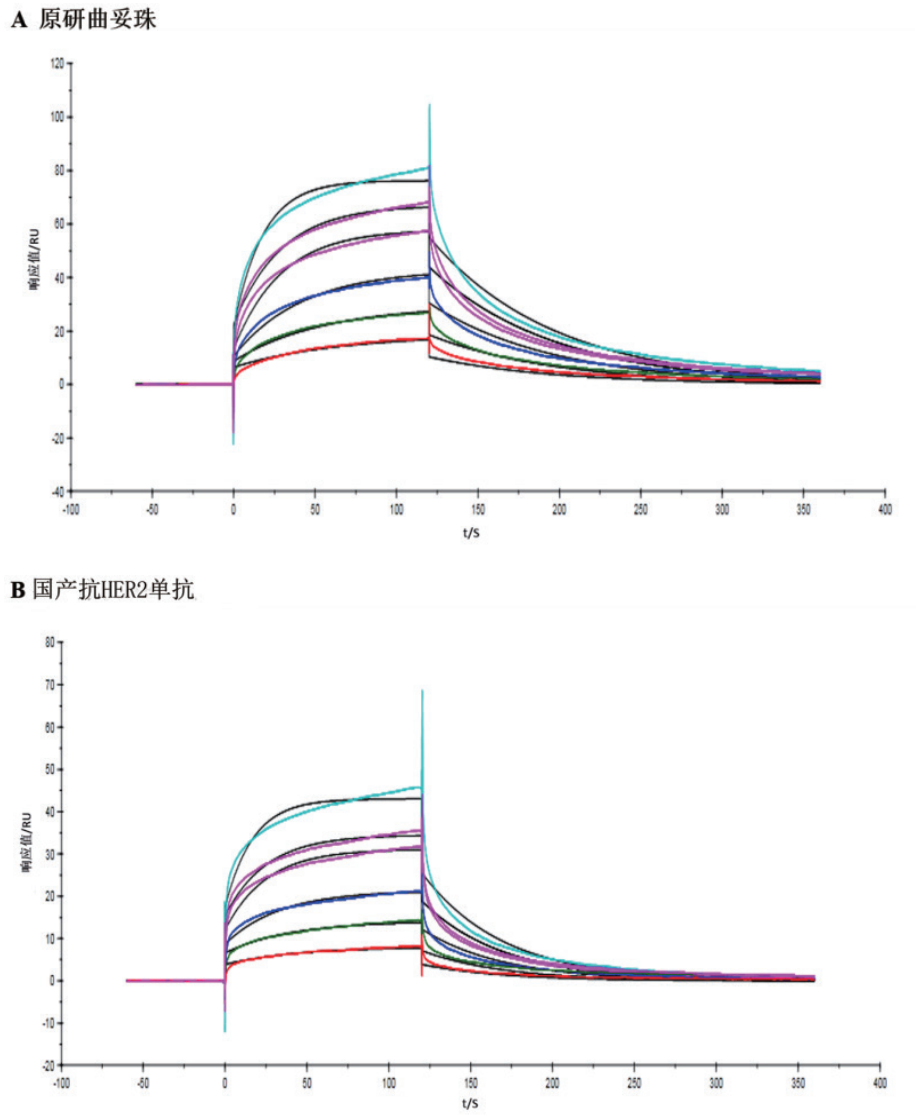


图 4 原研曲妥珠及国产抗 HER2 单抗 Fc 段与 Fc γ R III a 亲和力测定图谱

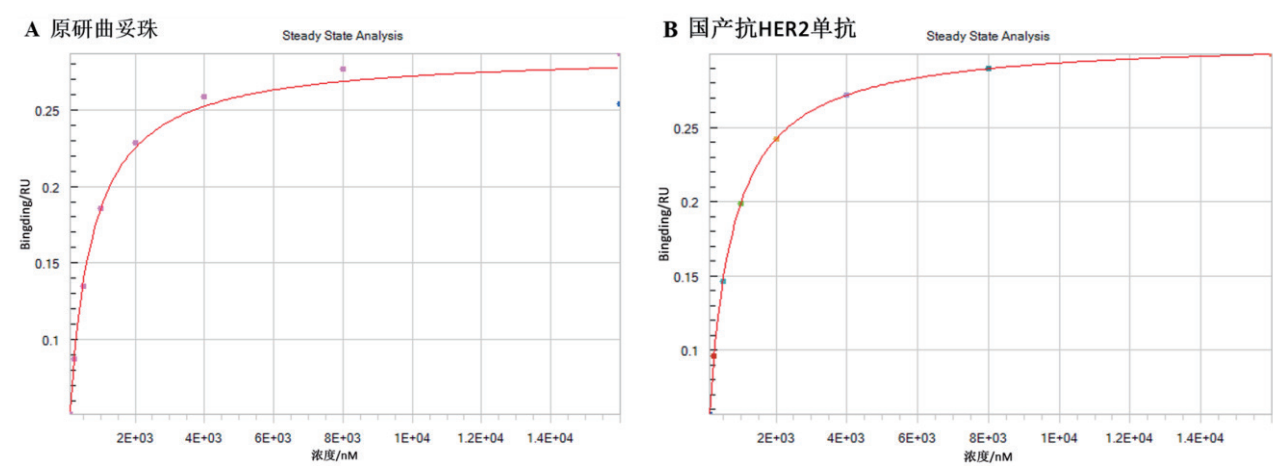


图 5 原研曲妥珠及国产抗 HER2 单抗与 FcRn 亲和力测定稳态拟合曲线

表 4 原研曲妥珠及国产抗 HER2 单抗 DSC 检测热稳定性结果

样品	T _{m1} 值			T _{m2} 值		
	范围 /℃	Mean/℃	RSD/%	范围 /℃	Mean /℃	RSD/%
原研曲妥珠 (n=7)	71.08 ~ 71.45	71.28	0.20	81.70 ~ 82.09	81.94	0.18
国产抗 HER2 单抗 (n=7)	70.66 ~ 71.19	70.88	0.22	81.45 ~ 82.01	81.61	0.24

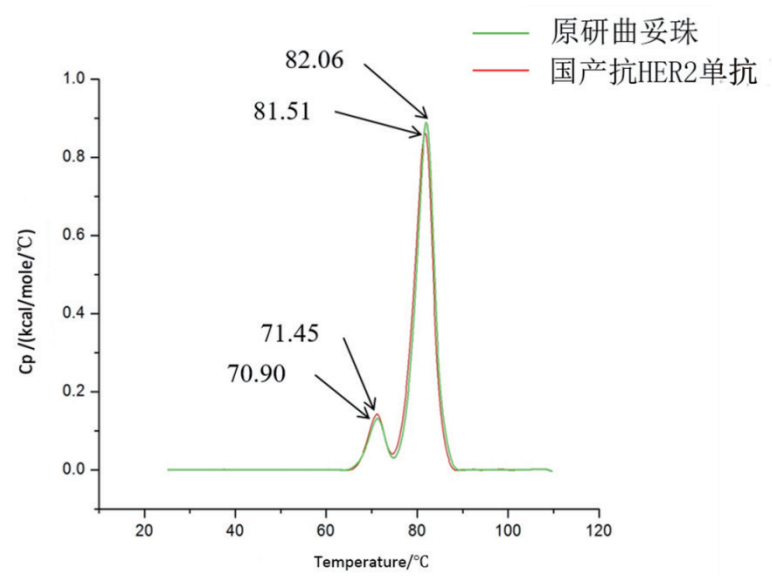


图 6 原研曲妥珠及国产抗 HER2 单抗 DSC 检测图谱

4 讨论

本研究参考国家药品监督管理局药品审评中心相关同行公开的文献^[12], 根据曲妥珠作用机制, 对国产抗HER2单抗选取部分关键质量属性进行评估分级, 并以原研药为对照进行部分关键质量属性

的检测。

4.1 电荷异质性

电荷异构体与单抗的生产工艺及运输储存密切相关, 可能影响药物的体内功能活性和药动学^[13-14], 是高风险等级质量属性。本研究运用IEC-HPLC对

羧肽酶B酶切后的抗HER2单抗进行电荷异构体检测,可评价蛋白药物纯度。赖氨酸切除虽然会改变蛋白电荷分布,导致碱性峰降低,但单抗C末端的赖氨酸切除对产品安全有效性没有影响,单抗C末端是否含有赖氨酸为非关键质量属性,因此将单抗切除C末端的赖氨酸后进行分析更能真实反映不同产品间可能影响产品安全、有效性的电荷异质性,也可与成像毛细管等电聚焦等分析方法结合,通过多种方法共同对单抗的酸性峰、主峰和碱性峰进行含量的分析和控制。

4.2 生物学活性

生物学活性是评价单抗有效性的最重要指标,也为高风险等级质量属性。抗HER2单抗的活性检测包括增殖抑制作用和ADCC活性。前者侧重于评价单抗能特异性识别肿瘤细胞表面的HER2抗原,从而抑制下游信号的转导,抑制肿瘤细胞的增殖,后者侧重于评价单抗激活靶细胞产生ADCC效应的能力。对于曲妥珠目前仅对它的增殖抑制活性进行检测,并未将单抗的ADCC功能测定纳入单抗的放行标准中,主要是由于传统的测定ADCC活性方法较为复杂,且变异程度高。已有研究^[15]表明可利用Jurkat-hFcγRⅢa-NFAT转基因细胞系作为效应细胞,SKBR3细胞系作为靶细胞,通过荧光素酶检测系统能有效地对抗HER2单抗的ADCC生物学活性进行检测。建议对于有ADCC功能的单抗,在进行药学质量研究时,应充分考虑单抗的ADCC功能差异,这不仅是对终产品的质控要求,也为工艺过程的监控提供了参考。

4.3 免疫学特性

单抗的免疫学特性主要是检测其与抗原、Fcγ、FcRn、c1q等受体的亲和力,从而评价其特异性、有效性和免疫原性。由于曲妥珠通过增殖抑制及ADCC共同发挥抗肿瘤作用,因此其抗原抗体亲和力及单抗与FcγRⅢa的亲和力均为高风险等级质量属性。治疗性单抗多为IgG抗体,研究^[16]表明IgG抗体主要通过与新生的Fc受体(FcRn)结合,保护其不被细胞溶酶体内的蛋白酶降解代谢,并通过pH变化实现单抗的胞内循环将其释放回血液,使单抗具有较长的终末半衰期,单抗与FcRn的亲和力也为高风险等级。由于IgG与FcRn的结合具有pH依赖的特点,呈现快结合、快解离的作用特点,因此传统ELISA法等难以实现检测。本研究运

用生物膜干涉技术、表面等离子共振等非标记新技术对曲妥珠及国产抗HER2单抗的免疫学特性进行检测,既操作简便,又可实现实时检测,同时也应注意到试验得到的亲和力数据仍需通过比较临床前/临床数据进行确认^[17]。

4.4 热稳定性

单抗的高亲和力与高特异性都需要以稳定的高级结构为基础,高级结构的热稳定性是影响单抗药效动力学的关键因素之一,同时良好的热稳定性所带来的紧凑结构使单抗的蛋白酶切位点更不易暴露,影响药品保质期及存放条件^[18],相关文献^[12]中将其定为中等风险质量属性,本研究通过DSC对多批次样品进行缓慢地加热,检测蛋白质结构发生改变时热量的变化,通过原始图谱的一致性来研究蛋白质的高级结构的热稳定,该方法比较灵敏,并能较好表征单抗药物各结构域的热稳定性。

4.5 建议

综上,本研究建立了抗HER2单抗电荷异质性、增殖抑制活性、免疫学特性及热稳定性等关键质量属性检测方法,为抗HER2单抗的质量控制研究及生物类似药相似性评价研究提供参考。若将本研究应用于生物类似药的相似性评价研究应注意以下几点:一是无论是FDA推荐的3Tier法还是我国《生物类似药相似性评价和适应证外推技术指导原则》^[19]均是以原研药为参照,根据质量属性与临床风险获益的相关性对质量属性进行分级,并根据分级采用不同的相似性评价策略,因此参照药的来源及批次量选择十分重要。参照药应有代表性,能反映参照药在整个生命周期的质量属性区间为佳,如不同货架期、不同规模的成品等;批次数量的要求取决于不同的质量属性和分析方法的变异程度。二是对于每个关键质量属性,建议选择2种及以上具有适当敏感性和特异性的方法进行检测,确保获得可靠的质量相似性评价可接受标准。三是对于取得的药学评价信息,还应进一步结合药物临床前研究及临床研究结果观察药物结构和功能差异的关系。根据《生物类似药相似性评价和适应证外推技术指导原则》要求,若生物类似药候选药与参照药间存在差异,需评估该差异是否对安全性、有效性产生影响,若不确定其影响,则在后续的比对研究中应设计针对性的实验进行评估^[20]。

参考文献：

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020; GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209–249.
- [2] 何馨彤, 王上, 张紫箏, 等. HER2阳性乳腺癌靶向治疗药物的临床研究进展[J]. *药物评价研究*, 2021, 44 (12): 2697–2704.
- [3] 王星涵. 曲妥珠单抗耐药机制及HER2阳性乳腺癌耐药后的治疗策略[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2022, 36 (5): 445–451.
- [4] Harbeck N, Gnant M. Breast Cancer[J]. *Lancet*, 2017, 389 (10074): 1134–1150.
- [5] Schalper KA, Kumar S, Hui P, et al. A Retrospective Population-based Comparison of HER2 Immunohistochemistry and Fluorescence in Situ Hybridization in Breast Carcinomas: Impact of 2007 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Criteria[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138 (2): 213–219.
- [6] Ramakrishna N, Temin S, Chandarlapaty S, et al. Recommendations on Disease Management for Patients with Advanced Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer and Brain Metastases: ASCO Clinical Practice Guideline Update[J]. *J Oncol Pract*, 2018, 36 (27): 2804–2807.
- [7] 国家药品监督管理局药品审评中心. 注射用曲妥珠单抗生物类似药临床试验指导原则[EB/OL]. (2020-07-20) [2024-07-11]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/2d8c4c6db9487ff5b838c4f75f2fe0c7>.
- [8] Shuptrine CW, Surana R, Weiner LM. Monoclonal Antibodies for the Treatment of Cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22 (1): 3–13.
- [9] Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural Killer Cells for Immunotherapy—Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells[J]. *Front Immunol*, 2016, 7 (91): 1–9.
- [10] Marty M, Cognetti F, Maraninchi D, et al. Randomized Phase II Trial of the Efficacy and Safety of Trastuzumab Combined with Docetaxel in Patients with Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-positive Metastatic Breast Cancer Administered as First-line Treatment: the M77001 Study Group[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23 (19): 4265–4274.
- [11] 周涵星, 徐菲. 乳腺癌抗HER2单克隆抗体研究进展[J]. *中国临床新医学*, 2022, 15 (6): 488–495.
- [12] 崔靖, 韩冬梅, 徐隆昌, 等. 曲妥珠单抗生物类似药质量“相似性评价标准”探讨[J]. *药学学报*, 2021, 56 (11): 3190–3197.
- [13] 阙红金, 韦薇. 关于地舒单抗生物类似药相似性评价的思考[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32 (24): 2477–2482.
- [14] Zhao YY, Wang N, Liu WH, et al. Charge Variants of an Avastin Biosimilar Isolation, Characterization, *in Vitro* Properties and Pharmacokinetics in Rat[J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0151874.
- [15] 刘春雨, 王馨, 于传飞, 等. 基于报告基因的抗HER2单克隆抗体ADCC生物学活性测定方法的建立及应用[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39 (1): 51–61.
- [16] Challa DK, Velmurugan R, Ober RJ, et al. FcRn: from Molecular Interactions to Regulation of IgG Pharmacokinetics and Functions[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2014, 382: 249–272.
- [17] 张峰, 武刚, 于传飞, 等. 应用生物膜干涉技术测定治疗性单抗与新生儿Fc受体的亲和力[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25 (16): 1861–1867.
- [18] 王传杰, 冯健男, 王晶. 单克隆抗体药物稳定性影响因素及优化策略[J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 37 (17): 2154–2160.
- [19] 国家药品监督管理局药品审评中心. 生物类似药相似性评价和适应证外推技术指导原则[EB/OL]. (2021-02-18) [2024-05-26]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/d92c6507a57bee9ccfc5baa1ee87fda9>.
- [20] 李思鹏, 张仲理, 许圣昌, 等. 单抗生物类似药与原研药质量相似性研究解析[J]. *中国新药杂志*, 2022, 31 (6): 523–531.

(收稿日期 2024年5月26日 编辑 郑丽娥)