

贝伐珠单抗生物类似药 BAT1706 体外生物学活性相似性研究

邓春平, 陈航, 王英华, 梁神娣, 曹迪, 俞金泉, 李胜峰, 刘翠华*

(百奥泰生物制药股份有限公司, 广东广州 510530)

摘要: 生物类似药是在质量、安全性和有效性方面与已获准注册的参照药具有相似性的治疗用生物制品。BAT1706 是百奥泰生物制药股份有限公司研发的一款贝伐珠单抗生物类似药, 可与血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGF-A) 特异性结合, 阻断其与内皮细胞表面 VEGF 受体 (VEGF receptor, VEGFR) 的结合, 阻断配体-受体介导的下游信号通路, 抑制内皮血管新生, 从而抑制肿瘤生长。采用多种分析技术对 BAT1706 与原研药 Avastin® 的体外生物学功能活性进行了全面对比分析, 以评价两者的相似性。结果显示, BAT1706 与不同形式 VEGF-A 的结合活性同 Avastin® 高度相似; 两者中和 VEGF-A 的生物学活性等效, 抑制 VEGF-A 介导的 VEGFR-2 自磷酸化活性高度相似; 此外, BAT1706 与不同类型 Fc γ 受体的亲和力同 Avastin® 高度相似, 且两者均不能诱导肿瘤细胞产生抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 及补体介导的细胞毒性作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 效应。本研究证明了 BAT1706 与 Avastin® 在体外生物学功能活性方面的相似性。

关键词: 血管内皮生长因子; 贝伐珠单抗; 生物类似药; 相似性; 生物学活性

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)07-1927-09

In vitro functional similarity assessment of a proposed biosimilar BAT1706 to bevacizumab

DENG Chun-ping, CHEN Hang, WANG Ying-hua, LIANG Shen-di, CAO Di,
YU Jin-quan, LI Sheng-feng, LIU Cui-hua*

(Bio-Thera Solutions, Ltd., Guangzhou 510530, China)

Abstract: Biosimilars are biological medicinal products that are highly similar to an already licensed reference product in terms of quality, safety, and efficacy. BAT1706 is being developed by Bio-Thera Solutions, Ltd. as a proposed biosimilar candidate to bevacizumab reference product (Avastin®). Bevacizumab acts by specifically binding to vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), and preventing the interaction of VEGF-A with its receptors on the surface of endothelial cells, then blocking the downstream signaling pathway mediated by ligand-receptor, and inhibiting endothelial angiogenesis, thus inhibiting tumor growth. Comprehensive analytical characterization studies incorporating orthogonal analytical techniques were performed to compare the *in vitro* functional activities of BAT1706 and Avastin®. BAT1706 and Avastin® showed highly similar binding activity to multiple VEGF-A isoforms and equivalent VEGF-A neutralizing activity, as well as inhibitory activity of VEGF receptor (VEGFR)-2 tyrosine kinase autophosphorylation. Both products exhibited similar binding of the Fc γ receptors and a lack of Fc-related effector functions such as antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC). Overall, the results demonstrate that BAT1706 and Avastin® are highly similar in terms of *in vitro* functional activities.

收稿日期: 2021-01-28; 修回日期: 2021-03-26.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2013ZX09401001); 广东省引进创新创业团队资助项目 (2013Y116).

*通讯作者 Tel: 86-20-89850125, E-mail: chliu@bio-thera.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0144

Key words: vascular endothelial growth factor; bevacizumab; biosimilar; similarity; functional activity

生物类似药是在质量、安全性和有效性方面与已获准注册的参照药具有相似性的治疗用生物制品^[1]。单抗类生物类似药由于靶点明确、疗效确切、毒副作用小、市场巨大,已成为生物制药研发的热点^[2]。重组单抗药物是由活细胞通过复杂生产过程制造而成,生产工艺上的微小差异很可能导致生物类似药质量的异质性,进而造成与参照药在药代动力学、有效性与安全性方面的差异^[3,4]。因此,应通过全面的质量分析对比研究来检测生物类似物和参照药之间存在的任何潜在质量差异,并评估这些差异对临床安全性、有效性及免疫原性的影响,以证明生物类似物与参照药之间的相似性^[5]。生物类似药的开发应按照逐步递进的原则,首先评估生物类似药与参照药之间的药学质量相似性,主要包括结构/理化特性、生物学功能活性、纯度与杂质及稳定性等一系列质量属性^[5-7]。其中生物学功能活性是单抗药物质量评价的关键质量属性之一,是反映其作用机制和药效学的重要指标,也可以作为理化属性分析的补充,反映产品高级结构的正确性^[6,8]。单抗药物的生物学功能活性主要包括与靶点或Fc受体的结合活性,以及反映临床相关作用机制的功能活性。

贝伐珠单抗原研药商品名为 Avastin[®] (中文商品名:安维汀),是由美国 Genentech 公司研发的一款重组人源化抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 单克隆抗体药物,可与 VEGF-A 特异性结合,阻断其与内皮细胞表面 VEGF 受体的结合,阻断配体-受体介导的下游信号通路,抑制内皮血管新生,从而抑制肿瘤生长^[9-11]。Avastin[®]于2004年获美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准上市,用于晚期结直肠癌、非小细胞肺癌、复发难治恶性胶质瘤、转移性肾癌、宫颈癌和卵巢癌等肿瘤的治疗,中国也于2010年批准其上市^[11,12]。随着原研药贝伐珠单抗专利到期,临床需求的不断提高,全球范围掀起一股贝伐珠单抗生物类似药研发的热潮,目前国内外已有多款贝伐珠单抗生物类似药批准上市^[12]。BAT1706是由百奥泰生物制药股份有限公司研发的一款贝伐珠单抗生物类似药,也是国内第一款在全球开展多中心临床研究的贝伐珠单抗类似药。本研究采用多种分析技术手段对BAT1706与原研药 Avastin[®]的体外生物学功能活性进行了全面对比分析,以评价两者的相似性。

材料与方法

仪器与材料 SpectraMax M4 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); 生物分子相互作用仪 Biacore[™] T200 和 Protein A 传感器芯片 (GE Healthcare 公司); Octet QKe 分子相互作用仪、亲和素传感器芯片及 Protein L 传感器芯片 (美国 ForteBio 公司); 超敏多因子电化学发光分析仪 QuickPlex SQ120 及 VEGFR-2 磷酸化检测试剂盒 (包括抗磷酸化 VEGFR-2 抗体预包被的石墨微孔板、SULFO-TAG 标记的抗 VEGFR-2 抗体、裂解缓冲液、封闭液、显示缓冲液等) (美国 Meso Scale Discovery 公司); 3111 型 CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) (美国 ScienCell 公司); NFAT-RE-Luc2P/KDR HEK293 细胞 (中国食品药品检定研究院); NFAT-FcR γ RIIIa (158V) Jurkat 细胞系 (本单位构建与保存); SKOV-3 细胞和 Raji 细胞 (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心); VEGF-A₁₂₁ 和 VEGF-A₁₆₅ (北京义翘神州生物技术有限公司); VEGF-A₁₁₁ 和 VEGF-A₁₈₉ (美国 R&D Systems 公司); VEGF-A₁₄₅ 和 VEGF-A₂₀₆ (美国 MyBioSource 公司); C1q (美国 Quidel 公司); Fc γ RIa、Fc γ RIIIa (158V/158F)、生物素标记的 FcRn、Fc γ RIIa (131H/131R)、Fc γ RIIb 及 Fc γ RIIIb 蛋白 (北京百普赛斯生物科技股份有限公司); CCK-8 (cell counting kit-8) 显色液 (日本 DOJINDO 公司); Bio-Glo[™] 及 ONE-Glo[™] Luciferase Assay System (美国 Promega 公司); 胎牛血清 (上海 ExCell Biology 公司); HRP 标记的山羊抗人 IgG (Fc) 抗体 (美国 Jackson Immuno Research 公司); 奥法木单抗 (瑞士 Novartis 公司); 阿达木单抗 (美国 Abbvie 公司); 曲妥珠单抗 (瑞士 Roche 公司); 人血清补体 (美国 Quidel 公司); 酶标板及 96 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司); TMB 显色液 (美国 Sigma-Aldrich 公司); 其他化学试剂均为分析级。

检测分析用样品 贝伐珠单抗原研药 Avastin[®] (来源于中国市场) 11 批,均购自罗氏 (上海) 医药贸易有限公司; 贝伐珠单抗类似药 (BAT1706) 10 批 (均由商业化规模工艺生产)、贝伐珠单抗内部活性标准品均由本公司生产制备。

ELISA 法测定 VEGF-A 结合活性 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 BAT1706 及 Avastin[®] 与 VEGF-A 抗原的结合活性。VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₄₅、VEGF-A₁₆₅、VEGF-A₁₈₉ 及

VEGF-A₂₀₆经稀释后加入 96 孔酶标板, 4 °C 包被过夜; 经脱脂牛奶封闭, 于 37 °C 孵育 1 h; 将贝伐珠单抗活性标准品和样品稀释至适当浓度, 而后以 1:3 倍比例梯度稀释, 共得到 12 个浓度梯度; 混匀后加入 96 孔板, 37 °C 温育 2 h; 洗涤后用加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG (Fc) 抗体, 于 37 °C 孵育 1 h, 洗涤后加入显色液, 37 °C 避光显色后, 加入硫酸终止。用酶标仪于 450 nm 处读取吸光度值 (A_{450})。采用 SoftMax Pro 6.5 软件, 以活性标准品或样品浓度为横坐标, 对应吸光度值为纵坐标, 进行四参数拟合, 绘制抗体浓度-反应曲线, 其中拟合的四参数方程的 C 值即为半数有效浓度 (half maximal effective concentration, EC_{50}), 样品相对结合活性 = 活性标准品 EC_{50} /样品 EC_{50} × 100%。

SPR 法测定 VEGF-A 结合动力学 采用基于表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 的分析方法对 BAT1706 及 Avastin[®] 与 VEGF-A₁₁₁、VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₆₅ 抗原的结合动力学进行了测定。贝伐珠单抗稀释至 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过 Protein A 传感器芯片捕获 30 s; VEGF-A₁₁₁ 和 VEGF-A₁₂₁ 稀释至 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, VEGF-A₁₆₅ 稀释至 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后继续以 1:2 倍比例梯度稀释, 共得到 8 个浓度梯度, 结合动力学测定采用 Biacore[™] T200 生物分子相互作用仪以 25 °C 多循环动力学方式, 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速作用 180 s, 解离 1 800 s, 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸 (pH 1.5) 再生 60 s。采用 Biacore[™] T200 Evaluation Software 3.0 软件分析处理数据, 按照 1:1 动力学模型拟合计算结合常数 (k_a), 解离常数 (k_d) 及亲和常数 (K_D)。

HUVEC 细胞增殖抑制法测定 VEGF-A 中和活性 采用 HUVEC 增殖抑制法测定 BAT1706 及 Avastin[®] 对 VEGF-A 的中和活性。HUVEC 细胞以每孔 6×10^3 个接种于 96 孔板, 置 CO₂ 培养箱培养 5~6 h。将贝伐珠单抗活性标准品及样品预稀释至 20 000、5 000、2 500、1 250、830、556、370、185、92.6 和 23.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 同时将 VEGF-A₁₆₅ 稀释至 80 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取活性标准品及样品系列稀释液与 VEGF-A₁₆₅ 溶液等体积混合, 置 CO₂ 培养箱培养 1 h; 吸取上述混合液加至 HUVEC 细胞, 置 CO₂ 培养箱培养 66~72 h; 而后加入 CCK-8 显色液, 置 CO₂ 培养箱孵育 4 h, 细胞培养板室温平衡后, 于 450 nm 处读取吸光度值 (A_{450})。采用 SoftMax Pro 6.5 软件, 以活性标准品或样品浓度为横坐标, 对应吸光度值为纵坐标, 进行四参数拟合, 绘制抗体浓度-反应曲线, 其中拟合的四参数方程的 C 值即为 EC_{50} , 样品相对生物学活性 = 活性标准品 EC_{50} /样品 EC_{50} × 100%。

报告基因法测定 VEGF-A 中和活性 采用中国食品药品检定研究院 (中检院) 开发的荧光素酶报告基因

法 (reporter gene assay, RGA) 测定 BAT1706 及 Avastin[®] 对 VEGF-A 的中和活性。稳定表达 VEGFR-2 (KDR) 和 NFAT 报告基因的 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 细胞以每孔 5×10^4 个接种于 96 孔不透明细胞培养板, 置 CO₂ 培养箱培养。用稀释液 (含 10% 胎牛血清、40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ VEGF-A₁₆₅ 的 DMEM 培养基) 将贝伐珠单抗活性标准品及样品稀释至 3 000、1 500、750、375、187.5、93.75、46.88、23.44 和 11.72 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 加至 HEK293 细胞, 置 CO₂ 培养箱培养 5~7 h; 细胞板室温平衡后, 加入 Bio-Glo[™] Luciferase 底物溶液; 酶标仪以化学发光模式读取各孔发光值 (relative light unit, RLU)。采用 SoftMax Pro 6.5 软件, 以活性标准品/样品浓度为横坐标, 对应发光值为纵坐标, 进行四参数拟合, 绘制抗体浓度-反应曲线, 其中拟合的四参数方程的 C 值即为 EC_{50} , 样品相对生物学活性 = 活性标准品 EC_{50} /样品 EC_{50} × 100%。

抑制 VEGFR-2 受体酪氨酸激酶自磷酸化活性 采用基于石墨微孔板的超敏电化学发光免疫分析技术测定 BAT1706 及 Avastin[®] 抑制 VEGF-A 介导的 VEGFR-2 自磷酸化活性。HUVEC 细胞以每孔 2×10^4 个接种于 96 孔板, 置 CO₂ 培养箱培养 12~18 h。将贝伐珠单抗稀释至 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 然后继续以 1:3 倍比例梯度稀释, 共得到 8 个浓度梯度; 同时将 VEGF-A₁₆₅ 稀释至 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 取贝伐珠单抗系列稀释液与 VEGF-A₁₆₅ 溶液等体积混合, 置 CO₂ 培养箱培养 45 min; 吸取上述混合液加至 HUVEC 细胞 (预先弃去培养液), 置 CO₂ 培养箱刺激 5 min; 弃去培养液迅速加入裂解缓冲液, 于冰上裂解 30 min 后转入 EP 管, 在 4 °C 条件下以 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min。取预先包被了抗磷酸化 VEGFR-2 抗体的石墨微孔板, 洗涤后加入封闭液, 室温条件下以 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育 1 h, 然后洗涤 3 次; 加入裂解液上清, 室温条件下以 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育 1 h, 然后洗涤 3 次; 加入 SULFO-TAG 标记的抗 VEGFR-2 抗体, 室温条件下以 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 孵育 1 h; 洗涤 3 次, 加入显色缓冲液, 超敏多因子电化学发光分析仪读取各孔电化学发光信号 (electrochemiluminescence signal)。采用 SoftMax Pro 6.5 软件, 以贝伐珠单抗浓度为横坐标, 对应光信号值为纵坐标, 进行四参数拟合, 绘制抗体浓度-反应曲线, 其中拟合的四参数方程的 C 值即为 EC_{50} 值。

SPR 法测定 Fc γ RIa、Fc γ RIIIa 亲和力 采用 SPR 法对 BAT1706 及 Avastin[®] 与 Fc γ RIa、Fc γ RIIIa 的亲和力进行测定。贝伐珠单抗稀释至 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 以 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过 Protein A 传感器芯片捕获 20 s; Fc γ RIa 蛋白稀释至 20 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Fc γ RIIIa (158V/158F) 稀释至 1 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后继续以 1:2 倍比例梯度稀释, 共得到 8 个浓度梯度; 亲和力测定采用 Biacore[™] T200 生物分

子相互作用仪以 25 °C 多循环动力学方式, Fc γ R1a 亲和力检测条件为: 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速作用 180 s, 解离 1 200 s; Fc γ R1IIa (158V) 亲和力检测条件为: 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速作用 60 s, 解离 60 s; Fc γ R1IIa (158F) 亲和力检测条件为: 30 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 流速作用 90 s, 解离 90 s; 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸 (pH 1.5) 再生 60 s。采用 Biacore™ T200 Evaluation Software 3.0 软件分析处理数据, 按照 1:1 动力学模型 (Fc γ R1a) 或稳态动力学模型 (Fc γ R1IIa) 拟合计算亲和常数 (K_D)。

BLI 法测定 FcRn、Fc γ R1IIa、Fc γ R1Ib、Fc γ R1IIb 亲和力 采用基于生物膜层光学干涉技术 (bio-layer interferometry, BLI) 的分析方法测定 BAT1706 及 Avastin® 与 FcRn、Fc γ R1IIa、Fc γ R1Ib、Fc γ R1IIb 的亲和力。生物素标记的 FcRn、Fc γ R1IIa (131H/131R)、Fc γ R1Ib 及 Fc γ R1IIb 稀释至 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 亲和素传感器芯片在 FcRn 及 Fc γ R1IIb 稀释液中捕获 180 s, 在 Fc γ R1IIa (131H/131R) 及 Fc γ R1Ib 稀释液中捕获 120 s; 贝伐珠单抗稀释至 200 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (FcRn) 或 5 000 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Fc γ R1IIa、Fc γ R1Ib、Fc γ R1IIb), 然后继续以 1:2 比例梯度稀释, 共得到 8 个浓度梯度; 亲和力测定采用 Octet QKe 分子相互作用仪以 25 °C 多循环动力学方式, FcRn、Fc γ R1IIa (131H/131R) 及 Fc γ R1Ib 亲和力检测条件为: 结合 60 s, 解离 60 s; Fc γ R1IIb 亲和力检测条件为: 结合 90 s, 解离 90 s; 用 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 缓冲液 (pH 8.3) (FcRn) 或 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化镁溶液 (pH 8.3) (Fc γ R1IIa、Fc γ R1Ib 和 Fc γ R1IIb) 再生 30 s。采用 Octet QKe Data Analysis 9.0 软件分析处理数据, 按照稳态动力学模型拟合计算亲和常数 (K_D)。

BLI 法测定 C1q 亲和力 采用 BLI 法测定 BAT1706 及 Avastin® 与补体 C1q 的亲和力。贝伐珠单抗稀释至 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Protein L 传感器芯片在贝伐珠单抗稀释液中捕获 60 s; C1q 稀释至 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后继续以 1:2 比例梯度稀释, 共得到 8 个浓度梯度; 亲和力测定采用 Octet QKe 分子相互作用仪以 25 °C 多循环动力学方式, 结合 60 s, 解离 60 s; 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸 (pH 1.5) 再生 30 s。采用 Octet QKe Data Analysis 9.0 软件分析处理数据, 按照 1:1 动力学模型拟合计算亲和常数 (K_D)。

抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) 采用可同时表达分泌型和细胞膜结合型 VEGF-A 的人卵巢腺癌细胞 (SKOV-3 细胞) 为靶细胞, 以人工构建的可高表达 Fc γ R1IIa (158V) 及 NFAT-luc 荧光素酶报告基因的 Jurkat 细胞 [NFAT-Fc γ R1IIa (158V) Jurkat] 作为效应细胞的报告基因法对 BAT1706 与 Avastin® 进行 ADCC 活性分析。由于 SKOV-3 细胞可高表达 HER2 抗原, 故采用抗 HER2 单抗 (曲妥珠单抗) 为阳性对照, 阿

达木单抗为阴性对照。SKOV-3 细胞以每孔 2.5×10^4 个接种于 96 孔板; 将曲妥珠单抗、贝伐珠单抗及阿达木单抗稀释至 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 然后继续以 1:5 比例梯度稀释, 共得到 10 个浓度梯度; 将贝伐珠单抗、阳性对照及阴性对照加入靶细胞; NFAT-Fc γ R1IIa (158V) Jurkat 效应细胞以每孔 6×10^4 个接种于 96 孔板, CO_2 培养箱孵育 4~5 h, 而后于室温平衡 5 min, 加入 ONE-Glo™ Luciferase 底物溶液后采用酶标仪以化学发光模式读取各孔发光值 (RLU)。采用 SoftMax Pro 6.5 软件, 以抗体浓度为横坐标, 对应发光值为纵坐标, 进行四参数拟合, 绘制抗体浓度-反应曲线。

补体介导的细胞毒性作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 采用 SKOV-3 细胞为靶细胞, 以正常人血清补体对 BAT1706 与 Avastin® 进行 CDC 活性分析。采用可表达 CD20 的淋巴瘤细胞 Raji 细胞及抗 CD20 单抗 (奥法木单抗) 为阳性对照, 阿达木单抗为阴性对照; SKOV-3 及 Raji 细胞以每孔 2×10^4 个接种于 96 孔板; 将奥法木单抗、贝伐珠单抗及阿达木单抗稀释至 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 然后继续以 1:4 比例梯度稀释, 共得到 9 个浓度梯度, 以 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为空白孔; 将贝伐珠单抗及阿达木单抗加入靶细胞中, 奥法木单抗加入 Raji 细胞中, 5% 的正常人血清补体加入 96 孔板, CO_2 培养箱孵育 4~5 h, 而后加入 CCK-8 显色液, 置 CO_2 培养箱孵育 2~4 h, 于 450 nm 处读取吸光度值 (A_{450}); 按照公式“细胞毒性 = $(1 - \text{实验孔 } A_{450} / \text{空白孔 } A_{450}) \times 100\%$ ”计算每个浓度的细胞毒性, 采用 SoftMax Pro 6.5 软件, 以抗体浓度为横坐标, 对应细胞毒性为纵坐标, 进行四参数拟合, 绘制抗体浓度-反应曲线。

统计学分析与相似性评价 参考 FDA^[6,13]、EMA (European Medicines Agency)^[14] 发布的有关生物类似药与参照药质量分析相似性评价的指导原则及同类产品的相关文献^[15,16], 根据产品质量属性与临床效果的相关性进行 Tier 风险分级, 结合分析方法的具体特点及数据类型确定相似性评价方法。Tier 1 为与作用机制相关的临床效果风险最高或与作用机制直接相关的质量属性, 如 VEGF-A₁₆₅ 结合活性及 VEGF-A 中和活性; 采用等效性检验法进行相似性评价, 评价标准为: 类似药与参照药均值差值的 90% 置信区间 (confidence interval, CI) 落在等效性界值 (equivalence acceptance criterion, EAC) 范围内即为等效, 等效性界值为 ± 1.5 倍参照药标准差 [± 1.5 standard deviation (SD)]; Tier 2 为对于临床效果风险中等或相对较低的质量属性, 如 Fc γ R1IIa (158V/158F)、FcRn、C1q 亲和力; 采用质量参数法进行评价, 评价标准为: 90% 以上类似药批次落在参照药均值 ± 3 SD 范围内即为相似; Tier 3 为对于临床效果风

险相对最低或不可量化的质量属性, 如各种表征研究的功能活性质量属性, VEGF-A₁₂₁ (或145、189、209) 结合活性、VEGF-A 结合动力学、VEGFR-2 受体酪氨酸激酶自磷酸化抑制活性、Fc 受体亲和力 (包括 FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIb)、ADCC 及 CDC, 采用图谱对比法或定性描述法进行评价。统计分析软件为 Minitab 17。

结果

1 Fab 相关的生物功能活性

1.1 VEGF-A 结合活性 贝伐珠单抗可与 VEGF-A 特异性结合, 从而阻断配体-受体介导的下游信号通路而发挥药效。因此, 与 VEGF-A 结合是贝伐珠单抗发挥药效的首要作用机制^[10]。由于 mRNA 不同的剪切方式, VEGF-A 有不同长度多种形式, 主要包括 VEGF-A₁₁₁、VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₄₅、VEGF-A₁₆₅、VEGF-A₁₈₃、VEGF-A₁₈₉ 和 VEGF-A₂₀₆, 其中 VEGF-A₁₆₅ 和 VEGF-A₁₂₁ 是最主要的 2 种^[17,18]。采用 ELISA 和 SPR 两种分析方法对 BAT1706 及 Avastin® 与多种主要 VEGF-A 亚型蛋白的结合活性进行了系统的对比研究。首先采用 ELISA 法测定了 BAT1706 及 Avastin® 与 VEGF-A₁₆₅ 的相对结合活性。结果显示, BAT1706 多批次结果的均值为 96%, Avastin® 为 100%, 两者均值差值的 90% CI 为 (-8.32, 1.44)%, 完全落在等效性界值 (± 12.63) % 范围内, 证明两者与 VEGF-A₁₆₅ 的结合活性等效 (图 1)。采用 ELISA 法对其他 4 个主要 VEGF-A 进行了表征测定。结果表明, BAT1706 与 VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₄₅、VEGF-A₁₈₉、VEGF-

A₂₀₆ 的结合活性高度相似 (表 1)。

Table 1 VEGF-A isoforms binding activity for BAT1706 and Avastin®. The relative activity was represented as mean ± standard deviation (SD)

VEGF-A isoform	Batch (BAT1706: Avastin®)	Relative activity/%	
		BAT1706	Avastin®
VEGF-A ₁₂₁	10:7	101 ± 6	93 ± 9
VEGF-A ₁₄₅	3:3	93 ± 4	92 ± 4
VEGF-A ₁₈₉	3:3	94 ± 2	89 ± 2
VEGF-A ₂₀₆	3:3	91 ± 3	92 ± 2

为进一步表征 BAT1706 及 Avastin® 与 VEGF-A 的结合特性, 采用 SPR 法对 BAT1706、Avastin® 与 VEGF-A₁₁₁、VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₆₅ 的结合动力学进行了测定。结果显示, BAT1706 与 VEGF-A₁₁₁、VEGF-A₁₂₁、VEGF-A₁₆₅ 的结合、解离速率常数及亲和力同 Avastin® 高度相似 (表 2)。上述结果表明, BAT1706 与多种形式的 VEGF-A 的结合活性同 Avastin® 高度相似。

1.2 VEGF-A 中和活性 (HUVEC 细胞增殖抑制法)

贝伐珠单抗治疗肿瘤的作用机制是与 VEGF-A 特异性结合, 阻断其与内皮细胞表面 VEGF 受体的结合, 从而抑制内皮血管新生, 发挥抗肿瘤作用。HUVEC 细胞增殖抑制法作为贝伐珠单抗生物学活性检测的经典方法, 能最大程度模拟其在体内抑制新生血管生成的过程^[19,20]。测定结果显示, BAT1706 多批次结果的均值为 97%, Avastin® 为 94%, 两者均值差值的 90% CI 为 (-3.08, 8.28) %, 完全落在等效性界值 (± 12.74) % 范围

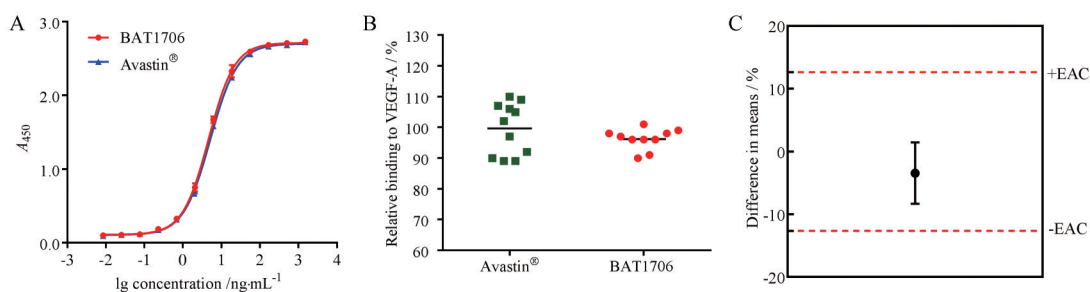


Figure 1 The relative binding activity of BAT1706 ($n = 10$, red) and Avastin® ($n = 11$, green) to VEGF-A₁₆₅, tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A: The representative dose-response curve of vascular endothelial growth factor (VEGF)-A₁₆₅ binding; B: Scatter plot of binding to VEGF-A₁₆₅ for BAT1706 and Avastin®. The mean relative binding activities are indicated by the solid lines; C: Equivalence testing graph of binding to VEGF-A₁₆₅ for BAT1706 and Avastin®. EAC: Equivalence acceptance criterion; the solid dot represents the mean difference and the vertical bar represents the 90% confidence interval (CI)

Table 2 VEGF-A isoforms binding kinetics for BAT1706 and Avastin®. Data were presented as mean ± SD

Product	Batch	VEGF-A isoform	$k_a/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$	k_d/s^{-1}	$K_D/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
BAT1706	3	VEGF-A ₁₁₁	$(1.96 \pm 0.07) \times 10^5$	$(6.39 \pm 0.35) \times 10^{-5}$	$(3.26 \pm 0.29) \times 10^{-10}$
	3	VEGF-A ₁₂₁	$(1.79 \pm 0.08) \times 10^5$	$(5.86 \pm 0.28) \times 10^{-5}$	$(3.29 \pm 0.24) \times 10^{-10}$
	3	VEGF-A ₁₆₅	$(1.03 \pm 0.06) \times 10^6$	$(5.51 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(5.35 \pm 0.29) \times 10^{-11}$
Avastin®	3	VEGF-A ₁₁₁	$(2.02 \pm 0.06) \times 10^5$	$(6.13 \pm 0.35) \times 10^{-5}$	$(3.03 \pm 0.26) \times 10^{-10}$
	3	VEGF-A ₁₂₁	$(1.53 \pm 0.06) \times 10^5$	$(6.00 \pm 0.28) \times 10^{-5}$	$(3.91 \pm 0.32) \times 10^{-10}$
	3	VEGF-A ₁₆₅	$(0.96 \pm 0.03) \times 10^6$	$(4.61 \pm 0.38) \times 10^{-5}$	$(4.79 \pm 0.40) \times 10^{-11}$

内,证明两者中和 VEGF-A 的生物学活性等效(图2)。

1.3 VEGF-A 中和活性(报告基因法) 由中国食品药品检定研究院开发的荧光素酶报告基因法(RGA)模拟人体生理状态下 VEGF 的信号传导机制,是一种新型转基因细胞生物学活性测定方法,具有检测周期短、方法变异小、信噪比高等优点,已应用于一些 VEGF 靶点生物药物的生物学活性检测^[20,21]。测定结果显示, BAT1706 多批次结果的均值为 95%, Avastin[®] 为 88%, 两者均值差值的 90% CI 为 (-0.37, 11.70)%, 完全落在等效性界值 (± 11.84)% 范围内,证明两者中和 VEGF-A 的生物学活性等效(图3)。

1.4 抑制 VEGFR-2 受体酪氨酸激酶自磷酸化活性 VEGF-A 与内皮细胞膜上 VEGFR-2 结合后, VEGFR-2 二聚化导致蛋白构象发生变化,使 VEGFR-2 受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK) 上的酪氨酸残基发生自磷酸化从而激活下游信号通路,诱导内皮细胞增生和血管增生^[22,23]。贝伐珠单抗可抑制 VEGF-A 介导的 VEGFR-2 自磷酸化^[24]。测定结果显示, BAT1706 与 Avastin[®] 均显示出浓度依赖性抑制 VEGF-A 介导的 VEGFR-2 自磷酸化活性(图4),且 EC₅₀ 值非常接近,分别为 206 ± 27 和 205 ± 15 ng·mL⁻¹ ($n = 3$, mean \pm SD),

故 BAT1706 与 Avastin[®] 抑制 VEGF-A 介导的 VEGFR-2 自磷酸化活性高度相似。

2 Fc 受体亲和力

抗体不但可通过其 Fab 段结合靶标抗原发挥生物学功能,而且可通过其 Fc 段结合免疫细胞上的 Fc 受体发挥诸如细胞吞噬、内吞、ADCC、CDC 等效应^[4]。此外,治疗性单抗的糖基化程度、聚集状态等属性均能影响其与 Fc 受体的结合活性,并可能进一步影响单抗的治疗作用^[25,26],因此对生物类似药与原研药的 Fc 受体亲和力进行对比分析具有重要意义。

Fc γ R3a 是一种在自然杀伤细胞上表达的受体,由于基因多态性具有 Fc γ R3a (158V) 和 Fc γ R3a (158F) 两种形态,是介导单抗发挥 ADCC 的主要受体^[26,27]。此外, Fc γ R3a 对抗 Fc 段的糖基化修饰比较敏感^[28]。因此, Fc γ R3a 的亲和力测定可以评估单抗 Fc 段的初级及高级结构。采用 SPR 方法对 BAT1706、Avastin[®] 与 Fc γ R3a (158V) 及 Fc γ R3a (158F) 的亲和力进行了测定。结果显示, BAT1706 与 Fc γ R3a (158V) 及 Fc γ R3a (158F) 的亲和力结果均落在 Avastin[®] 质量参数范围内(均值 ± 3 SD)(图 5A、B),表明 BAT1706 与 Fc γ R3a (158V) 及 Fc γ R3a (158F) 的亲和力同 Avastin[®] 高度相似。

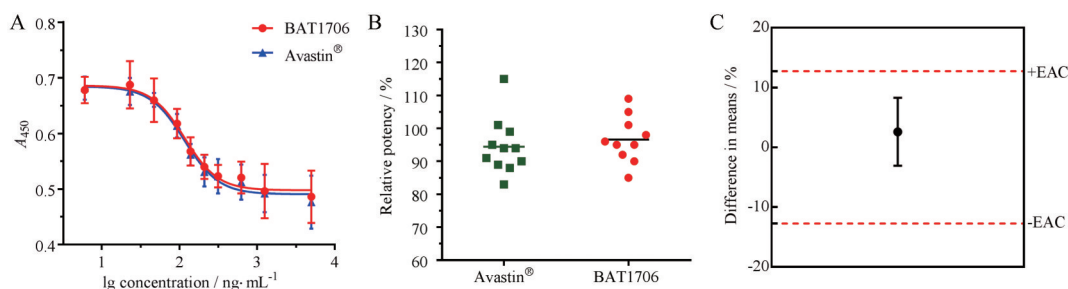


Figure 2 The relative VEGF-A neutralizing activity of BAT1706 ($n = 10$, red) and Avastin[®] ($n = 11$, green) tested by human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) proliferation inhibition bioassay. A: The representative dose-response curve of VEGF-A neutralizing activity; B: Scatter plot of VEGF-A neutralizing activity for BAT1706 and Avastin[®]. The mean relative biological activities are indicated by the solid lines; C: Equivalence testing graph of VEGF-A neutralizing activity for BAT1706 and Avastin[®]; the solid dot represents the mean difference and the vertical bar represents the 90% CI

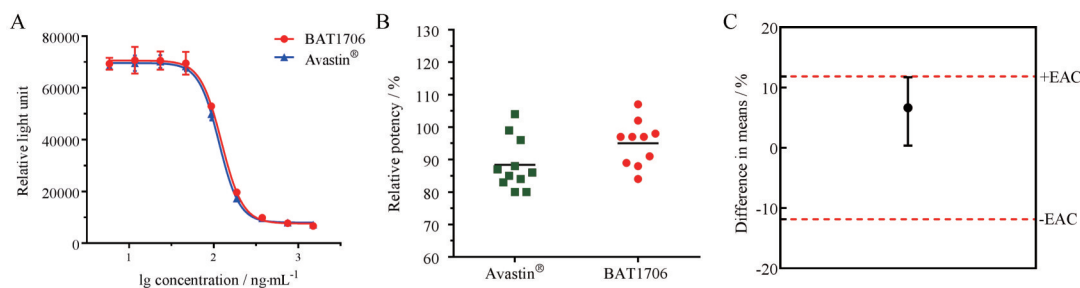


Figure 3 The relative VEGF-A neutralizing activity of BAT1706 ($n = 10$, red) and Avastin[®] ($n = 11$, green), tested by reporter gene assay (RGA). A: The representative dose-response curve of VEGF-A neutralizing activity; B: Scatter plot of VEGF-A neutralizing activity for BAT1706 and Avastin[®]. The mean relative biological activities are indicated by the solid lines; C: Equivalence testing graph of VEGF-A neutralizing activity for BAT1706 and Avastin[®]; the solid dot represents the mean difference and the vertical bar represents the 90% CI

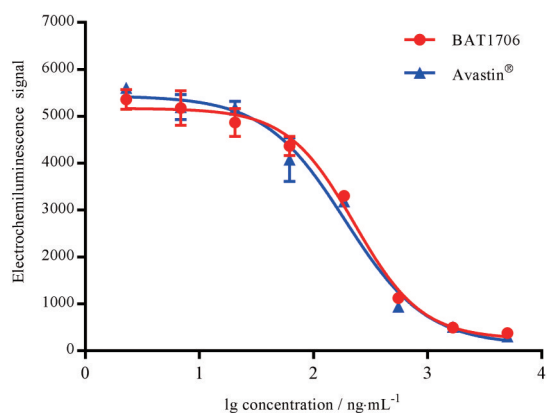


Figure 4 Dose-response curve of VEGFR-2 receptor tyrosine kinase (RTK) autophosphorylation inhibitory activity for BAT1706 and Avastin[®]

新生儿受体 FcRn 在酸性条件下 (pH 6.0) 可结合 IgG 的 Fc 段, 并在中性条件下 (pH 7.4) 释放 IgG, FcRn 通过与 IgG 相互作用, 延长 IgG 在体内的半衰期, 维持其动态平衡^[29], 因此, FcRn 的亲和力测定可以预测单抗的体内代谢 (pharmacokinetics, PK) 情况^[4]。采用 BLI 方法对 BAT1706、Avastin[®] 与 FcRn 的亲和力进行了测定; 结果显示, BAT1706 与 FcRn 的亲和力结果中 90% 批次 (9/10) 落在 Avastin[®] 的质量参数范围内 (图 5C), 表明 BAT1706 与 FcRn 的亲和力同 Avastin[®] 高度相似。

BAT1706、Avastin[®] 与其他 Fc γ 受体 (如 Fc γ RIa、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb 和 Fc γ RIIIb) 的亲和力分析可表征单抗分子的高级结构。测定结果显示, BAT1706、Avastin[®] 与上述几种 Fc γ 受体的亲和力高度相似 (表 3)。

3 生物效应子功能

生物效应子功能 (如 ADCC 和 CDC) 是抗肿瘤类单抗药物发挥生物治疗作用的重要机制^[30]。贝伐珠单抗是一种经典的重组人源化 IgG1 型抗体, 能通过其 Fc 段与免疫细胞的 Fc γ 受体或血清中补体蛋白结合, 从而通过招募免疫细胞或激活补体介导靶细胞裂解。

Table 3 Fc γ Rs binding affinity for BAT1706 and Avastin[®]. Data were presented as mean \pm SD

Product	Batch	Fc γ R	K_D / mol·L ⁻¹
BAT1706	3	Fc γ RIa	(5.88 \pm 0.32) $\times 10^{-11}$
	3	Fc γ RIIa (131H)	(6.53 \pm 0.33) $\times 10^{-7}$
	3	Fc γ RIIa (131R)	(7.17 \pm 0.12) $\times 10^{-7}$
	3	Fc γ RIIb	(1.27 \pm 0.06) $\times 10^{-6}$
	3	Fc γ RIIb	(4.80 \pm 1.06) $\times 10^{-6}$
Avastin [®]	3	Fc γ RIa	(5.91 \pm 0.37) $\times 10^{-11}$
	3	Fc γ RIIa (131H)	(8.27 \pm 0.32) $\times 10^{-7}$
	3	Fc γ RIIa (131R)	(8.57 \pm 0.21) $\times 10^{-7}$
	3	Fc γ RIIb	(1.47 \pm 0.12) $\times 10^{-6}$
	3	Fc γ RIIb	(5.60 \pm 0.46) $\times 10^{-6}$

采用敏感的荧光素酶报告基因法在可表达 VEGF-A 的 SKOV-3 肿瘤细胞上对 BAT1706 与 Avastin[®] 的生物效应子功能进行了表征分析。结果显示, BAT1706 与 Avastin[®] 均不能诱导产生 ADCC 效应 (图 6A)。

C1q 是经典补体激活途径的第一个蛋白分子, 抗体与 C1q 的亲和力测定是评价 CDC 效应的第一步^[4]。测定结果显示, BAT1706 与 C1q 的亲和力结果中 50% 批次 (5/10) 落在 Avastin[®] 的质量参数范围内 (图 6B), 但两者的均值非常接近 (分别为 5.76 和 6.84 nmol·L⁻¹), 表明差异非常微小。研究发现 BAT1706 与 Avastin[®] 均不能诱导产生 CDC 效应 (图 6C), 因此 C1q 亲和力的微小差异不会导致两者临床疗效上的差异。

讨论

药学质量相似性研究是生物类似药开发的基础, 是建立基于整体证据评价生物类似药与原研药相似性的关键^[31]。质量相似性研究通常包括结构与理化性质、纯度与杂质、生物学功能活性及稳定性等, 其中生物学功能相关的质量属性的对比研究可直接反映临床治疗的有效性, 也是生物类似药适应症外推的重要考量, 因此对生物类似药与原研药进行全面的体外生物学功能活性对比研究尤为重要。

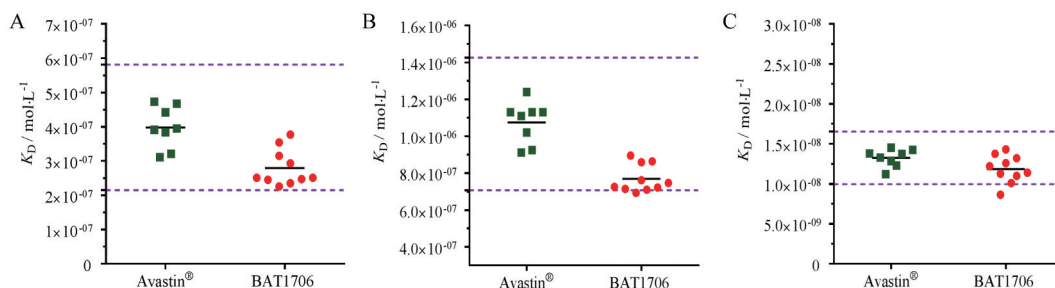


Figure 5 Fc γ RIIIa (158) and FcRn binding affinity for BAT1706 ($n = 10$, red) and Avastin[®] ($n = 8$, green). A: Fc γ RIIIa (158V) binding affinity for BAT1706 and Avastin[®], tested by Biacore surface plasmon resonance (SPR); B: Fc γ RIIIa (158F) binding affinity for BAT1706 and Avastin[®], tested by Biacore SPR; C: FcRn binding affinity for BAT1706 and Avastin[®], tested by Octet bio-layer interferometry (BLI). The mean binding affinity is indicated by the solid line

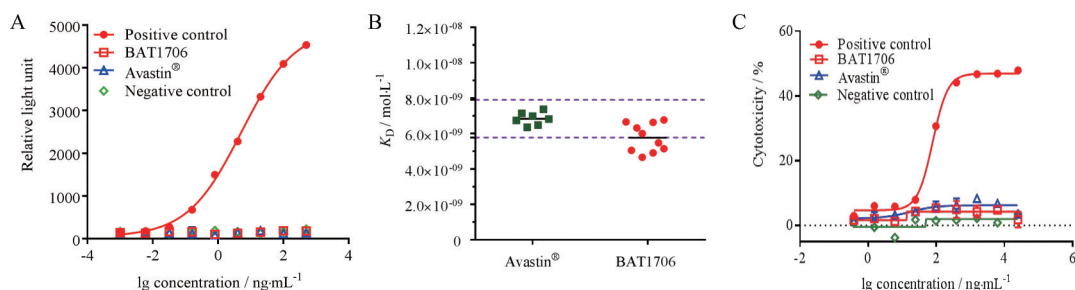


Figure 6 A: Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) activity for BAT1706 and Avastin®; B: C1q binding affinity for BAT1706 ($n = 10$, red) and Avastin® ($n = 7$, green), tested by Octet BLI; C: Complement-dependent cytotoxicity (CDC) activity for BAT1706 and Avastin®

基于贝伐珠单抗作用机制研究已有的科学知识、各国监管机构对单抗类生物类似药研发与评价的相关指导原则及同类产品的相关文献,从Fab段介导的抗原结合活性和生物功能活性、Fc段与Fc受体的亲和力及生物效应子功能3个方面对BAT1706与原研药Avastin®进行了全面的对比研究,以评价两者的体外生物学功能活性的相似性。贝伐珠单抗治疗肿瘤的作用机制是与VEGF-A特异性结合,阻断VEGF/VEGFR-2介导的下游信号通路,抑制内皮血管新生,从而抑制肿瘤生长。采用ELISA法和SPR法对BAT1706、Avastin®与6种主要VEGF-A抗原的结合活性进行了对比研究。结果显示,BAT1706与不同形式VEGF-A的结合活性同Avastin®高度相似。采用经典的HUVEC细胞增殖抑制法和新型的荧光报告基因法对BAT1706、Avastin®中和VEGF-A活性进行分析对比,结果显示两者中和VEGF-A的生物学活性等效。此外,分析对比显示,BAT1706、Avastin®抑制VEGF-A介导的VEGFR-2自磷酸化活性高度相似。贝伐珠单抗Fc段与不同类型Fc γ 受体的亲和力可表征其糖基化水平、聚集状态及高级结构的差异,分析结果表明,BAT1706、Avastin®与不同类型Fc γ 受体的亲和力高度相似。抗体与FcRn的亲和力可以预测其在体内的PK,研究显示BAT1706、Avastin®与FcRn的亲和力高度相似,因此可以预测两者的临床PK不会有显著差异,这也得到了BAT1706国际I期临床研究^[32]及Zhang等^[33]研究的证实。此外,分析表明BAT1706与Avastin®均不能诱导肿瘤细胞产生ADCC及CDC效应,这与文献报道一致^[15,34],因此BAT1706与Avastin®在C1q亲和力上的微小差异不会引起临床疗效上的差异。

全面的体外生物学功能活性研究显示,BAT1706与Avastin®高度相似;同时理化分析对比研究显示,BAT1706与Avastin®在初级/高级结构、纯度与杂质、稳定性等方面高度相似(另行报道);观察到的糖基化水平及电荷异质性的微小差异并不会导致体外生物学功

能活性上的显著差异;同时,BAT1706与Avastin®联合化疗治疗晚期非鳞状非小细胞肺癌的全球多中心III期临床研究也表明,两者临床疗效等效,PK、安全性及免疫原性相似,进一步证明了体外生物学功能活性的相似性、糖基化水平及电荷异质性的微小差异不会导致临床效果上的差异。本研究证明了BAT1706作为一款贝伐珠单抗生物类似药与原研药体外生物学功能活性的高度相似性,并得到临床研究的证实。

作者贡献: 邓春平负责研究设计、数据分析及文章撰写;陈航、王英华、梁神娣负责研究实施、数据收集;曹迪、俞金泉、李胜峰负责文章审阅;刘翠华指导研究设计、文章审阅与修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Center for Drug Evaluation, China National Medical Product Administration (NMPA). Technical guideline for the development and evaluation of biosimilars (Interim) [EB/OL]. Beijing: NMPA, 2015 [2021-01-23]. <http://www.cde.org.cn/zdzy.do?method=largePage&id=2f41e8f3c64fedad>.
- [2] Liu BN, Bai Y, Luo JH. Biosimilarity study regarding product quality of candidate recombinant monoclonal antibodies as biosimilars [J]. Chin Pharm J (中国药学杂志), 2017, 52: 1194-1200.
- [3] World Health Organization. Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs) [R]. Geneva: WHO, 2009.
- [4] Lee JJ, Yang J, Lee C, et al. Demonstration of functional similarity of a biosimilar adalimumab SB5 to Humira® [J]. Biologicals, 2019, 58: 7-15.
- [5] Food and Drug Administration. Quality considerations in demonstrating biosimilarity of a therapeutic protein product to a reference product [EB/OL]. US: FDA, 2015 [2020-01-23]. <https://www.fda.gov/media/135612/download>.
- [6] Food and Drug Administration. Guidance for industry: development of therapeutic protein biosimilars: comparative analytical assessment and other quality-related considerations [EB/OL]. US:

- FDA, 2019 [2021-01-23]. <https://www.fda.gov/media/125484/download>.
- [7] European Medicines Agency (EMA). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1) [EB/OL]. UK: EMA, 2014 [2021-01-23]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-0.pdf.
- [8] Wang L, Xu GL, Gao K, et al. Progress in research and development of bioactivity determination of antibody-based therapeutics [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2015, 35: 101-108.
- [9] Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333: 328-335.
- [10] Melosky B, Reardon DA, Nixon AB, et al. Bevacizumab biosimilars: scientific justification for extrapolation of indications [J]. *Future Oncol*, 2018, 14: 2507-2520.
- [11] Zhou M, Song YY, Chen XY, et al. Considerations of clinical trial design and medical review assessment about bevacizumab biosimilar [J]. *Chin J Clin Pharmacol (中国临床药理学杂志)*, 2019, 35: 2188-2192.
- [12] Zhou LT, Hu YY, Xu LC, et al. Discussion on the quality similarity assessment of bevacizumab biosimilar [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2020, 40: 102-109.
- [13] Food and Drug Administration. Statistical approaches to evaluate analytical similarity guidance for industry [EB/OL]. US: FDA, 2017 [2021-01-23]. <https://www.federalregister.gov/documents/2017/09/22/2017-20263/statistical-approaches-to-evaluate-analytical-similarity-draft-guidance-for-industry-availability>.
- [14] European Medicines Agency (EMA). Draft reflection paper on statistical methodology for the comparative assessment of quality attributes in drug development [EB/OL]. UK: EMA, 2017 [2021-01-23]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/draft-reflection-paper-statistical-methodology-comparative-assessment-quality-attributes-drug_en.pdf.
- [15] Seo N, Polozova A, Zhang M, et al. Analytical and functional similarity of Amgen biosimilar ABP 215 to bevacizumab [J]. *MAbs*, 2018, 10: 678-691.
- [16] Yu C, Zhang F, Xu G, et al. Analytical similarity of a proposed biosimilar BVZ-BC to bevacizumab [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 3161-3170.
- [17] Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 391-400.
- [18] McFee RM, Rozell TG, Cupp AS. The balance of proangiogenic and antiangiogenic VEGFA isoforms regulate follicle development [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349: 637-647.
- [19] Zhang F, Xu GL, Yu CF, et al. Optimization and application of HUVEC proliferation inhibitory assay [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2015, 24: 2317-2323.
- [20] Wang L, Xu GL, Gao K, et al. Development of a robust reporter-based assay for the bioactivity determination of anti-VEGF therapeutic antibodies [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 125: 212-218.
- [21] Zhang F, Yu CF, Wang WB, et al. Optimization and improvement of conbercept specification [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2019, 39: 3-12.
- [22] Gingras D, Lamy S, Béliveau R. Tyrosine phosphorylation of the vascular endothelial-growth-factor receptor-2 (VEGFR-2) is modulated by pho proteins [J]. *Biochem J*, 2000, 348: 273-280.
- [23] Adamcic U, Karolina S, Peters C, et al. The effect of bevacizumab on human malignant melanoma cells with functional VEGF/VEGFR2 autocrine and intracrine signaling loops [J]. *Neoplasia*, 2012, 14: 612-623.
- [24] Huang CW, Dong HM, Zhou MC, et al. Bevacizumab reduced auto-phosphorylation of VEGFR2 to protect HDM-induced asthma mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478: 181-186.
- [25] Velayudhan J, Chen YF, Rohrbach A, et al. Demonstration of functional similarity of proposed biosimilar ABP 501 to adalimumab [J]. *BioDrugs*, 2016, 30: 321-338.
- [26] Xu GL, Zhang F, Yu CF. Application of ECLI in evaluating the binding activity of therapeutic monoclonal antibody to FcγRI [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2019, 39: 39-44.
- [27] Hargreaves CE, Matthew JR, Lee RM, et al. Fcγ receptors: genetic variation, function, and disease [J]. *Immunol Rev*, 2015, 268: 6-24.
- [28] Xie LQ, Zhang EH, Xu YP, et al. Demonstrating analytical similarity of trastuzumab biosimilar HLX02 to Herceptin® with a panel of sensitive and orthogonal methods including a novel FcγRIIIa affinity chromatography technology [J]. *BioDrugs*, 2020, 34: 363-379.
- [29] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 715-725.
- [30] Stylianou B, Jeffrey VR. Fcγ receptor pathways during active and passive immunization [J]. *Immunol Rev*, 2015, 268: 88-103.
- [31] Liu BN, Kan HJ, Bai Y, et al. The discussion on a proposed quality similarity assessment criteria of rituximab biosimilar [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 2118-2125.
- [32] Wu X, Wynne C, Xu C, et al. A global phase I clinical study comparing the safety and pharmacokinetics of proposed biosimilar BAT1706 and bevacizumab (Avastin®) in healthy male subjects [J]. *BioDrugs*, 2019, 33: 335-342.
- [33] Zhang H, Li QM, Zhu XX, et al. Tolerance, variability, and pharmacokinetics of bevacizumab biosimilars in Chinese healthy male subjects [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 82: 615-623.
- [34] Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, et al. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro* [J]. *Angiogenesis*, 2004, 7: 335-345.