

阿达木单抗生物学活性质控方法的建立和验证

贾哲^{1,2}, 郭莎², 王文波², 杨雅岚², 龙彩凤², 王兰², 刘万卉¹

(1 烟台大学药学院, 烟台 264005; 2 中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及标准化重点实验室, 国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629)

[摘要] **目的:** 建立基于肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 中和活性测定法的阿达木单抗生物学活性检测方法, 为实现阿达木单抗同类产品生物学活性的平行比对研究提供技术手段。**方法:** 以小鼠成纤维细胞 L929 为实验细胞, 对 TNF- α 和放线菌素 D (Act-D) 等关键试剂进行标准化, 并通过摸索细胞接种量、关键试剂浓度、阿达木单抗稀释梯度、孵育时间等方法进行优化, 并对优化后的方法进行实验室内与方法学验证与实验室间的联合验证, 证实该方法的性能表现及对阿达木单抗原研药和生物类似药的适用性。**结果:** 阿达木单抗在该方法中存在量效关系, 优化后的方法确定细胞密度为 2×10^4 个·孔⁻¹、TNF- α 和 Act-D 浓度分别为 1 和 400 ng·mL⁻¹、抗体起始浓度为 1 000 ng·mL⁻¹、稀释比为 1:2.5、铺板时间和孵育时间为 18 和 24 h, 方法学验证表明该方法专属性合理、精密度好、准确性高, 联合验证结果满意。**结论:** 该方法适用于目前已上市的 5 家阿达木单抗, 可以作为阿达木单抗生物学活性的平台化质控方法, 便于国家药品抽验工作开展及各产品间的平行比较, 同时也为国家标准品建立提供了可选的评价手段, 为未来《中华人民共和国药典》对阿达木单抗各论的收载提供了技术支撑。

[关键词] 阿达木单抗; 原研药; 生物类似药; 生物学活性; 优化; 验证

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)14-1423-09

Establishment and validation of a biological activity detection method for adalimumab

JIA Zhe^{1,2}, GUO Sha², WANG Wen-bo², YANG Ya-lan², LONG Cai-feng², WANG Lan², LIU Wan-hui¹

(1 School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264005, China; 2 Division of Monoclonal Antibody, National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Medical Products Administration Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determining the biological activity of adalimumab based on tumor necrosis factor- α (TNF- α) neutralization activity to provide technical means for parallel comparison of biological activities of similar biotherapeutic products of adalimumab. **Methods:** The mouse fibroblast cell line L929 was used as target cell and the key reagents such as TNF- α and actinomycin D (Act-D) were standardized, then the experiment parameters including cell inoculation density, concentrations of key reagents, dilution gradient of adalimumab and incubation time were optimized. Then, the optimized method was validated by the methodology verification in the

[基金项目] 2020 年国家药品标准提高课题: 单抗生物类似药质控方法的研究与优化 (2020S08)

[作者简介] 贾哲, 女, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析。E-mail: idxibei@163.com。共同第一作者: 郭莎, 女, 副研究员, 主要从事单克隆抗体质量控制研究。E-mail: guosha@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 王兰, 女, 研究员, 主要从事单克隆抗体质量控制研究。E-mail: wanglan@nifdc.org.cn。刘万卉, 男, 教授, 主要从事药物分析与药物代谢研究。E-mail: wanhuiliu@ytu.edu.cn。

laboratory and the joint validation between laboratories to evaluate the performance of the method and its applicability to adalimumab reference products and similar biotherapeutic products. **Results:** There was a dose-response relationship between adalimumab concentrations and signal values in this method. The optimized concentrations of TNF- α and Act-D were $1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $400 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively, the optimized seeded cell number was 2×10^4 cells per well, the optimized initial antibody concentration was $1\ 000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, the dilution ratio was 1:2.5, and the optimized seeding time and incubation time were 18 h and 24 h. Methodological validation showed that this method was specific, reproducible and accurate. The results of joint validation were satisfactory. **Conclusion:** This method is applicable to the five listed adalimumab products and can be used as a platform quality control method for the biological activity of adalimumab, which is convenient for the national sampling work and the parallel comparison between the products. It also provides an optional evaluation method for the establishment of national adalimumab standards and technical support for the inclusion of adalimumab monograph in Chinese Pharmacopoeia in the future.

[Key words] adalimumab; reference biotherapeutic product; similar biotherapeutic product; biological activity; optimization; validation

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是由巨噬细胞、肥大细胞和激活的 Th 细胞等分泌的一种炎性因子,与类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA)、强直性脊柱炎 (ankylosing spondylitis, AS)、银屑病 (psoriasis, PS) 等多种自身免疫性疾病有密切关系^[1-4]。针对 TNF- α 靶点的生物抑制剂包括阿达木单抗、依那西普、英夫利西单抗等,其中阿达木单抗指在中国仓鼠卵巢细胞中表达的重组全人源抗 TNF- α 的单克隆抗体,其通过与 TNF- α 特异性结合,阻止 TNF- α 与细胞表面的 TNF- α 受体 p75 和 p55 结合,从而阻断下游信号通路转导、抑制 TNF- α 的生物活性,起到治疗自身免疫性疾病的作用。

阿达木单抗首先由艾伯维公司 (AbbVie Ltd) 研发并于 2002 年在美国获准上市,商品名为“修美乐 (Humira)”,2010 年获准进入中国。阿达木单抗上市以来,市场潜力巨大,截至 2021 年阿达木单抗修美乐已连续 11 年位居全球药品销售额榜首,被称为“药王”,2021 年的年销售额也突破 200 亿美元。百亿的市场空间吸引了众多企业布局,截至 2022 年 5 月,除原研药 (reference biotherapeutic product, RBP) 修美乐外,分别有 10 款阿达木单抗生物类似药 (similar biotherapeutic product, SBP) 在美国和欧盟获批,国内也已有 5 款阿达木单抗生物类似药^[5-9] 获批上市,分别为来自百奥泰生物制药股份有限公司的“格乐立”、浙江海正药业股份有限公司的“安健宁”、信达生物制药 (苏州) 有限公司的“苏立信”、上海复宏汉霖生物制药有限公司的“汉达远”以及正大天晴药业集团股份有限公司的“泰博维”。此外,国内还有约 20 余家公司正在开展阿达木单抗生

物类似药的研发。

生物学活性测定是对药物的有效成分、含量以及效价的测定,是确保抗体类药物有效性的重要质控指标^[10]。虽然阿达木单抗生物学活性检测均基于 TNF- α 中和原理^[11-12],但各款药物所执行的质量标准及各自的检测方法均有差异,无法采用统一的标尺对生物学活性进行评价和比较。首先,各企业生物学检测方法中使用的细胞不同,原研药及部分生物类似药企业活性检测采用 L929 细胞,而有的生物类似药企业则采用 WEHI 164 细胞检测;其次,各企业方法中使用的关键试剂来源不同,如 TNF- α 和放线菌素 D (Act-D) 是生物学活性检测的关键试剂,不同品牌来源的试剂活性差异较大,也会引起剂量反应曲线和 EC_{50} 值的差异较大;再者,各企业的生物学活性质量标准也是依据各自检测方法和历史批次检测结果而设定,故质量标准也有所不同^[13-14]。因此,建立标准化的生物学活性测定方法并使用统一的标准物质进行生物学活性测定,有利于对不同厂家的阿达木单抗产品的活性进行差异评价。

本研究以建立阿达木单抗生物学活性平台质控方法为目标,首先统一检测细胞为 L929 细胞,采用阿达木单抗国际标准品 (international standards, IS) 为供试品,以提升方法的通用性;其次对关键试剂进行标准化,如使用 TNF- α 国际标准品、Act-D 候选国家标准品等,实现关键试剂的可溯源性,并对关键试剂浓度进行摸索和优化;再次,对阿达木单抗的剂量范围、细胞接种量、接种时间、细胞与试剂的共孵育时间等进行调整和优化,得到较好的反应曲线。随后,按照 ICH Q2 等相关要求,对优化后的方法进行

了方法学验证,并对阿达木单抗原研药和生物类似药的适用性进行了考察。最后,本研究还组织了国内相关质控实验室进行了联合验证,评估该方法对整个效期内的阿达木单抗是否具有适用性。结果表明,本研究所建立的阿达木单抗平台质控方法可用于各企业阿达木单抗的生物学活性质量控制,有利于实现阿达木单抗同类产品生物学活性的平行对比,可促进我国阿达木单抗生物学活性检测水平和质控能力的提高,为该品种国家活性标准品建立提供参考和评价手段,为《中华人民共和国药典》对阿达木单抗各论的收载和上市后监督抽验提供技术支持。

材料与方 法

1 试药和试剂

阿达木单抗样品为英国国家生物制品检定所(NIBSC)的国际标准品(货号:17-236)、中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)留样(包括阿达木单抗原研药和4种阿达木单抗生物类似药)以及各生产企业留样。

L929小鼠成纤维细胞(ATCC公司,目录号:CCL-1);TNF- α (NIBSC,货号:17-232);Act-D[美国药典标准品(USP),货号:1162400];胎牛血清(FBS,货号:10099141)、胰酶(trypsin,货号:25200056)、DMEM培养基(货号:11995065)、磷酸盐缓冲液(PBS,货号:10010049)均购自Gibco公司;CCK-8(日本同仁化学研究所,货号:CK-04)。

2 仪器

M5 SpectraMax多功能酶标仪和SoftMax分析软件购自Molecular Devices公司。

3 基于对TNF- α 的中和作用检测阿达木单抗生物学活性方法的建立

取生长状态良好的L929细胞,消化离心,调整密度为 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,按 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入96孔细胞培养板于 37°C ,5% CO_2 孵箱孵育18~24 h。在细胞完全培养基(10%胎牛血清的DMEM)加入 $4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TNF- α , $1600 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的Act-D作为实验培养基;细胞完全培养基加入 $800 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的Act-D为阳性对照培养液;阳性对照液中加入 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的TNF- α 作为阴性对照培养液。样品稀释至 $4000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,1:2.5稀释,10个浓度点,与实验培养基1:1混匀。将样品以 $100 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ 加入细胞培养板中,设3个复孔。阴性、阳性和空白对照孔分别加入

$100 \mu\text{L}$ 的阴性对照培养液、阳性对照培养液和细胞完全培养液,设2个复孔,于 37°C ,5% CO_2 孵箱孵育24 h。加入 $20 \mu\text{L} \cdot \text{孔}^{-1}$ CCK-8,孵育2.5~3 h。酶标仪450 nm为测定波长,620 nm为参比波长,应用Softmax软件进行的剂量-效应的四参数曲线拟合,四参数方程式: $Y = (A - D) / [1 + (X/C)^B] + D$ 。其中以抗体浓度的对数值为X轴,以OD值为Y轴,D值是最大浓度下的响应值,A是最小浓度下的响应值,C是拐点值(EC_{50}),B是斜率参数。 $\text{OD} = \text{OD}_{450} - \text{OD}_{620}$ 。

统计学参数描述为:①应用Softmax软件分析实验数据,C值为 EC_{50} ,相对效价/% = 参比品C值 \div 样品C值 $\times 100\%$ 。②相对效价回收率/% = 实测值/理论值 $\times 100\%$ 。③信噪比(S/N) = D/A 。采用SPSS 22.0版进行统计学分析,各组间采用单因素方差分析进行评价, $P \geq 0.05$ 为差异无显著性。

4 实验条件的优化

4.1 Act-D和TNF- α 浓度优化 在不加入阿达木单抗的情况下用L929细胞悬液($2 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$)铺板,TNF- α 以 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为起始终浓度,1:2稀释30个稀释度,Act-D选取20000,4000,400,1000 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,孵育24 h后加入CCK-8显色。拟合四参数曲线,根据凋亡曲线的信噪比选择合适的Act-D和TNF- α 浓度组合。

4.2 细胞接种量优化 用L929细胞悬液(终浓度 $2 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$, $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$, $5 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$, $2 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$, $1 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$, $5 \times 10^3 \cdot \text{孔}^{-1}$)铺板,分别孵育6,18,24,30 h后加入CCK-8显色并孵育3 h。拟合四参数曲线后比较曲线与信噪比选择合适的细胞接种量和孵育时间。

4.3 阿达木单抗的起始浓度点优化 将阿达木单抗起始终浓度设定为 $5000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,以1:2倍比稀释30个浓度点,其余参数同“3”项下设置,得到较宽剂量范围的反应曲线,根据剂量-效应曲线的上、下平台以及线性部分浓度点的分布,选取合适的起始浓度点进行量效范围的进一步优化。

4.4 抗体稀释梯度优化 以 $1000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 为阿达木单抗起始稀释浓度,分别稀释5条曲线,即以1:1.5,1:2,1:2.5,1:3和1:4进行梯度稀释,各曲线均设置10个稀释浓度点,其余参数同“3”项下设置。拟合以上5条四参数曲线,根据剂量-效应曲线是否包括上、下平台以及各浓度点在上、下平台以及线性段的分布是否合理来选取最优稀释方案。

4.5 铺板时间与孵育时间优化 将 L929 细胞铺板后,分别于 37 ℃,5% CO₂ 孵箱孵育 6,18,24,30 h,再按“3”项下方法进行后续实验,根据信噪比选择合适的铺细胞时间。将 Act-D, TNF-α 与梯度稀释的阿达木单抗全部加入 L929 细胞培养孔后,分别孵育 6,18,24,30 h,其余参数同“3”项下设置,根据信噪比与实验操作的便利性选择合适的孵育时间。

5 方法学验证

5.1 专属性实验 使用 3 种 TNF-α 靶点单抗,包括阿达木单抗、赛妥珠单抗和戈利木单抗以及 2 种非 TNF-α 靶点单抗,包括贝伐珠单抗(VEGF 靶点)和帕妥珠单抗(HER2 靶点),采用已优化的方法进行 TNF-α 中和活性实验。

5.2 精密性 制备阿达木单抗起始稀释浓度分别为 1 000 ng·mL⁻¹ 的 64% (640 ng·mL⁻¹),80% (800 ng·mL⁻¹),100% (1 000 ng·mL⁻¹),125% (1 250 ng·mL⁻¹) 和 156% (1 560 ng·mL⁻¹) 的 5 个样品,以 100% 浓度样品作为参比品,按照下列公式计算不同浓度水平样品的相对效价:相对效价/% = 参比品 EC₅₀/样品 EC₅₀ × 100%。每个样品重复检测 6 次,计算相对效价。

5.3 准确性和线性 制备阿达木单抗起始稀释浓度分别为 1 000 ng·mL⁻¹ 的 64% (640 ng·mL⁻¹),80% (800 ng·mL⁻¹),100% (1 000 ng·mL⁻¹),125% (1 250 ng·mL⁻¹) 和 156% (1 560 ng·mL⁻¹) 的 5 个样品,每个样品重复检测 6 次,按照下列公式计算回收率:回收率/% = 相对效价实测值/相对效价理论值 × 100%,通过回收率结果考察方法的准确性,通过将相对效价理论值与相对效价实测值进行线性回归考察方法的线性。

5.4 适用性 选择来自 5 家企业的阿达木单抗参比品,采用已验证的方法进行生物学活性检测,根据是否能拟合出剂量-效应曲线,初步确定该检测方法对于各企业阿达木单抗的适用性。随后,以中检院留存的 5 家阿达木单抗成品为样品,以各自参比品为参比,应用已验证的方法进行生物学活性检测,系统适用性设置为:曲线相关系数 $R^2 \geq 0.97$;参比品及供试品复孔间吸光值 $CV \leq 20\%$; $D_{\text{供试品}}/D_{\text{参比品}} \times 100\%$ 应在 80% ~ 125% 范围内; $B_{\text{供试品}}/B_{\text{参比品}} \times 100\%$ 应在 80% ~ 125% 范围内; $(D_{\text{供试品}} - A_{\text{供试品}})/(D_{\text{参比品}} - A_{\text{参比品}}) \times 100\%$ 应在 80% ~ 125% 范围内,通过系统适用性后再对相对效价进行计算,以进一步确认采用该检测方法进行质控的适用性。

5.5 联合验证 参与联合验证的单位使用涵盖整个效期的阿达木单抗为供试品,以各自的参比品为参比,采用已验证的方法和关键试剂对所选批次进行至少 6 次重复检测,系统适用性设置“5.4”项下描述,对通过系统适用性的结果进行均值、标准偏差(SD)和相对标准偏差(RSD)的统计。

结 果

1 方法优化

1.1 阿达木单抗国际标准品对 TNF-α 的中和抑制活性曲线 采用 SoftMax 分析软件分析实验数据,以阿达木单抗浓度为 X 轴,对应的吸光度值为 Y 轴,并用四参数方程回归模型拟合 TNF-α 中和活性的剂量效应曲线。结果如图 1 所示,剂量效应曲线呈现典型的 S 型,拟合度 $R^2 > 0.99$ 。阿达木单抗国际标准品对 TNF-α 的中和抑制活性剂量效应曲线的 EC₅₀ 值为 17.95 ng·mL⁻¹。

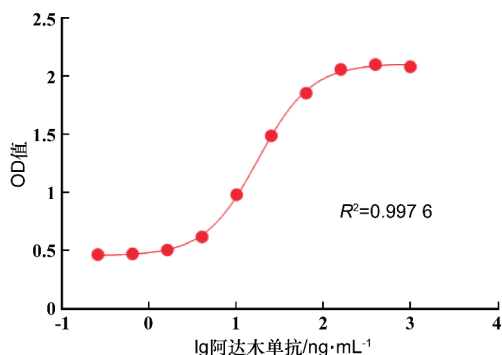


图 1 阿达木的 TNF-α 中和活性的剂量效应曲线

1.2 Act-D 和 TNF-α 浓度优化 L929 细胞在 Act-D 和 TNF-α 的协同作用下发生凋亡,这也是后续优化阿达木单抗 TNF-α 中和活性的基础,故在不加入阿达木单抗的前提下采用实验设计(design of experiment, DOE)方式对 Act-D 和 TNF-α 浓度进行组合优化,以达到最大的凋亡限度,结果见图 2 和图 3。在显色时间为 3 h 时,Act-D 浓度为 400 和 4 000 ng·mL⁻¹ 时信噪比接近,故选择用量较低的 400 ng·mL⁻¹。在该 Act-D 浓度下,选取凋亡曲线接近下平台时 TNF-α 的浓度点,即 TNF-α 终浓度为 1 ng·mL⁻¹,此时 Act-D 协同 TNF-α 导致 L929 细胞凋亡的作用接近最大,为后续 TNF-α 中和抑制活性检测提供的窗口也接近最大,故以此浓度组合进行后续的 TNF-α 中和抑制活性实验。

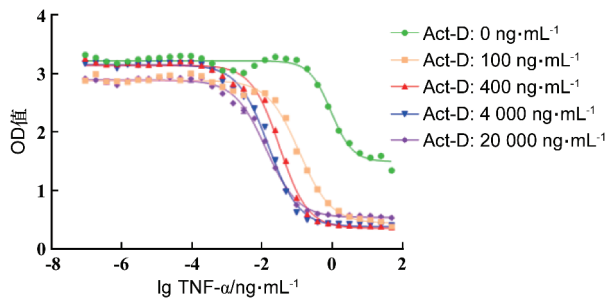


图2 Act-D 和 TNF-α 有效浓度的优化

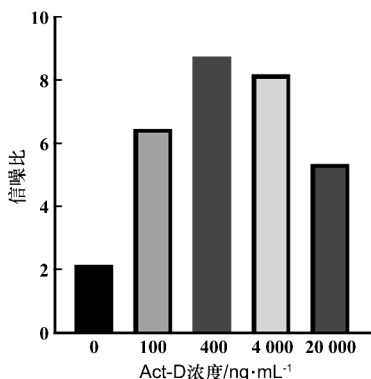


图3 Act-D 和 TNF-α 有效浓度优化信噪比结果

1.3 细胞接种量优化 分别以 $5 \times 10^3 \cdot \text{孔}^{-1}$ 、 $1 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 、 $2 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 、 $1 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 、 $2 \times 10^5 \cdot \text{孔}^{-1}$ 将 L929 细胞接种细胞培养板并进行后续实验,得到 6 条剂量-效应曲线,见图 4。根据各点在曲线上的分布是否均匀、曲线的信噪比及细胞形态确定细胞接种量。

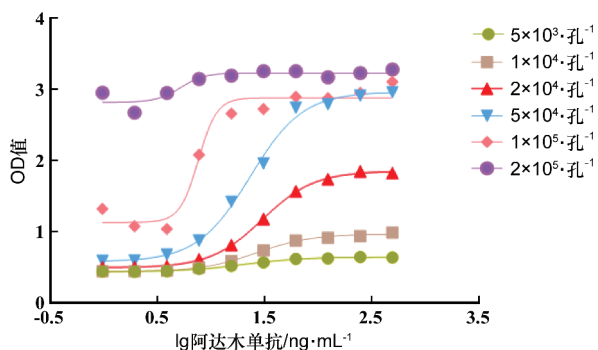


图4 6 种细胞接种量的量效曲线对比结果

结果如图 4 所示,细胞接种量为 $5 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 和 $2 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 时曲线平滑,结合图 5 的信噪比结果,看似 $5 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 信噪比最高最合理,但是实验结束时观察 $5 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 细胞形态呈现堆叠趋势。

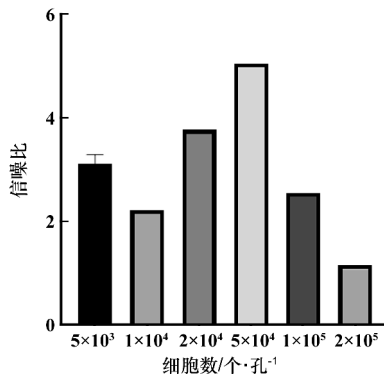


图5 6 种细胞接种量的信噪比

当细胞分布过于密集即密度过大时,OD 值反而会偏小,加上其他影响细胞的因素后的 OD 值并不能反映真实结果。因此本研究放弃有堆叠趋势的 $5 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 作为细胞密度,选择 $2 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$ 为适宜细胞接种量。

1.4 抗体起始稀释浓度优化 在阿达木单抗浓度为 $5\ 000 \sim 9.313 \times 10^{-6} \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的宽浓度范围内进行 1:2 稀释,可见剂量-反应曲线呈现包括上平台、线性段和下平台的完整的四参数曲线(见图 6),考虑到优化完成后最终曲线的上平台至少要有 3 个浓度点,因此首浓度点距离上平台转折点需要有一定浓度跨度,综合该宽浓度范围的曲线形态、线性段斜率和稀释梯度等,最终选取抗体起始稀释浓度为 $1\ 000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

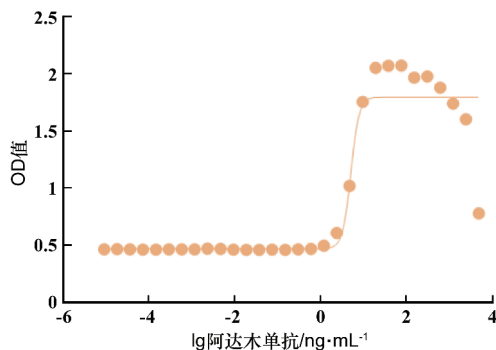


图6 阿达木单抗宽浓度范围的剂量-效应曲线

1.5 抗体稀释梯度优化 阿达木单抗起始稀释浓度固定为 $1\ 000 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,再分别以 1:1.5,1:2,1:2.5,1:3 和 1:4 进行梯度稀释共得到 5 条剂量-反应曲线,每条曲线上 10 个浓度点,结果如图 7 所示,1:1.5 稀释梯度所得曲线无完整四参数曲线的形态,1:2 稀释梯度所得曲线上平台过长、下平台过短,1:3 稀释

梯度所得曲线的浓度点分布不均匀,且线性段部分浓度点偏少,1:4稀释梯度所得曲线的线性段浓度点偏少,下平台的浓度点偏多;综合考虑曲线形态及各浓度点在剂量-反应曲线上的分布等,最终选取抗体稀释梯度为1:2.5,此时10个稀释浓度点均匀分布在曲线上,上下平台各3个浓度点,线性段4个浓度点,阿达木单抗浓度范围为1 000 ~ 0.262 ng·mL⁻¹。

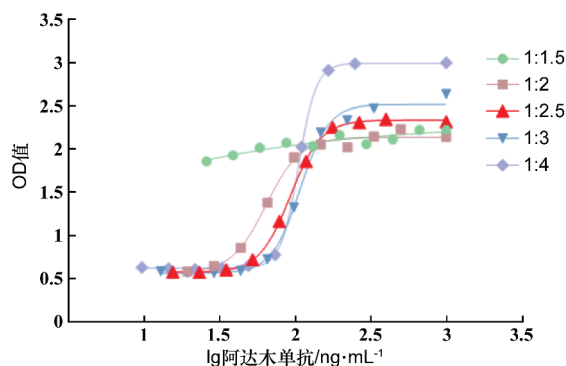


图7 阿达木单抗不同稀释梯度下的量效曲线

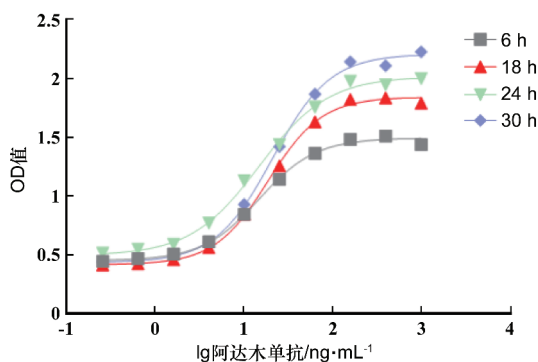


图8 不同铺板时间的量效曲线和信噪比结果

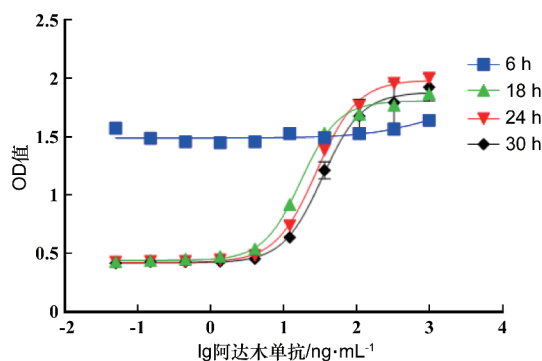


图9 不同孵育时间的量效曲线和信噪比结果

1.6 铺细胞时间与孵育时间优化 L929 细胞接种至细胞培养板后,需经历贴壁过程以达到较好的状态,再进行后续实验,因此需对铺细胞时间进行优化。将细胞接种量固定为 $2 \times 10^4 \cdot \text{孔}^{-1}$,铺细胞时间分别设定为6,18,24,30 h,所得曲线结果见图8。根据所得曲线的信噪比,铺细胞时间18 h 时信噪比已达到较高值满足实验需求,且18 与24 h 信噪比接近,故可根据细胞实际状态,选择铺细胞时间为18 ~ 24 h。将L929 细胞状态调整好,Act-D,TNF- α 与阿达木单抗3种实验组分会共同作用于L929 细胞,为使阿达木单抗的TNF- α 中和效应得到较好体现以便对其活性进行灵敏的评价,故对各组分与L929 细胞的共孵育时间进行了优化,孵育时间分别选择了6,18,24,30 h,从曲线结果和各曲线的信噪比(见图9)来看,18,24,30 h 孵育时间下得到较好剂量-反应曲线,18 h 基本达到信噪比平台,考虑后续还有3 h 的显色时间,故选择孵育时间为18 h。

1.7 优化参数汇总 根据前述对 Act-D 和 TNF- α 使用浓度优化、细胞接种量优化、阿达木单抗量效范

围优化以及对铺细胞时间和孵育时间优化的过程,可总结出该方法优化后的参数,见表1。后续验证

工作和联合验证均采用该条件操作。

表1 阿达木单抗活性测定实验条件优化结果

优化内容	优化结果
Act-D 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	1
TNF- α 浓度/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	400
细胞接种量/ $\times 10^4\cdot\text{孔}^{-1}$	2
单抗终浓度范围/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.262 ~ 1 000
铺细胞时间/h	18 ~ 24
孵育时间/h	18

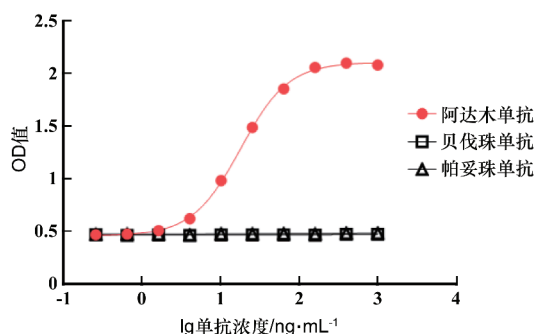
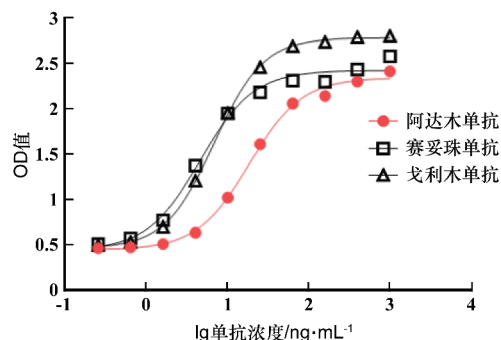


图10 阿达木单抗活性检测方法的特异性验证结果

2 方法学验证

2.1 特异性验证 特异性采用2种非TNF- α 靶点和2种TNF- α 靶点单抗进行验证,结果如图10所示,用2种非TNF- α 靶点单抗贝伐珠单抗和帕妥珠单抗进行实验无法得到剂量-反应曲线,说明该方法只针对TNF- α 靶点药物;而对于除阿达木单抗之外的2种TNF- α 靶点单抗,赛妥珠单抗和戈利木单抗,虽然也可产生剂量依赖性反应曲线,但曲线并不完整,仅包含上平台和线性段,并没有下平台,而仅阿达木单抗能产生完整的四参数曲线,说明该方法具有合理的特异性。



2.2 精密性验证 阿达木单抗64%,80%,100%,125%及156%这5个浓度的样品,每个样品重复检测6次,以100%浓度样品作为参比品,计算各组样品的相对效价。阿达木单抗5个不同浓度水平的相对效价分别为 $(61.17 \pm 5.65)\%$,

$(83.01 \pm 3.45)\%$, $(107.07 \pm 0.98)\%$, $(120.04 \pm 2.31)\%$ 及 $(156.82 \pm 5.75)\%$,RSD分别为5.65%,1.75%,5.58%,6.93%和3.69%,见表2。可见各效价水平的RSD均 $<10\%$,表明该方法具有较好的精密性。

表2 阿达木单抗不同稀释度样品的相对效价和回收率结果

$n = 3, \%$

样品	相对效价			回收率	
	$\bar{x} \pm s$	RSD	95% 置信区间	$\bar{x} \pm s$	RSD
64%	61.17 ± 5.65	5.65	54.52 ~ 67.74	99.58 ± 3.61	5.65
80%	83.01 ± 3.45	1.75	79.00 ~ 87.02	103.76 ± 4.31	1.75
100%	107.07 ± 5.98	5.58	100.04 ~ 114.01	107.07 ± 5.98	5.58
125%	120.04 ± 2.31	6.93	117.37 ~ 122.73	96.03 ± 1.85	6.93
156%	156.82 ± 5.75	3.67	148.73 ~ 164.91	100.53 ± 3.69	3.67

2.3 准确度和线性 阿达木单抗5个回收率样品的相对效价回收率分别为 $(99.58 \pm 9.58)\%$, $(103.76 \pm 0.37)\%$, $(107.07 \pm 0.70)\%$, $(96.03 \pm 6.03)\%$ 及 $(100.53 \pm 3.69)\%$,95%置信区间分别为54.52% ~ 67.74%,79.00% ~ 87.02%,100.04% ~ 114.01%,

$117.37\% \sim 122.73\%$, $148.73\% \sim 164.91\%$,见表2。分别以5组样品相对效价的理论值与实测值进行线性回归,得到阿达木单抗回归直线的 $R^2 = 0.9831$,线性拟合较好,见图11。

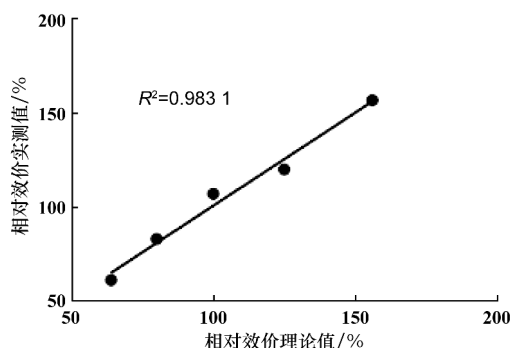


图 11 相对效价的理论值与实测值之间的线性相关曲线

2.4 适用性 以国际标准品为参比,5家已上市阿达木单抗的参比品为供试品,采用已验证的方法进行生物学活性检测,结果如图 12 所示,各企业阿达木单抗均与阿达木国际标准品一致,能形成完整的剂量-反应曲线,说明该方法可对不同企业生产的阿达木单抗进行生物学活性检测,初步判定该方法具有较好的适用性。随后以中检院留存的 5 家阿达木

单抗成品为样品,以各自参比品为参比,应用已验证的方法进行生物学活性检测,每个样品检测 2 次,结果见表 3,结果均符合拟定的系统适用性要求。对通过系统适用性的结果计算相对效价,所得生物学活性结果为 82.46% ~ 112.43%,均在 80% ~ 125% 之间,进一步确认了采用该方法进行阿达木单抗生物学活性质控的适用性。

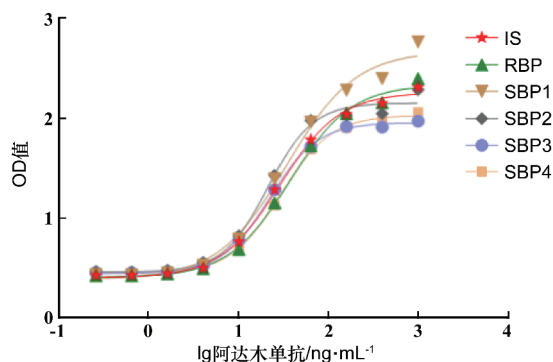


图 12 4 家企业阿达木单抗参比品测定的量效曲线

表 3 4 家企业阿达木单抗的生物学活性检测结果 % , n = 2

样品	R ²	RSD _{max}	B _{供试品} /B _{参比品} × 100%	D _{供试品} /D _{参比品} × 100%	(D - A) _{供试品} / (D - A) _{参比品} × 100%	相对活性
RBP	0.994	8.62	84.93	96.66	97.10	112.43
	0.999	3.61	99.54	95.00	93.89	112.24
SBP1	0.999	2.93	104.02	92.65	89.71	105.14
	1.000	2.71	115.58	89.71	86.48	91.59
SBP2	0.998	8.62	91.13	100.00	100.20	98.75
	0.999	6.31	98.52	98.49	98.41	96.88
SBP3	0.995	4.60	91.02	91.84	89.37	110.06
	0.999	4.91	82.48	91.84	90.88	97.48
SBP4	0.998	6.8	107.64	91.47	88.57	93.84
	0.996	3.4	117.20	92.89	89.63	82.46

2.5 联合验证 为了在更大范围内评估该方法对阿达木单抗产品的适用性,同时评估方法系统适用性设置是否合理,并收集生物学活性实验数据测定结果的范围,我们邀请了另外 4 家质控实验室开展了联合验证。联合验证要求对各质控实验室的阿达木单抗留样批次进行检测,批次分布尽量涵盖整个效期,每个批次进行 6 次重复检测,以各自参比品为参比进行结果计算,并报告通过系统适用性的结果的均值,结果见表 4。

表 4 4 家实验室阿达木单抗生物学活性测定法联合验证结果 %

实验室	优化方法			企业方法	
	系统适用性 通过率	结果 平均值	RSD	结果 平均值	RSD
1 (n = 12)	100	98.55	5.99	102.09	4.82
2 (n = 12)	100	98.96	5.78	91.54	3.50
3 (n = 2)	100	104.96	4.32	96.83	2.12
4 (n = 7)	100	101.20	5.96	99.75	5.92

可见4家质控实验室的检测结果全部通过系统适用性要求,各批次的生物学活性范围为98.55%~102.00%,均在80%~125%之间,所有检测结果的RSD在4.32%~5.99%之间,均<10%,且与相应企业方法相比,无论是检测结果还是RSD值,都不具有显著性差异(P 值均>0.05)。说明优化验证后的基于TNF- α 中和活性的阿达木单抗生物学活性检测方法可以作为平台质控方法用于阿达木单抗原研药及生物类似药生物学活性的质量控制。

讨 论

通过对比各企业阿达木单抗生物学活性的检测方法,发现各企业方法间有诸多差异,如所使用的细胞不同、所使用的关键试剂来源不同、使用浓度不同、孵育时间不同等,这些差异会导致生物学检测结果的差异,如进一步实验表明,不同来源的关键试剂TNF- α ,即使在相同的实验条件下,所检测的 EC_{50} 值也相差将近4倍之多。因此,本研究以L929细胞为实验细胞,建立了基于TNF- α 中和活性的阿达木单抗生物学活性平台质控方法。该方法采用阿达木单抗国际标准品为模式单抗、TNF- α 国际标准品和Act-D候选国家标准品为标准试剂,对方法进行优化和验证,保证方法的通用性和标准化。经过参数优化和方法验证,证明该方法具有良好的准确性、精密度和合理的特异性,可作为阿达木单抗品种生物学活性检测的通用方法,避免因各企业检测方法不同、拟定标准不同而无法直接进行横向比较的现状,使生物学活性检测结果更具有可比性。该方法填补了各企业阿达木单抗进行生物学活性平行对比的技术空白,为阿达木单抗及其生物类似药质量标准的提高提供了统一的技术手段。

值得注意的是,组织各企业对效期内阿达木单抗留样进行联合验证的结果显示,该方法对于各企业效期内的阿达木单抗具有适用性,检测结果均在80%~125%之间。同时,处于效期内不同阶段样品间的生物学活性结果间不存在显著差异,即随着效期临近,没有显示生物学活性下降的趋势,说明效期内产品具有较好的活性稳定性。将本方法的检测结果和RSD与企业各自方法的检测结果和RSD比较显示,结果间均不存在显著性差异,说明本方法精密度好,对生物学活性具有精确的指示作用。

单抗的生物学活性一般是指供试品相对于标准品效价,而目前用于阿达木单抗生物学活性测定的标准品均由企业自制,对于企业内部产品生物学活

性的比较具有较大价值,但对于不同企业间生物学活性检测结果的横向比较意义较小,即不同企业的阿达木单抗若要进行生物学活性评价时应使用同一把标尺,这一标尺可以消除由于企业各自标准品本身的差异而导致的活性差异,结合标准化的检测方法有助于同类产品生物学活性的平行对比。因此,建立国家标准物质作为“标尺”是非常必要的,我们也在进行阿达木单抗国家标准品的筛选和制备工作。综上所述,本研究通过统一关键试剂TNF- α 等的来源和检测方法参数优化,对阿达木单抗生物学活性检测方法进行了标准化,不仅实现了方法的可溯源性,也为国家标准品建立提供了可选的评价手段,为市场监管提供了统一标尺和有力工具,为未来《中华人民共和国药典》收载阿达木单抗各论提供了技术支撑。

[参 考 文 献]

- [1] MA K, ZHANG HX, BALOCH Z. Pathogenetic and therapeutic applications of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in major depressive disorder: a systematic review[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 733.
- [2] MITOMA H, HORIUCHI T, TSUKAMOTO H, et al. Molecular mechanisms of action of anti-TNF- α agents-Comparison among therapeutic TNF- α antagonists[J]. *Cytokine*, 2018, 101: 56-63.
- [3] LI P, ZHENG Y, CHEN X. Drugs for autoimmune inflammatory diseases: from small molecule compounds to anti-TNF biologics[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 460.
- [4] LIU W, WU YH, ZHANG L, et al. Efficacy and safety of TNF- α inhibitors for active ankylosing spondylitis patients: multiple treatment comparisons in a network meta-analysis[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 32768.
- [5] LEE JJ, YANG JM, LEE C, et al. Demonstration of functional similarity of a biosimilar adalimumab SB5 to Humira? [J]. *Biologicals*, 2019, 58: 7-15.
- [6] LI EC, ABBAS R, JACOBS IA, et al. Considerations in the early development of biosimilar products[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(Suppl 2): S1-S9.
- [7] MARKUS R, LIU J, RAMCHANDANI M, et al. Developing the totality of evidence for biosimilars: regulatory considerations and building confidence for the healthcare community[J]. *BioDrugs*, 2017, 31(3): 175-187.
- [8] SHIN D, LEE Y, KIM H, et al. A randomized phase I comparative pharmacokinetic study comparing SB5 with reference adalimumab in healthy volunteers[J]. *J Clin Pharm Ther*, 2017, 42(6): 672-678.
- [9] WEINBLATT ME, BARANAUSKAITE A, NIEBRZYDOWSKI J, et al. Phase III randomized study of SB5, an adalimumab biosimilar, versus reference adalimumab in patients with moderate-to-severe rheumatoid arthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2018, 70(1): 40-48.
- [10] 陈莹莹, 于秀梅, 张驰, 等. IL-17A单克隆抗体生物学活性检测方法的建立[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(6): 808-811.
- [11] LIM KJ, LEE SJ, KIM S, et al. Comparable immune function inhibition by the infliximab biosimilar CT-P13: implications for treatment of inflammatory bowel disease[J]. *J Crohns Colitis*, 2017, 11(5): 593-602.
- [12] BUURMAN DJ, BLOKZIJL T, FESTEN EM, et al. Quantitative comparison of the neutralizing capacity, immunogenicity and cross-reactivity of anti-TNF- α biologicals and an Infliximab-biosimilar[J]. *PLoS One*, 2018, 13(12): e0208922.
- [13] 张峰, 郭玮, 刘春雨, 等. 5种TNF α 单抗及其类似物的TNF α 杀伤抑制活性的比较[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(5): 733-737.
- [14] ZHANG EH, XIE LQ, QIN PL, et al. Quality by design-based assessment for analytical similarity of adalimumab biosimilar HLX03 to humira? [J]. *AAPS J*, 2020, 22(3): 69.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-01-03

