

引用:庄煌圳,郭清城,周朝欣,等.地舒单抗生物类似药 CMAB807 理化特性与功能活性相似性评估[J].聊城大学学报(自然科学版),2026,39(4):591-602.

Citation:ZHUANG Huangzhen, GUO Qingcheng, ZHOU Chaoxin, WANG Chenguang, FAN Wenqiang, ZHU Weifan, REN Yule, PAN Zhiyuan, CHEN Yi, GUO Menghui, LIU Tao, JI Lusha, QIAN Weizhu, HOU Sheng, LI Jun, SUN Ziqiao, WANG Xuekun, ZHANG Dapeng, GUO Huaizu, XU Jin. Analytical and functional similarity assessment of denosumab bio-similar CMAB807[J]. Journal of Liaocheng University(Natural Science Edition), 2026,39(4):591-602.

文章编号 1672-6634(2026)04-0591-12

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025040016

地舒单抗生物类似药 CMAB807 理化特性与 功能活性相似性评估

庄煌圳^{1,2},郭清城^{1,2,3,4},周朝欣^{1,2,3,4},王晨光^{1,2,3,4},范文强^{1,2,3,4},朱漳帆^{1,2},
任雨乐^{1,2},潘志远^{1,2},陈一^{1,2},郭梦慧^{1,2},刘涛^{1,2,3,5},冀芦沙^{1,2,3},钱卫珠^{1,2,3},
侯盛^{1,2,3},李军^{1,2,3},孙梓乔^{1,2,3},王学堃^{1,2,3,6},张大鹏^{1,2,3},郭怀祖^{1,2,3,6},徐进^{1,2,3}

(1. 聊城大学 药学与食品工程学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,山东 聊城 252059;2. 国家药品监督管理局
治疗类单抗质量控制重点实验室,上海 201203;3. 温州医科大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,
浙江 温州 325035;4. 泰州迈博太科药业有限公司,江苏 泰州 225316;5. 复旦大学 华山医院 肿瘤科,上海 200040;
6. 张江生物技术有限公司 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,上海 201203)

摘要 生物类似药理化与功能相似性评估是确保其与参照药在质量、安全性和有效性上高度一致的关键环节。研究基于质量属性风险分级原则,采用多维正交分析技术,系统评估了地舒单抗生物类似药 CMAB807 与参照药(Prolia®/Xgeva®)的理化特性与功能活性。研究结果显示,CMAB807 与参照药在一级结构、高级结构、纯度与杂质及功能活性等属性上高度相似,仅少数质量属性(如重链 C 末端赖氨酸剪切比例)存在微小差异。此外,CMAB807 的 Fc 受体结合特性与参照药相似,且未检测到抗体依赖性细胞毒性(ADCC)或补体依赖性细胞毒性(CDC)效应,符合 IgG2 亚型特性。本研究通过属性分级与全面质量表征,为 CMAB807 的质量相似性及临床相似评估奠定了坚实的基础。

关键词 生物类似药;地舒单抗;理化分析;功能评估

中图分类号 R927.1

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



本文电子版文后有增强出版内容。

Analytical and functional similarity assessment of denosumab biosimilar CMAB807

ZHUANG Huangzhen^{1,2}, GUO Qingcheng^{1,2,3,4}, ZHOU Chaoxin^{1,2,3,4},

收稿日期:2025-04-27

基金项目:国家自然科学基金项目(22304067);上海东方英才项目(CYQN2023031);山东省自然科学基金(ZR2023QB257, ZR2023QB196);山东省高等学校“青创团队计划”团队(2022KJ111);光岳青年学者创新团队项目(LCUGYTD 2022-04)资助

通信作者:郭怀祖,男,汉族,博士,教授,博士生导师,上海产业菁英高层次人才,研究方向:抗体药物与靶向治疗,E-mail:guo-huaizu@163.com;张大鹏,男,汉族,博士,教授,研究方向:抗体药物与靶向治疗,E-mail:bigbirdzcn@163.com;徐进,男,汉族,博士,副教授,研究方向:抗体药物与质量控制,E-mail:xujinn_1985@163.com.

WANG Chenguang^{1,2,3,4}, FAN Wenqiang^{1,2,3,4}, ZHU Weifan^{1,2},
REN Yule^{1,2}, PAN Zhiyuan^{1,2}, CHEN Yi^{1,2}, GUO Menghui^{1,2},
LIU Tao^{1,2,3,5}, JI Lusha^{1,2,3}, QIAN Weizhu^{1,2,3}, HOU Sheng^{1,2,3},
LI Jun^{1,2,3}, SUN Ziqiao^{1,2,3}, WANG Xuekun^{1,2,3,6},
ZHANG Dapeng^{1,2,3}, GUO Huaizu^{1,2,3,6}, XU Jin^{1,2,3}

(1. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. Taizhou Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 5. Department of Oncology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 6. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract Analytical and functional similarity assessments are pivotal to ensuring biosimilars exhibit high consistency with reference products (RPs) in quality, safety, and efficacy. Based on a risk-tiered classification of critical quality attributes (CQAs), this study systematically evaluated the physicochemical and functional similarity between the Denosumab biosimilar CMAB807 and RPs (Prolia[®]/Xgeva[®]) using orthogonal analytical techniques. Results demonstrated that CMAB807 and RPs share highly comparable primary structures, higher-order structures, purity profiles, and functional activities. Minor differences were observed in specific post-translational modifications, such as C-terminal lysine truncation of the heavy chain. Additionally, CMAB807 exhibited Fc receptor binding profiles consistent with RPs and showed no detectable antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement-dependent cytotoxicity (CDC), aligning with the IgG2 subclass characteristics. Through risk-tiered evaluation and comprehensive quality characterization, this study establishes a robust foundation for CMAB807's analytical similarity and supports its clinical comparability investigations.

Keywords biosimilar; denosumab, physicochemical analysis; functional evaluation

0 引言

治疗性单克隆抗体(mAbs)凭借其高特异性、可控的功能活性及长半衰期等优势,已成为生物制药领域增长最快的药物类别之一^[1]。然而,其高昂的研发与生产成本限制了全球患者的药物可及性^[2]。生物类似药(Biosimilar)作为与已获准注册参照药(Reference product, RP)在质量、安全性和有效性上高度相似的替代疗法,能够通过降低医疗成本大幅提升药物可及性,尤其为中国等发展中国家患者提供关键治疗机会^[3]。

国家药品监督管理局(NMPA)生物类似药相关指导原则明确要求,生物类似药需采用与参照药一致的检测方法及多种正交技术,通过全面可比性研究,包括分子结构的生化与物理特性分析、生物功能评价等,验证其与参照药的相似性^[4]。近年来,监管趋势逐步减少甚至去除非临床及临床可比性要求,这进一步凸显了质量可比性研究的重要性。NMPA 这些原则与美国 FDA、欧盟 EMA 的监管框架一致,均强调基于"整体证据"评估生物相似性。然而,由于生物药分子结构复杂、生产工艺依赖性强且存在批次间异质性,其分析可比性评估面临诸多挑战^[7]。以抗体类药物为例表达系统、纯化工艺及翻译后修饰(如糖基化、氧化)等多因素影响均会影响其质量属性,可能导致关键质量属性(Critical quality attributes, CQAs)出现差异。因此,建立科学的分层评估策略,结合风险分级与多维度正交分析技术,成为生物类似药研发的核心环节^[5]。

地舒单抗(Denosumab)是一种靶向核因子 κ B 受体活化因子配体(RANKL)的全人源 IgG2 单抗,通过抑制破骨细胞活性,广泛应用于骨质疏松症及实体瘤骨转移的治疗。随着其专利到期,开发高质量生物类似

药对降低医疗负担至关重要。然而,IgG2 亚型的独特结构(如二硫键模式、低 Fc 效应功能)及复杂的翻译后修饰,进一步增加了其相似性评估的难度^[9-10]。

本研究以地舒单抗生物类似药 CMAB807 为对象,遵循 NMPA 对参照药本地化的要求,选用中国获批的 Prolia[®]/Xgeva[®]为对照,依据国际通行的风险分级评估框架开展分析评估。首先,基于质量属性的临床风险影响及检测方法特性,将质量属性分为三级:针对核心作用机制相关属性(如 RANKL 结合活性)采用等效性检验(Tier 1);对中等风险属性(如电荷变异体)应用质量范围法(Tier 2);低风险或定性属性(如高级结构)则通过直观比较进行评估(Tier 3)^[7,11]。其次,整合高效液相色谱(HPLC)、毛细管电泳(CE)、质谱(MS)及表面等离子共振(SPR)等多维正交技术,系统地表征一级结构、高级结构、纯度及功能活性^[12-13]。此外,结合批次间变异分析,明确 CMAB807 与参照药的差异范围及临床相关性。本研究通过系统评估 CMAB807 的质量相似性,证实了其在理化特征与功能活性表现上的高度相似。研究结果不仅为 CMAB807 的上市申报提供关键数据支持,也为中国生物类似药评价体系的标准化提供了实践案例,有助于推动建立符合国际监管要求的相似性评估范式。

1 材料与方法

1.1 材料

参照药与候选药:中国市场来源的地舒单抗(Prolia[®]和 Xgeva[®])购自安进公司(Amgen Inc.),共 16 批次。候选药物 CMAB807 由泰州迈博药业有限公司提供,共 15 批次。所有样品按制造商说明分装后于-80℃保存,避免反复冻融。

试剂与仪器:化学试剂购自 Merck 公司,PNGaseF 糖苷酶(上海迈泰君奥生物技术有限公司)、胰蛋白酶(上海迈泰君奥生物技术有限公司)、羧肽酶 B(CpB,生工生物工程(上海)股份有限公司)、C1q(Abcam 公司)、RANKL(上海迈泰君奥生物技术有限公司)、CHO-K1/hmRANKL(上海张江生物技术有限公司)、Jurkat NFAT-Re/CD16a(158V)-FcγR/pcDNA3.1(hygro)(上海张江生物技术有限公司)。实验主要仪器包括沃特世 ACQUITY UPLC 系统(含 C4 BEH、C18 色谱柱)、Xevo G2-S Q-TOF 质谱仪(Waters)、Biacore T200 表面等离子共振仪(Cytiva)、MicroCal VP-Capillary 差示扫描量热仪(Malvern)及 FACSCanto[™] II 流式细胞仪(BD)。

1.2 分析方法

1.2.1 分子量与一级结构分析。完整与还原分子量测定:使用沃特世 ACQUITY 超高效液相色谱(C4 BEH 色谱柱,1.7 μm 30 nm,2.1 mm×50 mm)与沃特世 Xevo G2-S Q-TOF 质谱联用仪,测定完整、还原水平的 CMAB807 和参照药的分子量。去糖分子量采用 PNGaseF 糖苷酶预处理。2 个样进样,采集质荷比(m/z)在 500~4 000 Da 范围内的数据。使用 UNIFI 软件处理 LC-MS 数据。

肽图谱分析和翻译后修饰鉴定:还原样品经胰蛋白酶酶切后,通过 UPLC BEH C18 柱(1.7 μm, 2.1 mm×150 mm)分离肽段,质谱(LC-MS/MS)覆盖 100%氨基酸序列。非还原肽图谱结合 Trypsin/Lys C 双酶切分析二硫键模式,采用 UNIFY 软件解析。

游离巯基分析:采用 Ellman 法测定样品中的游离巯基(SH)含量。将标准品和样品与 Ellman 试剂(5,5'-二硫代羧苄-(2-硝基苯甲酸))在反应缓冲液中混合。然后使用酶标仪(412 nm,BioTek EPOCH)检测荧光信号。通过与由已知浓度标准品(如:半胱氨酸)的标准曲线进行比较,估算游离巯基的含量^[14]。

1.2.2 高级结构分析。热稳定性分析:差示扫描量热仪(DSC)以 80℃/h 的扫描速率从 10℃扫描至 100℃,记录结构域变性温度(T_m),进行数据分析^[15]。

圆二色谱(CD):远紫外(190~260 nm)与近紫外(250~340 nm)光谱分别表征二级与三级结构,光程 0.2 nm/0.1 nm,扫描速度 100 nm/min。

分子内荧光光谱:激发波长 280 nm,发射范围 310~410 nm,评估构象均一性。

1.2.3 纯度与异质性分析。分子大小变体测定:体积排阻色谱(SEC-UPLC, ACQUITY Protein BEH SEC 12.5 nm 柱)检测聚集体与片段,还原/非还原毛细管电泳(CE-SDS)定量低分子量杂质与非糖基化重链

(NGHC)。

电荷变异体检测:毛细管等电聚焦(cIEF)测定等电点(pI);阳离子交换色谱(CEX)结合 CpB 处理后分析酸性/碱性变异体分布。

游离寡糖分析:PNGase F 酶切释放 N-糖后,2-氨基苯甲酰胺(2AB)标记,经 HILIC BEH 聚糖酰胺柱(1.7 μm , 1.7 mm $\times$ 150 mm)分离,荧光检测器定量 G0F、G1F、G2F 等糖型^[16]。

唾液酸检测:醋酸水解,DMB 荧光标记后,RP-LC(Phenomenex Jupiter C18 柱)分离 N-乙酰神经氨酸(NANA)与 N-羟乙酰神经氨酸(NGNA)。

1.2.4 功能活性评估。RANKL 结合试验:ELISA:RANKL 包被于酶标板,地舒单抗与其结合,辣根过氧化物酶(HRP)标记的 Goat anti-human Kappa 可以与其结合,然后加入 HRP 底物 TMB 后呈显色反应,曲线呈“S”型,显色程度与加入地舒单抗的量相关,酶标仪读数后通过四参数曲线来分析其结合活性^[17]。

细胞膜表面 RANKL 结合活性的检测:构建高表达 RANKL 的 CHO-K1/hmRANKL 细胞。地舒单抗可以特异性结合细胞膜表面 RANKL,加入荧光标记二抗后,进行流式细胞仪分析,相对荧光强度与加入的抗体的量相关。抗体浓度越高,相对荧光强度越强,通过流式细胞仪检测不同抗体浓度下的信号强度,最终可以依据四参数曲线来分析其细胞膜结合活性。

RANKL 亲和力检测:亲和力检测主要通过基于表面等离子共振(SPR)技术的 Biacore T200(Cytiva)展开^[18]。采用多循环动力学模式,在检测芯片表面偶联抗原 RANKL,再进样浓度依次升高(0.25~8 $\mu\text{g/mL}$)的抗体样品,结合时间 120 s,解离 1200 s,流速 30 $\mu\text{L/min}$,最后通过再生液(3 mol/L MgCl_2 +10 mmol/L Gly pH 1.4)对样品之间进行再生处理,再生流速 30 $\mu\text{L/min}$,再生时间 25 s。最后通过分析软件计算抗体样品与 RANKL 之间的结合亲和力。

生物活性检测:对 RAW264.7 细胞稳定转染含 NF- κB 及荧光素酶报告基因的表达载体,潮霉素筛选稳定细胞株。该细胞表面表达 RANK,加入其配体 RANKL 后可启动 NF- κB 信号通路,促进报告基因表达,加入荧光素酶底物后用发光仪进行效应检测,发光强度与 RANKL 的浓度呈正相关。地舒单抗可抑制 RANKL 的作用,加入不同浓度地舒单抗与亚饱和浓度的 RANKL 作用 5~6 h,加入荧光素酶底物后用化学发光检测仪读数,曲线呈反“S”。生物活性可以通过计算相对于参比品的效应而获得。

Fc 效应功能:Fc 受体亲和力检测:使用 Biacore 通过 SPR 法测定样品与人类 Fc γR 和 FcRn 受体的亲和力^[19]。将标记 Biotin 标签的重组人 FcRn 蛋白固定在 SA 传感器芯片上,再采用多循环动力学策略,对浓度范围 0.312 5~5 $\mu\text{g/mL}$ 的样品依次上样,每个循环抗体样品结合时间 120 s,解离时间 120 s,流速 30 $\mu\text{L/min}$,再生 10 s(再生液 PBS pH 7.4)。而对于 Fc γRs ,先在芯片表面氨基偶联 Anti-His antibody,再用其捕获带 His 标签的 Fc γRs ,最后依次进样浓度梯度稀释的抗体,再生采用同一条件,10 mmol/L Gly pH 1.5,流速 30 $\mu\text{L/min}$,时间 5 s,最后用稳态法分析受体亲和力^[20]。其中 Fc γRIIa 亲和力检测中,抗体的浓度范围为 93.75~1 500 $\mu\text{g/mL}$,结合时间 60 s,解离时间 10 s,流速 30 $\mu\text{L/min}$ 。Fc γRIIb 亲和力检测中,抗体的浓度范围为 312.5~5 000 $\mu\text{g/mL}$,结合时间 30 s,解离时间 5 s,流速 30 $\mu\text{L/min}$ 。Fc γRIIIa 亲和力检测中,抗体的浓度范围为 225~3 600 $\mu\text{g/mL}$,结合时间 60 s,解离时间 60 s,流速 30 $\mu\text{L/min}$ 。

C1q 结合检测:通过酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 CMAB807 及参照药与人 C1q 的结合活性^[21]。将不同浓度的单抗加入到 96 孔板中。用 5%BSA 封闭后,加入 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 C1q,并在室温下孵育 2 h。然后加入抗 C1q-HRP 抗体结合物(1:300,Abcam 公司)和 TMB 以完成反应。通过 EC50 确定单抗与 C1q 的结合活性。

抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖的细胞毒性作用(CDC)活性的比对:采用报告基因检测系统进行 ADCC 效应检测,稳定表达 RANKL 的 CHO-K1 细胞(CHO-K1/hmRANKL)作为靶细胞,CMAB807/参照药与细胞膜表面 RANKL 结合;Jurkat/NFAT-Re/Fc γRIIIa (Jurkat NFAT-Re/CD16a(158V)-Fc $\gamma\text{R}/\text{pcDNA}3.1(\text{hygro})$)作为效应细胞,进行报告基因法检测,通过平行逻辑分析(4 参数拟合),比较样品与参考样品的 EC50,确定 ADCC 的相对效价。

CDC 效应检测,将 CHO-K1/hmRANKL 细胞与浓度倍比稀释的单克隆抗体在作为补体来源的正常人

血清存在下共同孵育。CMAB807 及参照药可与靶细胞表面 RANKL 结合,介导血清中补体的作用裂解靶细胞,通过检测培养上清中 LDH 的活性可反映 CDC 效应功能,通过平行逻辑分析(4 参数拟合),比较样品与参考样品的 EC₅₀,确定 CDC 的相对效价^[22]。

1.3 统计学与相似性评估

FDA 建议将每个质量属性划分为三个层级,各层级对应分析数据的特定(统计)评估方法。层级分配基于综合考量潜在临床影响和不确定性的风险评估^[23]。

质量属性分级基于临床风险与检测变异性,将质量属性分为三级(Tier 1~3):

Tier 1(等效性检验):采用置信区间法进行统计推断,计算生物类似药组与参照药组总体检测结果差值的双侧置信区间,若置信区间的上下限完全在等效界值内,即可得出等效性结论^[24]。采用双单侧 t 检验计算 90% 置信区间,公式为:

$$\text{标准差 } S_P = \sqrt{\frac{(n_T - 1)S_T^2 + (n_R - 1)S_R^2}{n_T + n_R - 2}},$$

$$\text{标准误差 } SE = S_P \sqrt{\frac{1}{n_T} + \frac{1}{n_R}},$$

$$\text{置信区间 } (\mathbf{X}_T - \mathbf{X}_R) \pm t_{0.05, df} \times SE,$$

其中 n_T 和 n_R 分别是生物类似药组和参照药组的样本量, $\mathbf{X}_T$ 和 $\mathbf{X}_R$ 是样本均值, $t_{0.05, df}$ 是自由度为 $df = n_T + n_R - 2$ 时双单侧 t 检验的 5% 分位数(对应 90% 置信水平)。

等效界限为 $\pm 1.5 \times \sigma_{\text{REF}}$, 其中 σ_{REF} 是参照药历史批次数据的标准差,判定标准:生物类似药均值的 90% 置信区间需完全落在等效性界限内。

Tier 2(质量范围法):作为中等风险属性,根据参照药的均值及标准差来计算质量范围^[25]。接受范围为 $\mu_{\text{REF}} \pm k \times \sigma_{\text{REF}}$, 其中 μ_{REF} 是参照药全部批次数据的均值, σ_{REF} 是参照药全部批次数据的标准差, k 是扩展因子(通常取 3,覆盖 99.7% 的正态分布数据)。

Tier 3(直观比对):低风险或定性属性,通过图谱重叠度评估。

批次选择:参照药($n=16$)与 CMAB807($n=15$)覆盖不同生产日期,确保批次间变异性纳入分析。数据以均值±标准差表示,采用 GraphPad Prism 9.0 进行建模,以及使用 Excel 进行数据统计。

2 结果与讨论

mAbs 的生物学功能与其结构特性密切相关,而结构特性则由一级氨基酸序列、二硫键模式及翻译后修饰(PTMs)共同决定。本研究通过整合多维正交技术^[26],系统评估了 CMAB807 与参照药在理化特性与功能活性上的相似性。基于质量属性的临床风险分级原则(Tier 1~3)(表 1),研究结果显示,CMAB807 在关键质量属性(CQAs)上与参照药高度一致,仅少数非关键属性存在微小差异。

2.1 CMAB807 与参照药的一级结构相似性

通过完整、还原和去糖基化的蛋白质谱分析以及还原肽图谱、游离巯基测定以及二硫键分析。CMAB807 在完整蛋白分子量上各信号峰与参照药的理论分子量精确匹配(质量误差小于 100 ppm),仅在峰丰度上有些许差异[图 1(a)]。还原后的 CMAB807 和参照药的分子量分析进一步证明(质量误差小于 50 ppm),CMAB807 与参照药的轻链和重链的氨基酸组成一致[图 1(b)]。而去糖基化后的质谱检测也发现(质量误差小于 50 ppm),轻链在切糖前后分子量未变化;而重链在切糖后峰型复杂性降低[图 1(c,d)],各峰分子量均和参照药一致。这些检测分析验证了 CMAB807 和参照药的一级序列一致性,质量图谱上些许小峰差异主要是由重链 C 端的赖氨酸剪切比例差异造成的。

肽图和质量肽图谱检测显示各峰一一对应,峰强度和保留时间相似(图 2)。这进一步证实了 CMAB807 与参照药具有一致的一级结构。此外,质量肽图显示 CMAB807 与参照药均具有与理论氨基酸序列 100% 的覆盖率,且翻译后修饰(糖基化、氧化、脱酰胺化等)的位点与类型相同(补充表 S1)。非还原 LC-MS/MS 肽图谱显示,CMAB807 与参照药具有相同的二硫键模式(9 组链内/链间二硫键),未检测到错配键(补充表

S2)。此外,游离巯基分析显示,CMAB807 的游离巯基水平(0.20~0.30 mol/mol)与参照药(0.20~0.28 mol/mol)高度相似,仅个别批次略微超出参照药范围($\pm 3SD$)。说明 CMAB807 与参照药一结构一致,二硫键形成良好。

表 1 CMAB807 和参照药在理化和生物学相似性评估中的质量属性汇总及分级

Tab. 1 Summary of quality attributes and grading in the physicochemical and biological similarity assessment between CMAB807 and the reference product

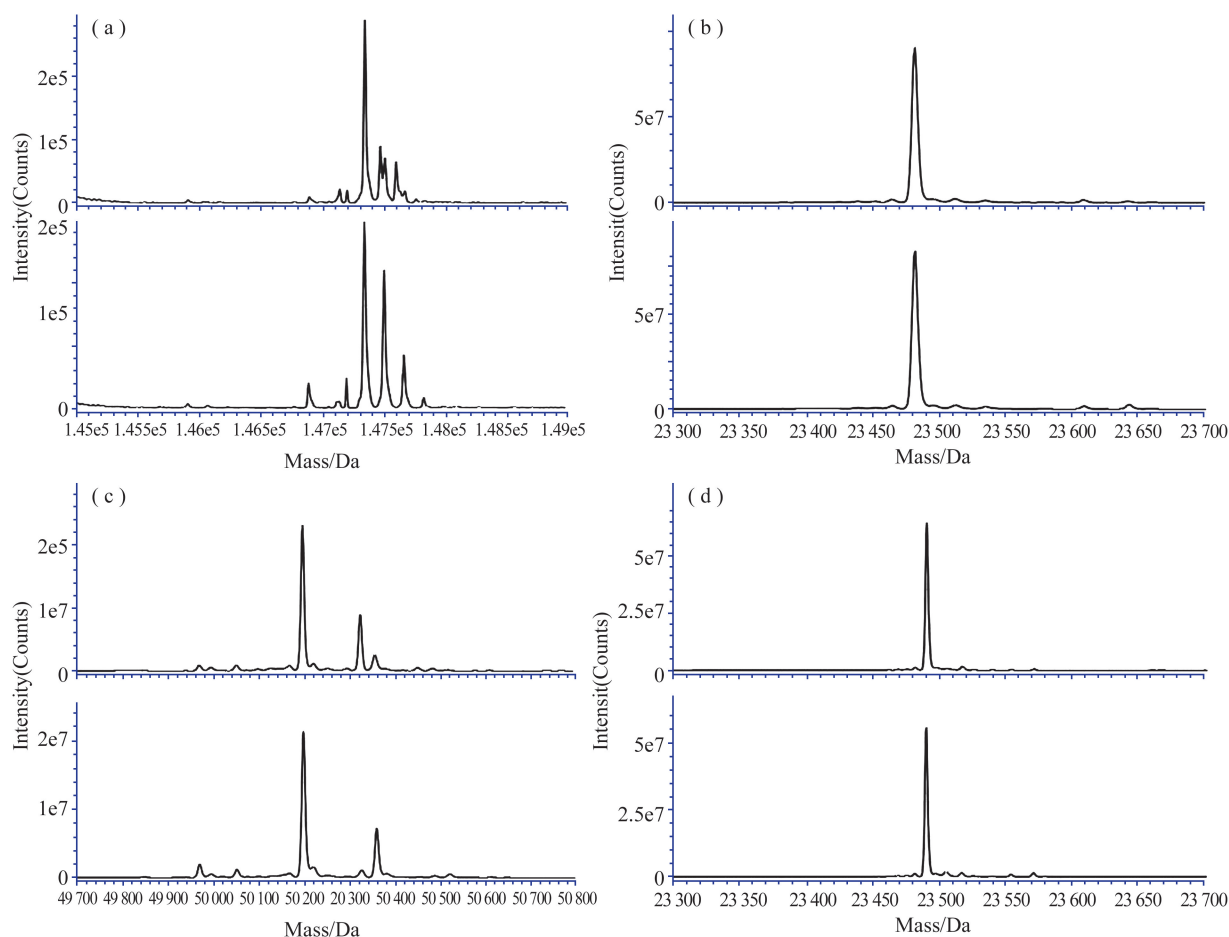
质量属性		检测方法	风险等级	Tier
一级结构	一级氨基酸序列	肽图	高	3 *
		质量肽图	高	3 *
		完整分子量	中	3 *
	分子量	亚基分子量	中	3 *
		去糖亚基分子量	中	3 *
	二硫键	非还原质量肽图	高	3 *
		二硫键异构体比例	中	2
	游离巯基	紫外分光光度法	中	2
	氧化	质量肽图	低	3
	脱氨基	质量肽图	中	3 #
高级结构	二级和三级结构	差示扫描量热	高	3 *
		圆二色谱	高	3 *
		分子内荧光	高	3 *
纯度	高分子量聚体	SEC-HPLC	高	2
	低分子量片段	CE-SDS	高	2
	NGHC	R-CE-SDS	中	2
	pI	cIEF	中	3 *
	酸、主、碱变异体	IEX-HPLC	中	2
糖基化修饰	糖基化位点	质量肽图	高	3 *
	岩藻糖基化二天线寡糖	N 糖谱分析	低	3
	去核心岩藻糖	N 糖谱分析	低	3
	高甘露糖	N 糖谱分析	高	3 #
	唾液酸	N 糖谱分析	中	3 #
生物学活性	游离 RANKL 结合活性	ELSIA	高	1
	膜型 RANKL 结合活性	FACS	高	1
	RANKL 生物活性	细胞法	高	1
	RANKL 亲和力	表面等离子共振	高	2
	FcRn 亲和力	表面等离子共振	高	2
	Fc γ RI 结合亲和力	表面等离子共振	低	3
	Fc γ RIIa 结合亲和力	表面等离子共振	低	3
	Fc γ RIIb 结合亲和力	表面等离子共振	低	3
	Fc γ RIIIa 结合亲和力	表面等离子共振	低	3
	Fc γ RIIIb 结合亲和力	表面等离子共振	低	3
	C1q 结合活性	ELISA	低	3
	CDC 活性	CDC 活性	低	3
	ADCC 活性	ADCC 活性	低	3

注:层级 3*:因为该属性或检测为定性分析,尽管其风险等级被评定为“高”或“中”;层级 3#:因为分析物的含量较低,尽管其风险等级在“高”或“中”的范围内。

2.2 CMAB807 与参照药的高级结构一致性

DSC 分析表明,CMAB807 和参考产品均显示出高度相似的热变性曲线,并且具有相同的变性温度(T_m),分别为 76℃和 85℃,所有 T_m 值的标准偏差小于 0.1℃[图 3(a)]。CD 分析显示,远紫外与近紫外

光谱中,两者的二级结构(α -螺旋、 β -折叠)及三级结构无显著差异[图 3(b)]。分子内荧光进一步支持了高级结构的高度相似性[图(4)]。上述结果表明,CMAB807 的构象稳定性与参照药一致,为其功能活性的相似性提供了结构基础。



注:(a) 完整蛋白分子量;(b) 还原轻链;(c) 还原重链以及(d) 还原且去糖基化重链。

图1 CMAB807 与中国市场地舒单抗的蛋白质分子量比较质谱图

Fig. 1 Comparison of protein masses of CMAB807 and RP

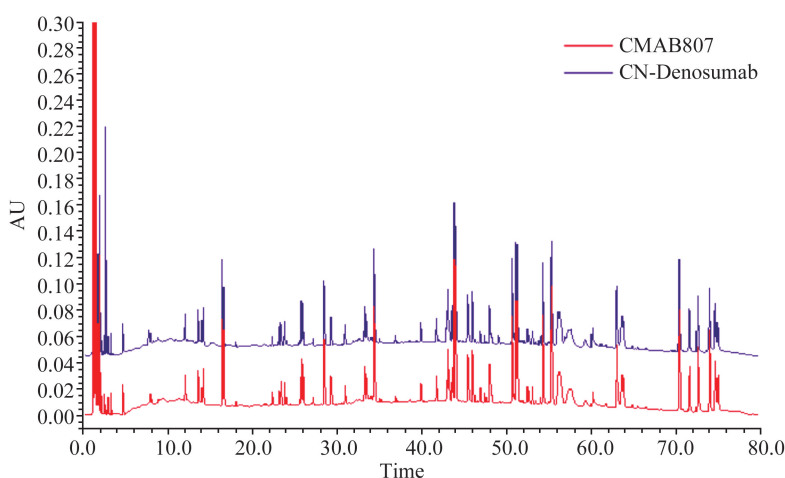


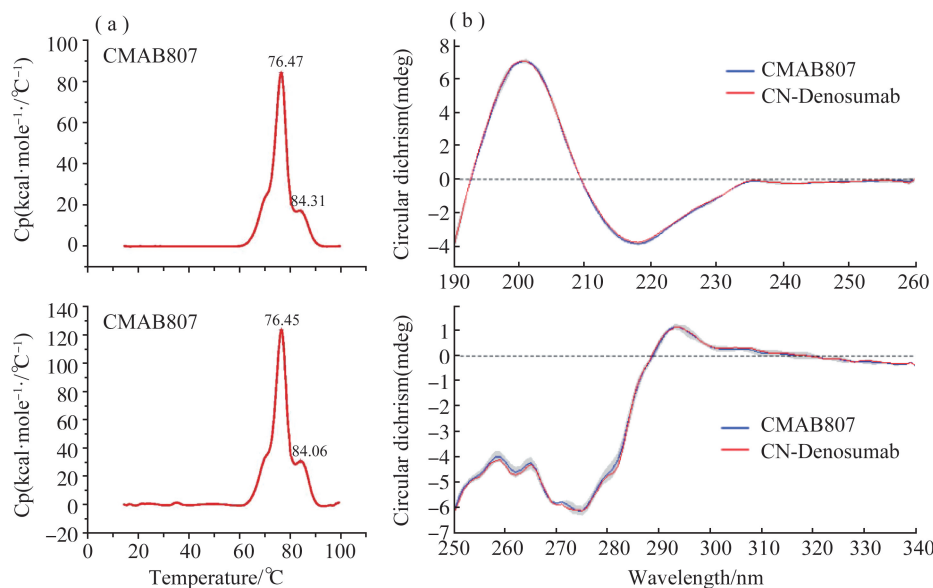
图2 CMAB807 和中国市场地舒单抗的胰蛋白酶酶解肽图

Fig. 2 Peptide maps of trypsin digested CMAB807, CN-Denosumab

2.3 纯度与电荷异质性的可比性分析

SEC 显示,CMAB807 的单体纯度(大于 98%)与参照药相当,聚集体含量略低,片段水平相似[图 5

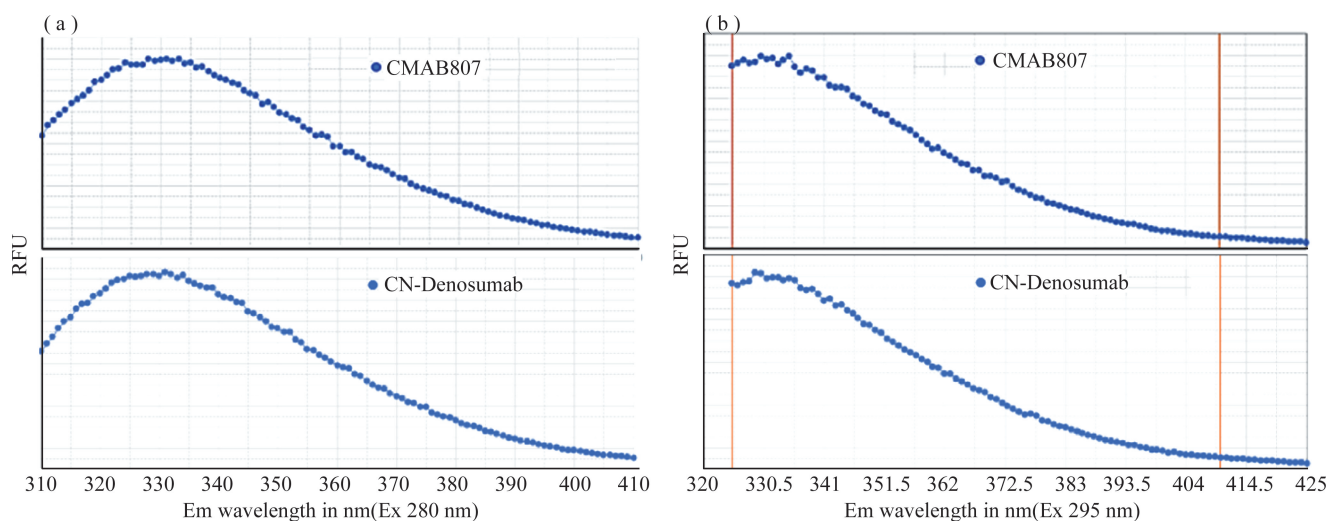
(a)]。还原与非还原 CE-SDS 图谱表明,CMAB807 的亚基迁移模式及各峰丰度与参照药一致,未检出异常条带[图 5(b, c)]。电荷变异体分析中,cIEF 显示 CMAB807 的碱性变异体比例略低于参照药,主要因重链 C 末端赖氨酸残留差异所致[图 6(a)]。经羧肽酶 B(CpB)处理后,两者的电荷分布进一步趋近[图 6(b)]。阳离子交换色谱(CEX)结合 LC-MS/MS 鉴定表明,CMAB807 的碱性峰主要由脯氨酸酰胺化(Pro Amidation)及 N 端焦谷氨酸环化(PyrE)修饰驱动,其水平略高于参照药,此类修饰不影响抗体活性与药代动力学^[27-28]。在纯度与点和异质性的可比性分析中,通过 CV 值 CMAB807 和参照药相比,两者差异较小。



注:(a) DSC 谱图;(b) 远紫外 CD 谱图(上)和近紫外 CD 谱图(下)。

图 3 CMAB807 和中国市场地舒单抗的高级结构分析:DSC 和 CD

Fig. 3 The higher order structure analysis by DSC, CD and Intramolecular fluorescence for CMAB807 and CN-Denosumab



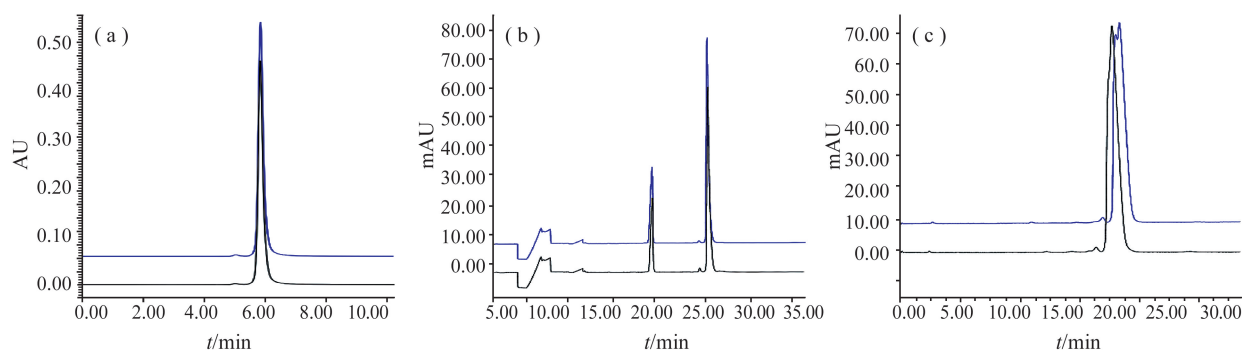
注:(a)激发波长 280 nm,(b)激发波长 295 nm。

图 4 CMAB807 和中国市场地舒单抗的高级结构分析:分子内荧光

Fig. 4 The higher order structure analysis by Intramolecular fluorescence for CMAB807 and CN-Denosumab

2.4 糖基化修饰的分析相似性比较

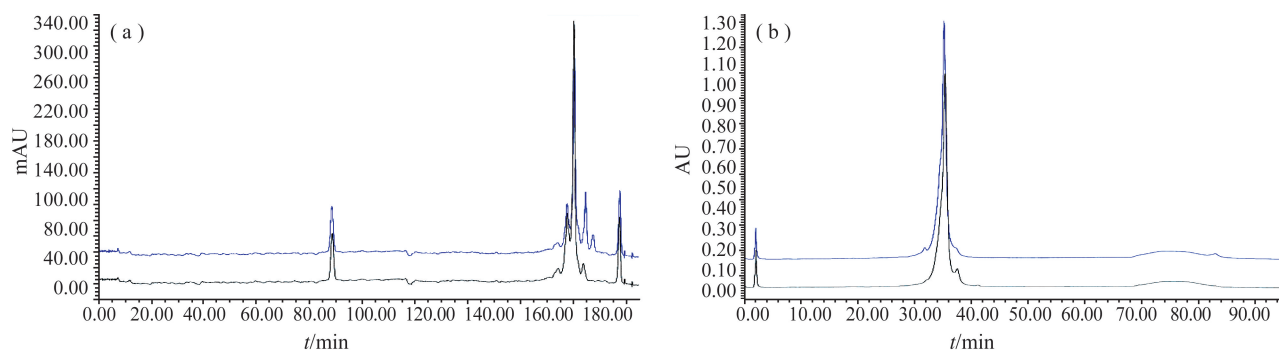
糖基化是一种重要的翻译后修饰,可能影响单克隆抗体的结构、稳定性、药代动力学和生物学活性。质谱糖基化位点分析显示 CMAB807 与参照药的 N-糖基化均位于重链 Asn298 位点,糖型种类相同(G0F、G1F、G2F 等),但相对丰度存在微小差异。



注:(a) SEC-HPLC 色谱图;(b) 还原 CE-SDS 谱图;(c) 非还原 CE-SDS 谱图。

图 5 CMAB807 和中国市场地舒单抗的大小纯度比较

Fig. 5 Comparison of the purity of CMAB807 and CN-Denosumab



注:(a)cIEF 谱图;(b) CpB 处理后 CEX 谱图。

图 6 CMAB807 和中国市场地舒单抗的电荷变异体图谱比较

Fig. 6 Comparison of the charge variant profiles among CMAB807 and CN-Denosumab

表 2 CMAB807 和中国市场地舒单抗的糖型比对均值(范围)

Tab. 2 Comparison of glycans between CMAB807 and CN-Denosumab

样品	岩藻糖基化 二天线寡糖	去核心岩藻 糖基化寡糖	高甘露糖	唾液酸	G0F	末端半乳糖
CMAB807/%	84.1 (79.8~88.9)	15.1 (11.1~19.2)	5.5 (4.1~7.1)	0.2 (0.1~0.2)	70.2 (66.6~75.9)	12.13 (8.6~16.8)
CN-Denosumab/%	81.1 (76.7~83.8)	18.0 (15.4~22.3)	7.5 (6.8~8.4)	0.3 (0.1~0.9)	61.2 (58.1~65.5)	17.59 (13.3~21.0)

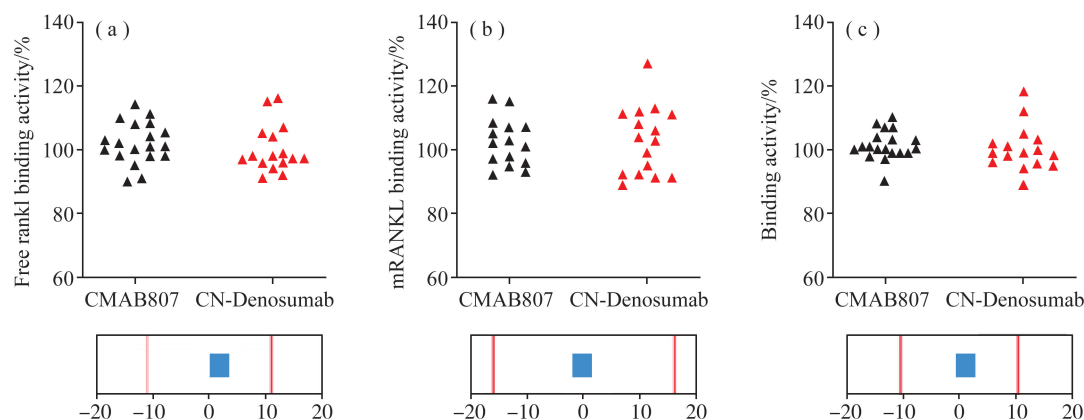
亲水相互作用色谱(HILIC)结合荧光检测和质谱分析结果显示,CMAB807 和参照药中检测到的糖型种类相同,主要包括核心岩藻糖基化的双天线聚糖,如 G0F、G1F(G1F 和 G1F')和 G2F,以及少量的非岩藻糖基化聚糖和带有唾液酸的聚糖(表 2)。在某些糖型的相对丰度上存在微小差异。例如,CMAB807 中 G0F 的相对丰度略高于参考产品,而 G1F 的相对丰度略低于参考产品。这些结果表明,CMAB807 与中国市场来源的地舒单抗具有相同的糖基化位点,以及相同的糖型种类,仅糖型的相对丰度存在微小差异,这进一步支持了 CMAB807 与参照药在结构和功能上的相似性。

2.5 功能活性相似性分析

地舒单抗通过与 RANKL 特异性结合,以空间位阻的方式阻止 RANKL 与其受体结合,抑制破骨细胞的活化和发展,从而减少骨吸收,发挥治疗相关疾病的作用。根据这作用机制,本研究分层次进行了 12 项生物和免疫学测试,包括 RANKL 结合、Fc 受体结合、ADCC、CDC 和生物活性检测(表 1),以评估 CMAB807 的相似性。

RANKL 结合活性、膜型 RANKL 结合活性以及生物活性是其地舒单抗的核心作用机制被评估为 Titer

1. ELISA 与流式细胞术证实,其游离 RANKL 结合活性及膜型 RANKL 结合活性与参照药等效[图 7(a, b)]。为了评估生物学活性,本研究构建了基于 NF- κ B 荧光素酶报告基因活性检测方法,分析结果显示,各批次 CMAB807 及参照药的相对生物活性均在 80%~130%范围[图 7(c)]。采用 Tier 1 的等效性评估方法分析,CMAB807 与参照药生物学活性等效。在功能活性相似性分析中,通过 CV 值 CMAB807 和参照药相比,两者差异较小。



注:散点图绘制在相应的等效性分析结果上方,该结果显示了 90% 的置信区间(CI)。每个标记表示一个特定批次的活性值;黑色三角形表示 CMAB807 的值,红色三角形表示中国市场的舒单抗的值。(a) RANKL 结合活性;(b) 膜型 RANKL 结合活性;(c) 生物活性。

图 7 CMAB807 和中国市场地舒单抗的 Titer 1 生物质量属性的比较

Fig. 7 Comparison of Tier 1 biological quality attributes of CMAB807 and CN-Denosumab

Fc 受体结合、SPR 亲和力以及 C1q 分析中,CMAB807 与 RANKL 结合的亲和常数 K_D 为 10^{-10} mol/L 数量级,与参照药的亲和常数基本一致[图 8(a)]。采用 Tier 2 的相似性比对方法进行分析,产品均在相似性质量范围(96.7%~103.7%),说明 CMAB807 的 RANKL 亲和力水平与参照药相似。另外,CMAB807 与重组人 FcRn 结合的亲和常数 K_D 为 10^{-9} mol/L 数量级,符合 IgG 和 FcRn 的理论亲和力水平,且与参照药的亲和力常数相一致[图 8(b)]。其他 Fc 受体的检测检测结果显示,CMAB807 和参照药表现一致,亲和力均较低。其中与 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIIIa 的亲和力在 10^{-6} mol/L 水平[图 8(c,d)],与 Fc γ RIIb 在 10^{-5} mol/L 水平[图 8(e)],与 Fc γ RIa 和 Fc γ RIIIb 则低于检测下限。通过 ELISA 检测分析,CMAB807 与参照药之间的 C1q 结合亲和力相似[图 8(f)]。

虽然 ADCC 和 CDC 并非地舒单抗的 MOA,我们进一步评估在该类活性上的相似性,结果显示,所有抗体均未产生 ADCC 反应和 CDC 反应,符合地舒单抗 IgG2 亚型的理论特性。

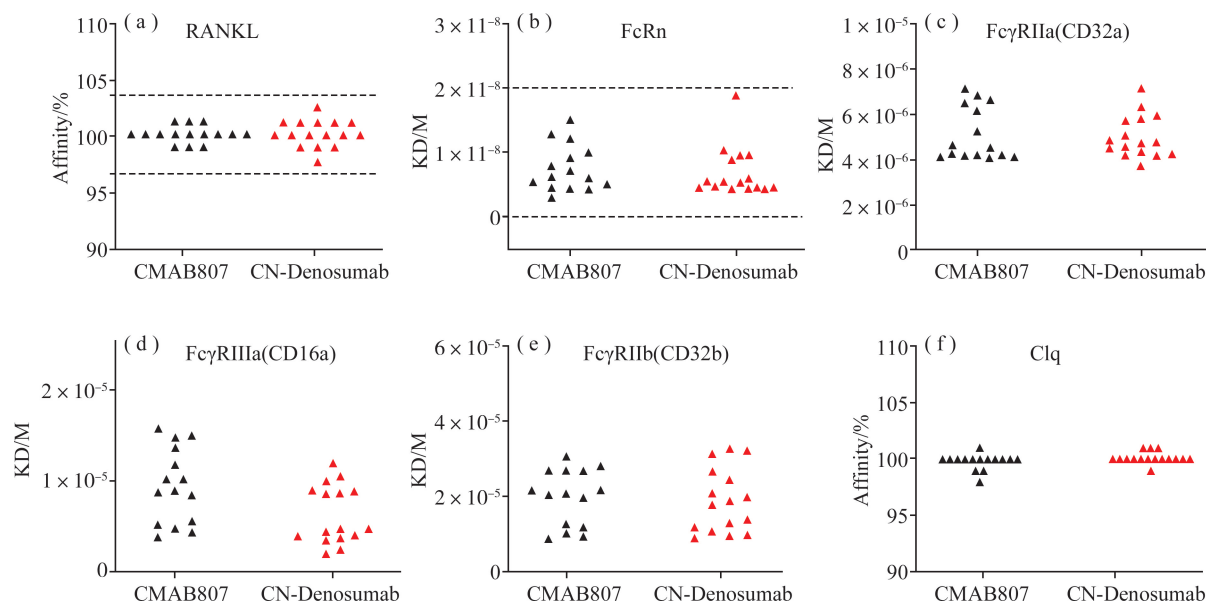
2.6 差异的临床意义评估

CMAB807 在重链 C 末端赖氨酸剪切比例等属性上与参照药存在微小差异。已有研究表明,IgG2 抗体的重链 C 末端赖氨酸在循环系统中的半衰期大约为 1 h,会在短时间内被去除^[29],因此抗体药物末端赖氨酸剪切的比例,对于药物进入人体后的影响并无意义。此外也有研究表明,抗体 C 端赖氨酸的剪切并不会对抗体的安全性和有效性产生影响^[30-31]。另一方面,在加速及长期稳定性研究中 CMAB807 显示其与参照药高度相似,结合临床药代动力学(PK)数据(数据未提供),上述差异未导致半衰期或暴露量变化,说明其无临床相关性。

3 结论

本研究基于质量属性风险分级原则,整合多维正交分析技术,系统评估了地舒单抗生物类似药 CMAB807 与参照药的理化特性与功能活性相似性。结果显示,CMAB807 在一级结构、高级结构、纯度及功能活性等质量属性上与参照药高度相似。该策略也在同亚型 IgG2 的另一个生物类似药帕尼单抗的相似性研究中被采用,在不同的层级上,对帕尼单抗的生物类似药和参照药之间的相似性进行了多维度、多层次的

比对分析^[32]。



注:每个标记表示一个特定批次的活性值;黑色三角形表示 CMAB807 的值,红色三角形表示中国市场的舒单抗的值。虚线表示 FDA 建议的质量;范围(均值 $\pm$ 3 倍标准差);(a) RANKL 结合亲和力;(b) FcRn 结合亲和力;(c) Fc γ RIIIa 结合亲和力;(d) Fc γ RIIIb 结合亲和力;(e) Fc γ RIIb 结合亲和力;(f) C1q 结合活性。

图 8 CMAB807 和中国市场地舒单抗的 Tier 2 和 Tier 3 的 Fab 和 Fc 相关结合功能比较

Fig. 8 Comparison of Tier 2 and Tier 3 Fab and Fc related binding functions of CMAB807 and CN-Denosumab

虽在重链 C 末端赖氨酸剪切比例等属性上存在微小差异,经功能验证及评估无临床意义,为其作为地舒单抗生物类似药的安全性和有效性提供了坚实的结构与功能学依据,为 CMAB807 作为地舒单抗生物类似药的上市申请提供了坚实的质量证据。研究同时凸显了分层统计方法与先进分析技术在生物类似药评价中的核心价值,为中国生物类似药研发的标准化与国际化提供了重要参考。

参 考 文 献

- [1] KAPLON H, REICHERT J M. Antibodies to watch in 2018[J]. mAbs, 2018,10(2): 183-203.
- [2] PHARMA E. World Preview 2023, Outlook to 2028: Patents and Pricing[R]. Evaluate,2022-1-22.
- [3] WADHWA M, KANG H N, THORPE R, et al. WHO informal consultation on revision of guidelines on evaluation of similar biopharmaceutical products, virtual meeting, 30 June-2 July 2021[J]. Biologicals, 2022, 76:1-9.
- [4] 国家药品监督管理局. 生物类似药研发与评估技术指南(试行)[R]. 北京:国家药品监督管理局,2015-1-18.
- [5] KIRCHHOFF C F, WANG X M, CONLON H D, et al. Biosimilars: key regulatory considerations and similarity assessment tools[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2017, 114(12): 2696-705.
- [6] AGENCY E M. Guideline on similar biological medicinal products containing monoclonal antibodies[R]. 2017.
- [7] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks 2018[J]. Nature Biotechnology, 2018, 36(12): 1136-1145.
- [8] CUMMINGS S R, MARTIN J S, MCCLUNG M R, et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis[J]. New England Journal of Medicine, 2009, 361(8): 756-765.
- [9] WANG L Y, ZENG Y J, GAO W Y, et al. Interrogation of structure-activity relationships in charge variants of therapeutic IgG2s enabled by free-flow isoelectric focusing fractionation[J]. BioDrugs, 2025.
- [10] ALABI O, DEMENT-BROWN J, TOLNAY M. Human Fc receptor-like 5 distinguishes IgG2 disulfide isoforms and deamidated charge variants[J]. Molecular Immunology, 2017, 92: 161-168.
- [11] ADMINISTRATION U S F A D. Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product[R]. U. S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2015-1-27.
- [12] NIKOLIN B, IMAMOVIĆ B, MEDANHODZIĆ-VUK S, et al. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses[J]. Bosnian Journal of Basic Medical Sciences, 2004, 4(2): 5-9.
- [13] SIVENDRAN R, RAMIREZ J, RAMCHANDANI M, et al. Scientific and statistical considerations in evaluating the analytical similarity

- of ABP 501 to adalimumab[J]. *Immunotherapy*, 2018, 10(11): 1011-1021.
- [14] FOYN H, THOMPSON P R, ARNESEN T. DTNB-based quantification of in vitro enzymatic N-terminal acetyltransferase activity[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1574: 9-15.
- [15] SOME D, AMARTELY H, TSADOK A, et al. Characterization of proteins by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle light scattering (SEC-MALS)[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2019, (148):148.
- [16] NAKANO M, Shoko N, et al. N-Glycan profiling by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)[R]. Japan Consortium for Glycobiology and Glycotechnology, 2021:1-10.
- [17] BAE S, KIM K, KANG K, et al. RANKL-responsive epigenetic mechanism reprograms macrophages into bone-resorbing osteoclasts [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2022, 20(1): 94-109.
- [18] SUN B M, XU J M, LIU S Q, et al. Characterization of small molecule-protein interactions using SPR method[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2690: 149-159.
- [19] ABDELILAH S G, BOUCHAÏB L, MORITA M, et al. Molecular characterization of the low-affinity IgE receptor Fc epsilonRII/CD23 expressed by human eosinophils[J]. *International Immunology*, 1998, 10(4): 395-404.
- [20] WANG X D, MCKAY P, YEE L T, et al. Impact of SPR biosensor assay configuration on antibody: neonatal Fc receptor binding data [J]. *mAbs*, 2017, 9(2): 319-332.
- [21] CSORBA K, SCHIRMBECK L, DUBLER D, et al. Anti-C1q autoantibodies: standard quantification and innovative ELISA[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2227: 107-114.
- [22] ROBKOPF S, EICHHOLZ K M, WINTERBERG D, et al. Enhancing CDC and ADCC of CD19 antibodies by combining fc protein-engineering with fc glyco-engineering[J]. *Antibodies*, 2020, 9(4): 63.
- [23] VANDEKERCKHOVE K, SEIDL A, GUTKA H, et al. Rational selection, criticality assessment, and tiering of quality Attributes and test methods for analytical similarity evaluation of biosimilars[J]. *The AAPS Journal*, 2018, 20(4): 68.
- [24] 国家药品监督管理局. 药物临床试验非劣效设计指导原则[R]. 北京:国家药品监督管理局,2020-1-17.
- [25] 中中国国家标准化管理委员会. 质量管理体系—要求[R]. 北京:国家中国国家标准化管理委员会,2017-1-22.
- [26] CH CHOW S C, SONG F Y, BAI H. Analytical similarity assessment in biosimilar studies[J]. *The AAPS Journal*, 2016, 18(3): 670-677.
- [27] LIU H C, PONNIAH G, ZHANG H M, et al. In vitro and in vivo modifications of recombinant and human IgG antibodies[J]. *mAbs*, 2014, 6(5): 1145-1154.
- [28] TSUBAKI M, TERASHIMA I, KAMATA K, et al. C-terminal modification of monoclonal antibody drugs: amidated species as a general product-related substance[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 52: 139-147.
- [29] CAI B, PAN H, FLYNN G C. C-terminal lysine processing of human immunoglobulin G2 heavy chain in vivo[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(2): 404-412.
- [30] 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.
- [31] FAID V, LEBLANC Y, BERGER M, et al. C-terminal lysine clipping of IgG1: impact on binding to human FcγRIIIa and neonatal Fc receptors[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2021, 159: 105730.
- [32] NANDAL J, MIHOOLYIA K N, VERMA H, et al. Evaluation of physicochemical and functional similarity of a new CHO derived anti-EGFR antibody P-MAB to its reference medicinal product[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine Biotechnology*, 2022, 50(1): 17-28.

(责任编辑:刘庆松)

支撑材料

Supporting Information

地舒单抗生物类似药 CMAB807 理化特性与 功能活性相似性评估

庄煌圳^{1,2}, 郭清城^{1,2,3,4}, 周朝欣^{1,2,3,4}, 王晨光^{1,2,3,4}, 范文强^{1,2,3,4}, 朱漳帆^{1,2},
任雨乐^{1,2}, 潘志远^{1,2}, 陈一^{1,2}, 郭梦慧^{1,2}, 刘涛^{1,2,3,5}, 冀芦沙^{1,2,3}, 钱卫珠^{1,2,3},
侯盛^{1,2,3}, 李军^{1,2,3}, 孙梓乔^{1,2,3}, 王学堃^{1,2,3,6}, 张大鹏^{1,2,3}, 郭怀祖^{1,2,3,6}, 徐进^{1,2,3}

(1. 聊城大学 药学与食品工程学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 山东 聊城 252059; 2. 国家药品监督管理局
治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203; 3. 温州医科大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,
浙江 温州 325035; 4. 泰州迈博太科药业有限公司, 江苏 泰州 225316; 5. 复旦大学 华山医院 肿瘤科, 上海 200040;
6. 张江生物技术有限公司 大分子药物与规模化制备全国重点实验室, 上海 201203)

Analytical and Functional Similarity Assessment of Denosumab Biosimilar CMAB807

ZHUANG Huangzhen^{1,2}, GUO Qingcheng^{1,2,3,4}, ZHOU Chaoxin^{1,2,3,4},
WANG Chenguang^{1,2,3,4}, FAN Wenqiang^{1,2,3,4}, ZHU Weifan^{1,2},
REN Yule^{1,2}, PAN Zhiyuan^{1,2}, CHEN Yi^{1,2}, GUO Menghui^{1,2},
LIU Tao^{1,2,3,5}, JI Lusha^{1,2,3}, QIAN Weizhu^{1,2,3}, HOU Sheng^{1,2,3},
LI Jun^{1,2,3}, SUO Ziqiao^{1,2,3}, WANG Xuekun^{1,2,3,6},
ZHANG Dapeng^{1,2,3}, GUO Huaizu^{1,2,3,6}, XU Jin^{1,2,3}

(1. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale preparation, School of Pharmaceutical Sciences and Food
Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic
Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale
preparation, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. Taizhou
Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 5. Department of Oncology, Huashan Hospital,
Fudan University, Shanghai 200040, China; 6. State key laboratory of macromolecular drugs and large-scale
preparation, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

表 S1 活性及纯度相关质量属性变异系数统计

Tab, S1 Statistics on coefficients of variation for quality attributes related to activity and purity

质量属性		CV 值/%	
		CMAB807	CN-Denosumab
活性	游离 RANKL 结合活性	6.3	7.7
	膜型 RANKL 结合活性	7.2	10.5
	RANKL 生物活性	4.5	6.6
纯度	高分子量聚体	26.9	9.0
	低分子量片段	19.6	21.1
	NGHC	17.8	21.1
	酸性变异体	12.4	5.2
	主峰	1.7	1.1
	碱性变异体	15.2	16.7

表 S2 翻译后修饰

Tab, S2 Post-translational modifications

Samples	N-Term Pyr/%	C-Term -K/%	Oxidized Peptides/%			Deamidated/%
			M106	M253	M398	
CMAB807	2.5~4.5	64.7~78.2	1.9~8.2	2.5~4.7	1.1~3.0	4.4~6.0
CN-Denosumab	2.7~5.1	93.4~98.4	1.7~9.7	3.8~4.7	1.4~3.9	3.4~6.4

表 S3 二硫键比对分析

Tab, S3 Comparative analysis of disulfide Bonds

二硫键信息			色谱保留时间/min	
理论二硫键	位置	对应肽段信息	CMAB807	CN-Denosumab
L;C23-L;C89	轻链内	L;TK2-L;TK10	47.56	47.54
L;C135-L;C195	轻链内	L;TK15-L;TK22	50.89	50.83
L;C215-H;C136	链间	L;TK24-H;TK11	38.33	38.29
H;C22-H;C96	重链内	H;K1-H;K4	61.52	61.53
H;C149-H;C205	重链内	H;TK12-H;TK13	68.20	68.15
H;C224-H;C224、H;C225-H;C225、 H;C228-H;C228、H;C231-H;C231	链间	H;K11-H;K11	67.46	67.51
H;C263-H;C322	重链内	H;TK21-H;TK27	51.73	51.68
H;C368-H;C426	重链内	H;TK35-H;TK40	42.76	43.10
L;C215-H;C224-H;C225-H;C136 *	链内、链间	L;TV34-H;TV15-16-H;TV21-23	46.35	46.31

注：* IgG2-亚型特征二硫键肽段。

(责任编辑:刘庆松)