

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

فهرست مطالب

۳	۱,۱ مفاهیم عمومی
۴	۱,۲ کیفیت و ویژگی ها
۴	۱,۳ مفاهیم فارماکولوژیک و ایمنی
۴	۱,۴ آمار و تصمیم گیری شباهت
۵	۲,۱ هدف و چارچوب
۵	۲,۲ فرآورده های مشمول
۵	۲,۳ فرآورده ها و موقعیت های خارج از دامنه
۶	۲,۴ مراحل و فعالیت های تحت پوشش
۶	۲,۵ پیش نیازهای استفاده از مسیر متناسب
۷	۲,۶ مواردی که حذف CES قابل قبول نیست
۷	۲,۷ سازگاری با شکل دارویی و دستگاه
۷	۲,۸ نتیجه عملی دامنه
۸	۳,۱ هدف ماده
۸	۳,۲ اسناد اروپایی (EMA)
۸	۳,۳ اسناد هماهنگ سازی بین المللی (ICH)
۸	۳,۴ دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO)
۸	۳,۵ دستورالعمل سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)
۹	۴,۱ اصول عمومی
۹	۴,۲ پیش نیازهای ارزیابی شباهت
۱۰	۴,۳ پروتکل ارزیابی شباهت (Similarity Assessment Protocol)
۱۱	۴,۴ سری ساخت ها و نمونه برداری (مطابق سیاست بومی کشور)
۱۱	۴,۵ تحلیل های فنی و عملکردی
۱۱	۴,۶ برخورد با عدم قطعیت ها

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- ۴,۷ شرایط کفایت برای حذف CES ۱۱
- ۵,۱ اصل کلی ۱۲
- ۵,۲ طراحی مطالعه فارماکوکینتیک انسانی ۱۲
- ۵,۳ مطالعه فارماکودینامیک (PD) در صورت نیاز ۱۳
- ۵,۴ ارزیابی ایمنی و ایمنونوتسیسته ۱۳
- ۵,۵ کفایت برای حذف CES ۱۳
- ۶,۱ تصمیم‌گیری نهایی ۱۴
- ۶,۲ برچسب‌گذاری (Labelling) ۱۴
- ۶,۳ تغییرات پس از ثبت (Post-Approval Changes) ۱۴
- ۶,۴ بازنگری و به‌روزرسانی راهنما ۱۴
- پیوست‌ها ۱۵

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

مقدمه

این راهنما با هدف هم راستا کردن الزامات ملی با رویکردهای نوین نهادهای مرجع بین‌المللی در حوزه توسعه **Biosimilar** تدوین شده است.

اصل راهبردی این سند، اتکا بر **مجموع شواهد - Totality of Evidence** - است و تمرکز آن بر اثبات شباهت کیفی و عملکردی - **Analytical and Functional Similarity** - از طریق توصیف دقیق ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، آزمون‌های عملکردی مرتبط با مکانیسم اثر، و مطالعه انسانی فارماکوکینتیک - **PK Study** - می‌باشد.

در مواردی که داده‌های آنالیزی و عملکردی با دقت بالا ارائه شوند و بتوانند عدم قطعیت‌های باقیمانده را از منظر اثربخشی و ایمنی به‌طور علمی رفع نمایند، نیاز به کارآزمایی‌های مقایسه‌ای اثربخشی و ایمنی - **CES** - می‌تواند حذف یا کاهش یابد.

این سند با رعایت اصول قابلیت مقایسه - **Comparability** - و مدیریت ریسک - **Risk Management** -، یک چارچوب **مورد به مورد و مبتنی بر ریسک** ارائه می‌دهد تا مسیر توسعه بیوسیمیلارها شفاف، کارآمد و متناسب با ظرفیت ملی (کاهش چشمگیر هزینه‌های توسعه محصول، صرفه جویی ارزی و افزایش سرعت تایید پروانه‌های محصولات بیوسیمیلار) باشد.

در عین حال، در شرایطی که مکانیسم اثر - **Mechanism of Action (MoA)** - به‌خوبی شناخته نشده یا رابطه ساختار-عملکرد ناقص باشد، یا تفاوت‌های کیفی از نظر بالینی ممکن است معنادار تلقی شوند، الزام به انجام مطالعات **CES** به قوت خود باقی می‌ماند. هدف کاربردی این سند، **کاهش مطالعات غیرضروری بدون اغماض علمی و صیانت از ایمنی بیمار** است تا دسترسی بیماران به درمان‌های ایمن، مؤثر و مقرون به صرفه تسهیل گردد.

این سند هم‌زمان بر **پویایی و به‌روزرسانی مستمر** تأکید دارد و با انباشت تجربه ملی و جهانی به‌صورت دوره‌ای بازنگری خواهد شد.

ماده ۱ - تعاریف و مفاهیم پایه

۱.۱ مفاهیم عمومی

۱.۱.۱ **بیوسیمیلار Biosimilar**: فرآورده زیستی که از نظر کیفیت، عملکرد زیستی، و رفتار فارماکوکینتیکی شباهت بالایی به داروی مرجع دارد، بدون لزوم یکسانی مطلق همه ویژگی‌ها.

۱.۱.۲ **داروی مرجع (RMP) Reference Medicinal Product**: فرآورده زیستی دارای پروانه معتبر که مبنای مقایسه برای اثبات شباهت است.

۱.۱.۳ **قابلیت مقایسه Comparability**: فرایند علمی برای نشان دادن اینکه محصول بیوسیمیلار یا محصول پس از تغییر فرایند از نظر کیفیت و عملکرد با مرجع تفاوت بالینی معناداری ندارد.

۱.۱.۴ **مجموع شواهد Totality of Evidence**: تصمیم‌گیری نهایی رگولاتور بر اساس مجموعه یکپارچه داده‌های آنالیزی، عملکردی، **PK/PD** و ایمنی.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۱,۲ کیفیت و ویژگی ها

۱,۲,۱ ویژگی کیفی (QA) Quality Attribute : هر ویژگی قابل سنجش که کیفیت محصول را توصیف می کند (مانند بار ایزوالکتریک، گلیکوزیلاسیون، یا ناخالصی ها مربوط به تولید و ...).

۱,۲,۲ ویژگی کیفی بحرانی (CQA) Critical Quality Attribute : ویژگی ای از محصول که بر ایمنی، اثربخشی، یا ایمونوژنیسیته اثر دارد و باید کنترل شود.

۱,۲,۳ پروفایل هدف کیفی محصول (QTPP) Quality Target Product Profile : بیان کیفیت مورد انتظار محصول نهایی بر اساس تغییرپذیری مشاهده شده در داروی مرجع.

۱,۲,۴ راهبرد کنترلی (Control Strategy) : مجموعه روش ها و حدودی که تضمین می کند سری ساخت های آتی در محدوده شباهت با داروی مرجع باقی بمانند.

۱,۲,۵ پروتکل ارزیابی شباهت (Similarity Assessment Protocol) : سندی که از پیش بین متقاضی و رگولاتور توافق شده و در آن فهرست QAs/CQAs، روش ها، معیارها و نحوه ارزیابی تفاوت ها تعیین شده است.

۱,۳ مفاهیم فارماکولوژیک و ایمنی

۱,۳,۱ مکانیسم اثر (MoA) : مسیرهای زیستی که دارو از طریق آن ها اثر درمانی خود را اعمال می کند.

۱,۳,۲ فارماکوکینتیک (PK) : توصیف جذب، توزیع، متابولیسم و دفع دارو.

۱,۳,۳ فارماکودینامیک (PD) : توصیف پاسخ های زیستی و شاخص های اثر دارو.

۱,۳,۴ ایمونوژنیسیته (Immunogenicity) : پتانسیل دارو برای ایجاد پاسخ ایمنی از نوع آنتی بادی های ضد دارو (ADA/NAb) و اثرات بالینی مرتبط.

ایمونوژنیسیته به معنای توانایی یک داروی زیستی در القای پاسخ ایمنی در بدن بیمار است که می تواند منجر به تشکیل آنتی بادی های ضد دارو (Anti-Drug Antibodies; ADA) و در برخی موارد آنتی بادی های خنثی کننده (Neutralizing Antibodies; Nab) شود. این پاسخ ممکن است موجب کاهش اثربخشی دارو، تغییر در فارماکوکینتیک، یا بروز واکنش های ناخواسته ایمنی گردد. بنابراین ارزیابی ایمونوژنیسیته باید شامل طراحی آزمون های حساس و اختصاصی، پایش در طول درمان، و تحلیل ارتباط نتایج با پیامدهای بالینی باشد.

۱,۴ آمار و تصمیم گیری شباهت

۱,۴,۱ شرط شباهت (Similarity Condition) : تعریف رسمی از این که چه زمانی یک ویژگی بین بیوسیمیلار و مرجع مشابه تلقی می شود.

۱,۴,۲ معیار شباهت (Similarity Criterion) : قاعده تصمیم آماری برای پذیرش یا رد شباهت با کنترل خطاهای آماری نوع اول و دوم.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۱,۴,۳ رویکرد جمعیت در جمعیت: روش آماری برای QAS پیوسته که درصد مشخصی از جمعیت بیوسیمیلار باید در محدوده درصدی از جمعیت RMP قرار گیرد.

✓ چک لیست اجرایی - ماده ۱

- ☐ QAs و CQAs تعریف و در پروتکل ثبت شده اند.
- ☐ MoA و ارتباط ساختار-عملکرد تبیین شده است.
- ☐ شرط و معیار شباهت برای هر ویژگی تعیین شده است.

ماده ۲ - دامنه کاربرد و شرایط استفاده از رویکرد متناسب

۲,۱ هدف و چارچوب

این راهنما حدود و ثغور استفاده از رویکرد بالینی متناسب - **Tailored Clinical Approach** - را در توسعه بیوسیمیلارها مشخص می کند.

تمرکز بر محصولات با مشخصات پیشرفته - **Highly Characterized Products** - است که برای آن ها داده های آنالیزی، عملکردی و PK انسانی کفایت علمی دارند.

۲,۲ فرآورده های مشمول

این راهنما بر کلیه محصولات زیستی و پپتیدی که از نظر آنالیزی و عملکردی قابل توصیف دقیق هستند اعمال می شود، شامل:

- آنتی بادی های مونوکلونال با مکانیسم اثر شناخته شده و قابلیت ارزیابی عملکردهای Fc مانند ADCC، CDC و FcRn؛
- پروتئین های کوچک و پپتیدها با ساختار ساده تر؛
- انسولین ها و آنالوگ های آن ها (در قالب دارو یا ترکیب دارو-دستگاه)؛
- آنزیم های درمانی با قابلیت توصیف دقیق ساختار گلیکان و فعالیت؛
- فاکتورهای انعقادی با آزمون های عملکردی استاندارد؛
- پروتئین های ادغامی که دامنه های عملکردی جداگانه دارند.

۲,۳ فرآورده ها و موقعیت های خارج از دامنه

رویکرد حذف یا کاهش CES در موارد زیر پذیرفتنی نیست:

- مکانیسم اثر ناشناخته یا چندوجهی با عدم قطعیت زیاد؛
- محصولات با ویژگی های ناکافی یا ابزارهای آنالیزی محدود؛
- فرآورده های با جذب سیستمیک ناچیز (مثلاً موضعی یا چشمی)؛
- فرآورده های سلولی و ژن درمانی با ساختار بسیار پیچیده؛

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

این محصولات ماهیت بسیار پیچیده‌ای دارند (Cellular Heterogeneity, Vector Integration In-vivo Expression) و تعیین مشخصات با ابزار کلاسیک بیوسیمیلارها نیستند. به همین دلیل، داده‌های بالینی برای ارزیابی کارایی و ایمنی ضروری‌اند.

- اختلافات کیفی با اثر بالینی بالقوه بر ایمنی یا اثربخشی.

اگر در CQAs بحرانی (مثلاً گلیکوزیلاسیون، Aggregation یا فعالیت Fc) تفاوت معنادار مشاهده شود که می‌تواند بر ایمنی، اثربخشی یا PK تأثیر بگذارد، حذف CES قابل دفاع نیست و باید با داده بالینی جبران شود

۲،۴ مراحل و فعالیت‌های تحت پوشش

- اعتبارسنجی پروتکل شباهت؛

- ارزیابی اولیه بیوسیمیلار با تکیه بر داده‌های کیفیت + PK انسانی تطبیقی؛

در این بند، منظور از (Comparative Human PK Study) معمولاً انجام مطالعه در داوطلبان سالم (Healthy Volunteers - HV) است، مگر آن که ملاحظات ایمنی یا اخلاقی اجازه ندهد.

- در اغلب بیوسیمیلارها (مانند انسولین، EPO، G-CSF، GH و حتی برخی mAb ها با ایمنی مناسب)، مطالعه PK در HV انجام می‌شود چون:
 - ✓ خطای بین فردی کمتر است → حساسیت مطالعه برای تشخیص تفاوت افزایش می‌یابد.
 - ✓ تداخلات بیماری یا داروی همزمان وجود ندارد → نتیجه صرفاً منعکس کننده ویژگی دارو است.
 - ✓ طراحی متقاطع (Crossover) عملی تر و از نظر آماری قوی تر است.
- اما اگر ایمنی دارو در HV قابل اطمینان نباشد (مثلاً در mAb های سیتوتوکسیک یا ایمونومدولاتورهای قوی)، مطالعه باید در جمعیت بیمار (Patients) انجام شود و معمولاً طراحی به صورت Parallel است.

- بررسی تغییرات پس از ثبت (Post-approval) که مستلزم نمایش مقایسه پذیری باشند

۲،۵ پیش نیازهای استفاده از مسیر متناسب

برای بهره‌گیری از مسیر حذف یا کاهش CES وجود شرایط زیر الزامی است:

۱. شناخت کافی از مکانیسم اثر و روابط ساختار-عملکرد.

۲. تحلیل چندجانبه و با تعداد کافی از سری ساخت‌های داروی مرجع.

۳. مطالعه انسانی PK تطبیقی طراحی شده با هم‌ترازی محتوای پروتئین و کنترل سوگیری Bias Control.

هم‌ترازی محتوای پروتئین: (Protein Content Alignment)

قبل از انجام مطالعه، باید غلظت واقعی ماده مؤثره (Active Protein) در هر دو فرآورده، به‌صورت تجربی اندازه‌گیری شود (مثلاً با Amino Acid Analysis یا UV A280). ضریب خاموشی تجربی تا مقدار دوز تزریقی دقیقاً برابر باشد. هرگونه اختلاف در غلظت واقعی می‌تواند منجر به تفاوت ظاهری در پارامترهای PK (مثل Cmax یا AUC) شود و باعث نتیجه‌گیری نادرست گردد.

کنترل سوگیری Bias Control

طراحی مطالعه باید به‌گونه‌ای باشد که تمام عوامل غیرمرتبط با خود دارو (مانند تفاوت در دمای تزریق، روش رقیق‌سازی، توالی تزریق در طراحی Cross-over، و انتخاب جمعیت داوطلب) به حداقل برسند. رعایت اصول تصادفی‌سازی (Randomization)، کورسازی (Blinding)، کنترل شرایط نگهداری نمونه و اعتبارسنجی روش زیست‌آنالیزی (Bioanalytical Validation) برای حذف این سوگیری‌ها ضروری است.

۴. پروتکل شباهت از پیش توافق‌شده با تعریف معیار و شرط شباهت

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۲,۶ مواردی که حذف CES قابل قبول نیست

- مکانیسم اثر نامشخص یا چندگانه؛
- ابزارهای آنالیزی ناکافی؛
- عدم امکان طراحی PK انسانی معتبر؛
- تفاوت‌های کیفی مهم در CQAs بحرانی که می‌توانند اثر بالینی بالقوه دارا باشند

۲,۷ سازگاری با شکل دارویی و دستگاه

در محصولات دارو-دستگاه (مانند قلم انسولین)، علاوه بر کیفیت و عملکرد دارو، مطالعه کفایت عملکردی دستگاه و قابلیت استفاده (Usability) نیز الزامی است.

۲,۸ نتیجه عملی دامنه

هر محصول زیستی که از نظر علمی دارای مشخصات دقیق (well specified) باشد و بتوان برای آن مطالعه PK انسانی معتبر طراحی کرد، مشمول این راهنما است. در مقابل، محصولات با مکانیسم اثر نامشخص یا شناسایی مشخصات ناکافی، همچنان نیازمند مسیرهای بالینی قبلی هستند.

✓ چک‌لیست اجرایی – ماده ۲

- ☐ طبقه محصول (کلاس بیولوژیک) مشخص شده است.
- ☐ MoA و مسیر اثر در مستندات فنی شرح داده شده است.
- ☐ آنالیزی چندجانبه شامل تعداد کافی از سری ساخت‌های مرجع تدوین شده است.
- ☐ طرح مطالعه PK انسانی تطبیقی در پروتکل ضمیمه شده است.
- ☐ شرایط حذف یا کاهش CES بررسی و توجیه علمی ارائه شده است.
- ☐ در صورت دارو-دستگاه بودن، ارزیابی عملکرد دستگاه انجام شده است.
- ☐ مشخصه یابی پروتئین
- ☐ مشخصه یابی سلول

ماده ۳ – مستندات بالادستی (Reference Frameworks)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۳،۱ هدف

مبنای تدوین و تفسیر این راهنما که باید در زمان تهیه و ارزیابی پرونده‌های بیوسیمیلار مورد استناد قرار گیرند. منابع شامل دستورالعمل‌های آژانس دارویی اروپا (EMA)، سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)، اسناد هماهنگ‌سازی بین‌المللی (ICH)، و دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO) می‌باشند.

۳،۲ اسناد اروپایی (EMA)

۳،۲،۱ Reflection Paper on a Tailored Clinical Approach in Biosimilar Development (EMA/CHMP/BMWP/60916/2025):

۳،۲،۲ Guideline on Similar Biological Medicinal Products (CHMP/437/04 Rev.1):

۳،۲،۳ Similar Biological Products Containing Biotechnology-Derived Proteins: Quality Issues (EMA/CHMP/BWP/247713/2012):

۳،۲،۴ Non-Clinical and Clinical Issues (EMA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev.1):

۳،۲،۵ Guideline on Monoclonal Antibodies (EMA/CHMP/BMWP/403543/2010)

۳،۲،۶ Immunogenicity Assessment of Therapeutic Proteins (EMA/CHMP/BMWP/14327/2006 Rev.1)

۳،۲،۷ Statistical Methodology for Comparative Assessment of Quality Attributes (EMA/CHMP/138502/2017)

۳،۳ اسناد هماهنگ‌سازی بین‌المللی (ICH)

ICH Q5E – Comparability of Biotechnological/Biological Products ۳،۳،۱

ICH Q9 – Quality Risk Management ۳،۳،۲

۳،۴ دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (WHO)

WHO Guidelines on Evaluation of Biosimilars (2022)

۳،۵ دستورالعمل سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)

Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations (2019)

Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product: Updated Recommendations for Assessing the Need for Comparative Efficacy Studies (FDA Draft/2025)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

ماده ۴ - الزامات تعیین مشخصات کیفی

۴،۱ اصول عمومی

۱. اساس ارزیابی شباهت بر رابطه ساختار-عملکرد - **Structure-Function Relationship** - استوار است. هرگاه ساختار مولکول و عملکردهای زیستی آن با دقت توصیف و با داروی مرجع هم‌راستا شود، شباهت بالینی قابل استنتاج است.

۲. تفاوت‌های جزئی و بی‌اهمیت بالینی پذیرفتنی‌اند، اما اختلاف در ویژگی‌های بحرانی - **CQAs** - که بر **PK**، ایمنی یا ایمونوژنیسیته اثرگذار باشند، غیرقابل قبول محسوب می‌شوند.

۳. تصمیم نهایی مبتنی بر **مجموع شواهد - Totality of Evidence** - شامل داده‌های فیزیکی‌شیمیایی، *in vitro* مطالعه PK انسانی است؛ **CES ابزار پشتیبان است، نه جایگزین توسعه کیفی ناقص.**

اساس ارزیابی شباهت این است که هر تفاوت در ساختار مولکول زیستی، تنها زمانی اهمیت دارد که بر عملکرد بالینی اثر بگذارد. بنابراین ابتدا باید مسیرهای عملکردی مرتبط با مکانیسم اثر (MoA) مشخص شوند، سپس ارزیابی کیفی بر اساس همان عملکردها طراحی گردد. ارزیابی شباهت ساختاری بدون تحلیل عملکردی کافی نیست. برای مثال، در آنتی‌بادی‌ها، شباهت در توالی و گلیکوزیل‌اسیون تنها زمانی قابل قبول است که فعالیت‌های FC مانند ADCC یا CDC نیز مشابه باشند.

۴،۲ پیش‌نیازهای ارزیابی شباهت

۴،۲،۱ **شناخت مکانیسم اثر (MoA):** مسیرهای اثر و حوزه‌های عملکردی باید شناسایی و ارتباط آن‌ها با **CQAs** مشخص شود. همچنین باید روشن شود که کدام جنبه‌های مکانیسم اثر می‌توانند بر ایمنی و به‌ویژه بر بروز یا شدت ایمونوژنیسیته اثرگذار باشند، تا در ارزیابی آنالیزی و بالینی مورد توجه قرار گیرند.

باید دقیقاً مشخص شود که کدام بخش از مولکول مسئول اثر درمانی است (Binding Site، Effector Domain و غیره). در صورت چند مکانیسمی بودن، همه مسیرها باید پوشش داده شوند.

۴،۲،۲ شناسایی و رتبه‌بندی CQA ها: بر پایه تحلیل ریسک و شواهد ساختار-عملکرد انجام شود.

با استفاده از تحلیل ریسک (ICH Q9) و داده‌های ساختار-عملکرد، هر ویژگی کیفی باید طبقه‌بندی شود:

- بحرانی (Critical)
- مهم ولی غیربحرانی (Important but Non-critical)
- غیرمؤثر (Non-impacting)

این رتبه‌بندی تعیین می‌کند که تفاوت در کدام ویژگی ممکن است اثر بالینی ایجاد کند.

۴،۲،۳ روش‌های آنالیزی اورتوگونال (Orthogonal Analytical Methods):

استفاده از مجموعه روش‌های مکمل (LC-MS، CEX-HPLC، cIEF، SEC-MALS، CD/FTIR/NMR، HDX-MS و بیوتست‌های سلولی) برای پوشش کامل ساختار و عملکرد.

برای هر ویژگی بحرانی، استفاده از حداقل دو روش آنالیزی اورتوگونال (Orthogonal) الزامی است تا هم‌پوشانی و صحت نتایج تضمین شود. به‌عنوان مثال، ساختار اول (Primary Structure) باید با روش‌های مکمل مانند Peptide Mapping (LC-MS/MS) و Intact Mass Analysis (LC-MS) بررسی گردد، در حالی که ساختار سوم (Tertiary Structure) باید با روش‌های مکمل مانند Peptide Mapping (LC-MS/MS) و Intact Mass Analysis (LC-MS) بررسی گردد.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

(Structure) با ترکیب روش‌های (CD), Circular Dichroism, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) و در صورت لزوم Differential Scanning Calorimetry (DSC) مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

۴,۲,۴ نمایه‌سازی تغییرپذیری داروی مرجع (RMP) :

ارزیابی ۴ تا ۶ سری ساخت از RMP برای تعیین محدوده طبیعی تغییرپذیری.

به‌منظور تعیین محدوده تغییرات طبیعی داروی مرجع (RMP) و درک علمی از نوسان ذاتی ویژگی‌های کیفی آن، لازم است ۴ تا ۶ سری ساخت مستقل از داروی مرجع که در تاریخ‌های مختلف تولید و ترجیحاً از سری‌های تجاری متفاوت تهیه شده‌اند، مورد بررسی آنالیزی قرار گیرند. این بررسی به تولیدکننده و رگولاتور امکان می‌دهد تا دامنه تغییرپذیری طبیعی ویژگی‌های کلیدی محصول مانند الگوی گلیکوزیلاسیون، بار ایزوالکتریک، میزان تجمع پروتئینی، و فعالیت زیستی را به‌طور کمی تعیین نمایند. داده‌های حاصل از این سری ساخت‌ها باید برای هر ویژگی کیفی (Quality Attribute) با روش‌های آماری مناسب — نظیر میانگین $\pm 3SD$ یا بازه اطمینان آماری ۹۵٪/۹۹٪ — (Tolerance Interval) تحلیل شوند تا محدوده پذیرش شباهت (Similarity Acceptance Range) تعریف گردد. در مرحله بعد، نتایج بیوسیمیلار باید درون این محدوده قرار گیرد تا از نظر آماری و بالینی مشابه تلقی شود. هر ویژگی‌ای که مقدار آن از محدوده تغییر طبیعی داروی مرجع خارج گردد، نیازمند تحلیل علمی، توجیه فنی، یا داده عملکردی تکمیلی (Functional Justification) است تا عدم قطعیت برطرف شود. در عمل توصیه می‌گردد معمولاً ۶ سری ساخت RMP از بازه‌های تولیدی ۱۲ تا ۱۸ ماهه برای محصولات پیچیده مانند آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (mAbs) بررسی می‌شود، در حالی که برای محصولات ساده‌تر مانند انسولین‌ها و G-CSF، بررسی ۴ سری ساخت کفایت دارد. این رویکرد، پایه تعریف محدوده‌های شباهت (Similarity Criteria) در ارزیابی آنالیزی محسوب شده و ابزار کلیدی برای تصمیم‌گیری علمی در مورد کفایت شباهت بیوسیمیلار با داروی مرجع است.

۴,۲,۵ قابلیت تولید پایدار بیوسیمیلار:

فرایند باید دارای راهبرد کنترل معتبر و تکرارپذیری سری ساخت به‌سری ساخت اثبات‌شده باشد.

اطمینان از اینکه فرایند نهایی مقیاس‌تجاری می‌تواند به‌صورت تکرارپذیر (Batch-to-Batch Reproducible)، محصولی در محدوده شباهت با RMP بسازد؛ به‌نحوی که CQAs همواره در حدود از پیش تعریف‌شده باقی بمانند و هر اختلاف جزئی، بی‌اهمیت بالینی باشد.

۴,۳ پروتکل ارزیابی شباهت (Similarity Assessment Protocol)

۱. فهرست QAs/CQAs و توجیه ارتباط هر ویژگی با PK/PD ایمنی.
۲. تعیین شرط و معیار شباهت برای هر ویژگی (کمی یا کیفی).
۳. طرح سری ساخت‌ها: تعداد، نوع و استقلال سری ساخت‌های RMP و بیوسیمیلار.
۴. اعتبارسنجی روش‌ها (حساسیت، صحت، دقت، LOQ/LOD، پایداری).
۵. هم‌ترازی محتوا و غلظت پروتئین در محصولات مقایسه‌شده.
۶. تعریف راهبرد برخورد با تفاوت‌ها و سناریوهای عبور/عدم عبور.
۷. طرح آماری و کنترل چندگانگی (Multiplicity Control).
۸. ردیابی کامل داده‌ها و مدیریت کیفیت اطلاعات.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۴,۴ سری ساخت و نمونه برداری (مطابق سیاست بومی کشور)

- ۴,۴,۱ استفاده از سری ساخت‌های مهندسی - **Engineering Batches** - : ارزیابی شباهت می‌تواند بر پایه ۴ تا ۶ سری ساخت مهندسی مستقل انجام شود، مشروط بر آن‌که فرایند و مشخصات آن‌ها با مقیاس تجاری همسان باشند.
- ۴,۴,۲ حجم نمونه مورد نیاز: حداکثر ۱۰٪ از حجم کل هر سری ساخت تجاری برای مطالعات آنالیزی کافی است.
- ۴,۴,۳ داروی مرجع (RMP): ۴ تا ۶ سری ساخت مستقل در طول عمر قفسه‌ای.
- ۴,۴,۴ اثبات مقایسه‌پذیری: داده‌های فرایندی باید نشان دهند CPP ها و CQAs تفاوت بالینی معنادار ندارند.
- ۴,۴,۵ شرایط نگهداری: نمونه‌ها باید طبق شرایط برچسب نگهداری شوند؛ هرگونه فرایند انجماد/ذوب باید ارزیابی اثر داشته باشد.
- ۴,۴,۶ مستندسازی: اطلاعات هر سری ساخت (کد، تاریخ، حجم، حمل و نقل، شرایط نگهداری) در پروتکل ثبت شود.

۴,۵ تحلیل‌های فنی و عملکردی

۱. استفاده از روش‌های مکمل برای ساختار مرتبه بالاتر (CD, FTIR, NMR).
۲. تحلیل واریانت‌های بار (CEX-HPLC, cIEF) و اندازه (SEC-MALS).
۳. ارزیابی گلیکوزیلاسیون (Sialylation, High-Mannose, Afucosylation).
۴. ارزیابی فعالیت زیستی (Binding + Cell-based assays, Fc function(ADCC, CDC, FCRn).
۵. بررسی ناخالصی‌ها و تجمع‌ها (Aggregates, Host Cell Proteins/DNA).
۶. تحلیل پایداری واقعی و تسریع شده طبق ICH Q1A/B.

۴,۶ برخورد با عدم قطعیت‌ها

۱. در صورت بروز تفاوت در QA ها، ابتدا اهمیت بالینی آن‌ها بر اساس MoA ارزیابی شود.
۲. اختلافات جزئی با داده‌های in vitro و تنظیم مشخصات (Specification) قابل توجیه و اثبات هستند.
۳. در صورت تفاوت در CQA بحرانی، اصلاح فرایند یا اجرای CES هدفمند الزامی است.
۴. منطق و شواهد تصمیم عبور/عدم عبور باید شفاف مستند شود

ارائه توجیه علمی برای حذف

در صورتی که متقاضی پیشنهاد حذف مطالعه بالینی مقایسه‌ای را مطرح نماید، موظف است توجیه علمی مکتوب (Scientific Justification) ارائه کند که در آن نشان داده شود عدم قطعیت‌های باقیمانده از طریق ارزیابی آنالیزی تطبیقی، مطالعه PK انسانی و ارزیابی ایمنوزنیسته به‌طور کافی برطرف شده‌اند و داده‌های موجود برای نتیجه‌گیری درباره نبود تفاوت بالینی معنادار کفایت دارد.

۴,۷ شرایط کفایت برای حذف CES

۱. MoA و روابط ساختار-عملکرد به‌خوبی درک شده باشد.
۲. بسته کیفیت جامع با روش‌های حساس و داده‌های نمایه‌سازی RMP ارائه شده باشد.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۳. پروتکل شباهت از پیش توافق شده با شرط و معیار مشخص اجرا شده باشد.

۴. مطالعه PK انسانی تطبیقی ($\pm$ PD) طراحی و انجام شده باشد.

✓ چک لیست اجرایی - ماده ۴

□ فهرست QAs/CQAs و ارتباط آن‌ها با MoA مشخص شده است.

□ روش‌های اورتوگونا (LC-MS, SEC, CEX, NMR) اعتبارسنجی شده‌اند.

□ پروتکل ارزیابی شباهت از پیش توافق شده و ثبت شده است.

□ ۴-۶ سری ساخت مهندسی مستقل تحلیل شده‌اند.

□ داده‌های RMP برای محدوده تغییرپذیری ارائه شده است.

□ راهبرد برخورد با تفاوت‌ها و تحلیل ریسک در پرونده ضمیمه شده است.

□ شرایط حذف CES احراز شده و در Summary گزارش شده است.

ماده ۵ - مطالعات انسانی: فارماکوکینتیک، ایمنی و ایمونوژنیسیته

۵,۱ اصل کلی

در بیوسیمیلارهایی که شباهت آنالیزی و عملکردی به‌خوبی اثبات شده است، ارزیابی انسانی صرفاً برای تأیید رفتار بالینی مشابه -

Clinical Confirmation of Similarity انجام می‌شود، نه برای بازتعریف اثربخشی یا ایمنی.

هدف این ماده، تعیین چارچوب حداقل مطالعات انسانی لازم است تا تصمیم حذف یا کاهش CES علمی، ایمن و قابل دفاع باشد.

۵,۲ طراحی مطالعه فارماکوکینتیک انسانی

۵,۲,۱ طراحی و جمعیت:

- طراحی متقاطع (Crossover) یا موازی (Parallel) با داوطلبین سالم، مگر آن‌که ملاحظات ایمنی اجازه ندهد.
- جمعیت متناسب با مسیر تجویز، دوز، و نیمه‌عمر دارو انتخاب شود.
- در داروهای با اثر طولانی، طراحی تک‌دوز کافی است.

۵,۲,۲ پارامترهای اصلی:

- **AUC** و **Cmax** به‌عنوان معیارهای اصلی شباهت PK.
- محدوده پذیرش آماری معمولاً ۸۰٪ تا ۱۲۵٪، مگر توجیه علمی دیگر ارائه شود.
- داده‌ها باید از نمونه‌گیری با فاصله زمانی کافی و روش آنالیز معتبر (مثلاً LC-MS/MS) به‌دست آید.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

۵,۲,۳ تطبیق محتوا:

غلظت پروتئین، بافر و سورفکتانت در فرآورده بیوسیمیلار و مرجع باید یکسان و در شرایط مشابه تزریق شوند تا سوگیری حذف گردد.

۵,۳ مطالعه فارماکودینامیک (PD) در صورت نیاز

در صورتی که شاخص PD معتبر (Validated Biomarker) وجود داشته باشد، می تواند به عنوان مکمل PK و جایگزین بخشی از CES مورد استفاده قرار گیرد. برای داروهای با شاخص های PD حساس (مثل G-CSF، انسولین، EPO)، ترکیب PK/PD می تواند کفایت شواهد را برای حذف CES اثبات کند.

۵,۴ ارزیابی ایمنی و ایمونوژنیسیته

۵,۴,۱ هدف: اثبات نبود تفاوت معنادار در بروز و شدت عوارض ناخواسته و پاسخ ایمنی.

۵,۴,۲ مطالعه ایمونوژنیسیته Immunogenicity Study:

- طراحی باید به گونه ای باشد که حساسیت آزمون (Assay Sensitivity) و پوشش زمانی مناسب برای تشخیص آنتی بادی های ضد دارو (ADA) و خنثی کننده (NAb) تضمین شود.
- روش ELISA یا Bridging Assay باید اعتبارسنجی شده باشد (حساسیت، اختصاصیت، ریکاوری، تداخل).

۵,۴,۳ پایش پس از بازار:

در صورت حذف CES، برنامه نظارت ایمنی پس از عرضه (Pharmacovigilance) باید تقویت و مبتنی بر ریسک طراحی شود.

۵,۵ کفایت برای حذف CES

در صورتی که موارد زیر برقرار باشند، مطالعات CES الزامی نیست:

۱. MoA به خوبی شناخته شده و عملکردها به طور کامل پوشش داده شده باشند.
۲. داده های آنالیزی، عملکردی و PK انسانی شباهت را بدون ابهام نشان دهند.
۳. اختلاف های کیفی مشاهده شده از نظر بالینی بی اهمیت باشند.
۴. مطالعه ایمنی/ایمونوژنیسیته تفاوت معناداری را نشان ندهد.

✓ چک لیست اجرایی – ماده ۵

- ☐ طراحی PK انسانی (Parallel یا Crossover) تأیید شده است.
- ☐ شاخص های PK (Cmax، AUC) در محدوده شباهت ۸۰-۱۲۵٪ قرار دارند.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

□ روش آنالیز LC-MS/MS معتبرسازی شده است.

□ داده‌های ایمونونویسیته (ADA/NAb) ارائه شده است.

□ در صورت وجود شاخص PD، نتایج PD-PK تطبیق داده شده‌اند.

□ برنامه Pharmacovigilance پس از عرضه تدوین شده است.

□ تصمیم حذف CES با منطق علمی و داده کافی مستند شده است.

ماده ۶ - تصمیم‌گیری نهایی، برچسب‌گذاری و تغییرات پس از ثبت

۶،۱ تصمیم‌گیری نهایی

۶،۱،۱ تصمیم بر پایه مجموع شواهد - **Totality of Evidence** - اتخاذ می‌شود.

۶،۱،۲ داده‌های آنالیزی و عملکردی ستون اصلی تصمیم هستند؛ داده‌های انسانی ابزار تأییدی محسوب می‌شوند.

۶،۱،۳ در صورت هم‌ترازی کامل بسته کیفیت و داده‌های PK انسانی، تأیید بدون CES ممکن است.

۶،۲ برچسب‌گذاری (Labelling)

۶،۲،۱ بیوسیمیلار باید همان نام ژنریک بین‌المللی (INN) را با داروی مرجع داشته باشد.

۶،۲،۲ محتوای برچسب باید نشان دهد که محصول بیوسیمیلار است و بر اساس مطالعات مقایسه‌ای تأیید شده است.

۶،۲،۳ اطلاعات بالینی از داروی مرجع قابل استفاده است مگر داده‌ای متناقض وجود داشته باشد.

۶،۳ تغییرات پس از ثبت (Post-Approval Changes)

۶،۳،۱ هرگونه تغییر در فرآیند تولید، مواد اولیه یا محل تولید باید تحت چارچوب **Comparability (ICH Q5E)** ارزیابی شود.

۶،۳،۲ در صورت نشان دادن شباهت آنالیزی و عملکردی، نیازی به مطالعات جدید انسانی نیست.

۶،۳،۳ در موارد اختلاف کیفی جدید یا ریسک ایمونونویسیته، انجام PK انسانی مجدد توصیه می‌شود.

۶،۴ بازنگری و به‌روزرسانی راهنما

این راهنما را با توجه به تحولات علمی و رهنمودهای جدید EMA، WHO و FDA حداقل هر سه سال یک‌بار بازنگری نماید.

✓ چک‌لیست اجرایی - ماده ۶

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

□ تصمیم‌گیری نهایی مبتنی بر مجموع شواهد انجام شده است.

□ برچسب با INN مشترک و توضیح بیوسیمیلار تنظیم شده است.

□ چارچوب Comparability برای تغییرات پس از ثبت تدوین شده است.

□ مکانیزم بازنگری راهنما تعیین شده است.

□ سند Pharmacovigilance فعال است و ریسک ایمنی‌نویسیته پایش می‌شود.

پیوست‌ها

■ پیوست A - دسته‌بندی سطح پیچیدگی محصولات زیستی

نیازمندی کلیدی	نوع محصول	سطح پیچیدگی
کفایت بسته آنالیزی PK + انسانی، حذف CES ممکن	انسولین‌ها، فاکتورهای انعقادی	پایین
نیاز به PK + PD انسانی محدود، CES قابل حذف با توجیه	mab, EPO, G-CSF، ساده تا متوسط	متوسط
حذف CES فقط در صورت شواهد بسیار قوی کیفیت و PK	mAbهای پیچیده، پروتئین‌های فیوژن	بالا

از منظر ارزیابی بیوسیمیلار، آنتی‌بادی‌ها بر اساس ماهیت مکانیسم اثر (MoA) و نقش عملکردهای Fc به سه دسته ساده، متوسط، پیچیده طبقه‌بندی می‌شوند.

❖ پیچیدگی پایین: (Low Complexity; Single-Mechanism / Fc-independent)

ویژگی: مکانیسم اثر یگانه و روشن (مهار مستقیم لیگاند/گیرنده)، نقش Fc در اثربخشی بالینی حداقلی یا غیرمحموری؛ حساسیت اصلی به شباهت در Binding/Neutralization.

پیامد برای بیوسیمیلار:

با بسته آنالیزی قوی + بیوتست‌های هدف‌محور PK + انسانی، حذف CES عموماً قابل دفاع است (در نبود اختلاف CQA بحرانی).
نمونه‌ها:

- Adalimumab ضد TNF- α
- Bevacizumab ضد VEGF-A
- Ranibizumab ضد VEGF-A؛ نسخه Fab
- Ustekinumab ضد IL-12/23 p40
- Omalizumab ضد IgE
- Eculizumab ضد C5

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- **Denosumab** ضد RANKL
- **Secukinumab** ضد IL-17A
- **Ixekizumab** ضد IL-17A
- **Dupilumab** ضد IL-4Rα؛ مهار سیگنال IL-4/IL-13

نکته ارزیابی:

برای این گروه، تأکید بر **Orthogonal Binding Assays**، سنجش **Neutralization** در سلول/سیگنالینگ، و هم‌راستایی **Potency Curve (EC50/Emax)** با مرجع؛ نقش FcRn بر نیمه‌عمر ارزیابی شود، اما عملکردهای افکتوری (ADCC/CDC) معمولاً تعیین‌کننده نیستند مگر با توجیه محصول محور.

❖ پیچیدگی متوسط: **(Moderate Complexity; Fc-modulated / Multi-pathway but delineated)**

ویژگی: مکانیسم اثر روشن است اما نقش **Fc** یا مسیرهای ثانویه می‌تواند به پاسخ بالینی کمک کند (مثلاً بخشی از اثر ناشی از **ADCC/CDC** یا بافت‌ویژه است).

پیامد برای بیوسیمیلار:

بسته آنالیزی باید علاوه بر **Binding/Neutralization**، پروفایل **Fc** و گلیکوزیلاسیون را هم‌راستا نشان دهد؛ **PK انسانی** ضروری، **PD محدود/هدف‌محور** در برخی محصولات مفید است؛ حذف **CES** قابل طرح اما مشروط به قوت شواهد.

نمونه‌ها:

- **Infliximab** ضد TNF-α؛ IgG1 با نقش Fc نسبی
- **Trastuzumab** ضد HER2؛ ترکیب مهار سیگنال + افکتور Fc در برخی بافت‌ها
- **Rituximab** ضد CD20؛ نقش **ADCC/CDC** قابل توجه اما قابل مدیریت در بسته آنالیزی قوی
- **Tocilizumab** ضد IL-6R
- **Natalizumab** ضد α4-integrin؛ بافت‌هدف‌دار
- **Vedolizumab** ضد α4β7 integrin؛ بافت‌ویژه روده

نکته ارزیابی: برای این گروه، علاوه بر آزمون‌های هدف‌محور، **FcγR binding panel**، **ADCC/CDC** (در صورت ربط به **MoA**)، و **Spec**های گلیکان (**Afucosylation/High-mannose**) باید از پیش تعریف و هم‌راستا با **RMP** نگه داشته شوند. اختلاف پایدار در **Fc-effector readouts** بدون اصلاح فرایند پذیرفتنی نیست.

❖ پیچیدگی بالا:

(High Complexity; Multi-mechanistic / Engineered / Immuno-modulatory)

ویژگی: چند مکانیسم اثر همزمان، نقش محوری **Fc-effector** یا ساختارهای مهندسی‌شده (**Bispecific/Fusion/ADC**)؛ حساسیت بالا به تغییرات ریز در **CQAs** (گلیکان، بار، **HOS**).

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

پیامد برای بیوسیمیلار :

حذف CES به سادگی قابل دفاع نیست؛ معمولاً داده انسانی (PD یا CES هدفمند) لازم است.

نمونه‌ها :

- **Daratumumab, Obinutuzumab** (افکتور Fc قوی)
- **Checkpoint inhibitors: Pembrolizumab- Nivolumab- Atezolizumab** (ایمونومدولاسیون پیچیده)
- **Emicizumab** (FVIIa-mimetic; Bispecific)
- **Blinatumomab** (Bispecific T-cell engager; BiTE)
- **Trastuzumab-emtansine (T-DM1)**، سایر ADCها

نکته ارزیابی :

در این دسته، **Structure-Function mapping** باید دامنه دار و چند وجهی باشد (HOS: HDX-MS/NMR, FcγR, Immune cell co-culture, panels). حتی با هم‌خوانی آنالیزی، برای تصمیم بالینی، داده انسانی تکمیلی معمولاً ضروری است. برای دسته ساده: **PK + Binding/Neutralization Potency panel** انسانی کفایت دارد؛ PD در صورت وجود بیومارکر پذیرفته شده توصیه می‌شود.

برای دسته متوسط: علاوه بر موارد فوق، **Fc-function battery** (FcγRIIa/IIIa, ADCC/CDC/ADCP) و **Specهای** گلیکان باید هم‌راستا با RMP بررسی شوند.

برای دسته پیچیده: طراحی بالینی متناسب (PK/PD هدفمند) از ابتدا پیش‌بینی شود؛ اتکای صرف به تحلیل کیفی پذیرفتنی نیست و در صورت نیاز CES بایستی کاملاً انجام گردد.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

پیوست B - ساختار پروتکل ارزیابی شباهت

۱. هدف و دامنه

در این بخش باید هدف کلی و محدوده کاربرد پروتکل به صورت روشن بیان شود. هدف معمولاً «اثبات شباهت کیفی، ساختاری و عملکردی بیوسیمیلار با داروی مرجع» است و دامنه شامل نام محصول، ماده مؤثره (INN)، شکل دارویی، غلظت، مسیر تجویز و بازار هدف خواهد بود. همچنین باید مشخص شود که این پروتکل صرفاً برای ارزیابی آنالیزی و عملکردی است یا شامل داده‌های PK انسانی نیز می‌شود. در پایان این بخش، انتظار تصمیم نهایی (تعیین عبور یا عدم عبور از شباهت و نیاز یا عدم نیاز به CES) ذکر می‌گردد.

۲. فهرست QAs و CQAs

در این بخش فهرستی از کلیه ویژگی‌های کیفی دارو شامل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، ساختاری و عملکردی درج می‌شود. هر ویژگی باید بر اساس میزان ارتباط آن با مکانیسم اثر (MoA)، فارماکوکینتیک (PK)، ایمنی و ایمونوژنیسیته، در یکی از سطوح «بحرانی، مهم یا غیربحرانی» طبقه‌بندی شود. برای هر CQA باید دلیل بحرانی بودن، روش اندازه‌گیری و حدود پذیرش پیشنهادی به صورت مستند آورده شود. این فهرست مبنای طراحی آزمون‌ها و تصمیم‌های بعدی در ارزیابی شباهت است.

۳. روش‌های آنالیزی (Orthogonal)

در این بخش باید روش‌های آزمایشگاهی مورد استفاده برای بررسی هر ویژگی کیفی معرفی شوند. اصل راهنما این است که هر ویژگی بحرانی با حداقل دو روش مکمل (Orthogonal) ارزیابی شود تا اطمینان از صحت داده‌ها افزایش یابد. برای مثال، ساختار اول با LC-MS/MS، Peptide Mapping، LC-MS، ساختار سوم با CD، FTIR یا NMR، و گلیکوزیلاسیون با HILIC-FLR و LC-MS تحلیل می‌شود. روش‌ها باید بتوانند تفاوت‌های ظریف را آشکار کنند و در صورت مشاهده اختلاف، امکان ارزیابی مجدد یا انجام آزمون عملکردی تکمیلی فراهم باشد.

۴. شرط و معیار شباهت برای هر ویژگی

در این بخش، برای هر ویژگی کیفی باید دو مفهوم تعریف شود:

الف) شرط شباهت، یعنی توصیف کیفی یا عددی محدوده‌ای که نتایج بیوسیمیلار باید در آن قرار گیرد (مثلاً در محدوده تغییر طبیعی RMP یا اختلاف کمتر از ۱۰٪ از میانگین RMP).

ب) معیار شباهت، یعنی روش تصمیم‌گیری آماری یا آنالیزی که بر اساس آن تعیین می‌شود آیا شباهت برقرار است یا خیر. به عنوان نمونه، برای داده‌های کمی ممکن است از تحلیل فاصله اطمینان ۹۰٪ (90% CI) در محدوده ۰٫۸ تا ۱٫۲۵ استفاده شود، و برای داده‌های پروفایلی از معیار «عدم ظهور گونه جدید بحرانی» بهره گرفته شود.

در این بخش همچنین باید روش کنترل چندگانگی (Multiplicity) مشخص شود تا خطر خطای آماری کاهش یابد.

۵. طراحی و تعداد سری ساخت‌ها (Biosimilar و RMP)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

برای داروی مرجع (RMP) باید حداقل ۴ تا ۶ سری ساخت مستقل از تاریخ‌های مختلف تولید انتخاب شود تا محدوده تغییرپذیری طبیعی آن مشخص گردد. برای بیوسیمیلار نیز معمولاً ۴ تا ۶ سری ساخت مهندسی، مشروط به هم‌فرایند بودن با تولید صنعتی، کافی است. استفاده از سری ساخت‌های مهندسی با فرآیند مشابه به‌جای سری ساخت‌های تجاری مجاز است، مشروط بر آنکه فرآیند، تجهیزات و مواد اولیه مشابه باشند. در پایان باید حجم نمونه‌گیری (معمولاً حداکثر ۱۰٪ حجم هر سری ساخت) و روش اطمینان از نمایندگی کل سری ساخت توصیف شود.

۶. برنامه اعتبارسنجی روش‌ها

این بخش شامل مستندات اعتبارسنجی تمامی روش‌های آنالیزی و عملکردی است. برای هر روش باید ویژگی‌هایی مانند صحت، دقت، تکرارپذیری، حساسیت (LOD/LOQ)، محدوده اندازه‌گیری، پایداری و گزینش‌پذیری مشخص شود. برای آزمون‌های زیستی و سلولی، ارزیابی موازی بودن (Parallelism) منحنی‌ها و کفایت کنترل‌های مثبت و منفی الزامی است. اطمینان از کفایت System Suitability پیش از هر نوبت آزمون نیز باید در پروتکل ثبت گردد.

۷. طرح آماری و کنترل چندگانگی

باید نوع داده (پیوسته، رتبه‌ای یا اسمی)، آزمون آماری انتخاب‌شده (مثلاً Student t-test یا Two One-Sided Test)، سطح اطمینان (Confidence Interval) و سطح خطا (α و β) مشخص گردد. در صورت وجود آزمون‌های متعدد برای ویژگی‌های مختلف، باید روش کنترل چندگانگی (مثل Bonferroni یا Holm) بیان شود تا از افزایش خطای نوع اول جلوگیری شود. همچنین باید سیاست برخورد با داده‌های خارج محدوده (Outliers) و تحلیل حساسیت (Sensitivity Analysis) از پیش تعیین گردد.

۸. تحلیل ریسک تفاوت‌ها

در این بخش، نحوه برخورد با اختلاف‌های احتمالی بین بیوسیمیلار و RMP توضیح داده می‌شود. هر اختلاف مشاهده‌شده باید از نظر منشاء (فرآیندی، آنالیزی یا محصولی) بررسی شود و اثر بالقوه آن بر ایمنی، اثربخشی یا فارماکوکینتیک ارزیابی گردد. در صورت بی‌اهمیت بودن تفاوت، توجیه علمی و عملکردی کافی است؛ در غیر این صورت باید اقدامات اصلاحی یا آزمون‌های تکمیلی (مانند Functional Test، اصلاح فرآیند یا مطالعه PK انسانی محدود) طراحی گردد. همچنین لازم است مسئول تصمیم‌گیری نهایی و معیار پذیرش تفاوت‌ها در این بخش تعریف شود.

۹. گزارش انحرافات و تصمیم عبور/عدم عبور

در پایان پروتکل، باید فرآیند ثبت، تحلیل و تصمیم‌گیری در مورد انحرافات (Deviation) و نتایج آزمون‌ها بیان شود. هر انحراف باید مستندسازی و طبقه‌بندی شود (جزئی، عمده، بحرانی) و اقدامات اصلاحی و پیشگیرانه (CAPA) تعریف گردد. سپس برای هر ویژگی کیفی، نتیجه نهایی در قالب تصمیم عبور (Pass) یا عدم عبور (Fail) ثبت می‌شود. همراه با منطق علمی. در مواردی که اختلاف معنادار مشاهده می‌شود، مسیر تصمیم باید مشخص باشد — مانند انجام مطالعه عملکردی هدفمند، اصلاح فرآیند، یا در نهایت اجرای CES محدود برای رفع عدم قطعیت.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

پیوست C - معیارهای حذف یا کاهش CES

پیش شرط	توضیح
شباهت آنالیزی و عملکردی کامل	تفاوت‌های کیفی بی‌اهمیت بالینی
MoA شناخته شده و قابل توصیف	ارتباط ساختار-عملکرد واضح
مطالعه PK انسانی معتبر	محدوده ۸۰-۱۲۵٪ برای Cmax و AUC
ایمونونسیسته مشابه	بدون تفاوت معنادار در ADA/NAb
داده‌های ایمنی قابل قیاس	عوارض مشابه از نظر شدت و بروز

پیوست D - تفسیر بخش سوم راهنمای

biosimilar Reflection paper on a tailored clinical approach in development

Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product: Updated Recommendations for Assessing the Need for Comparative Efficacy Studies

سند «Reflection Paper on a Tailored Clinical Approach in Biosimilar Development» (انتشار EMA):
 (۲۰۲۵) یک چارچوب نوین برای توسعه و ارزیابی بیوسیمیلارها ارائه می‌دهد. تمرکز این سند بر بحث‌های مربوط به کیفیت (Quality) است که به تشریح شیوه مقایسه جامع ویژگی‌های کیفی محصول زیستی مرجع و بیوسیمیلار می‌پردازد. این پیوست (پیوست D) به شکل مرحله‌به‌مرحله، بخش سوم سند مربوطه را با زبانی ساده اما دقیق توضیح می‌دهد. همچنین مفاهیم کلیدی به فارسی برگردانده شده و تفاوت‌های رویکرد EMA و FDA در ارزیابی شباهت تحلیل شده است. هدف این راهنما فراهم کردن یک مرجع عملی است تا در تهیه و بررسی پرونده‌های بیوسیمیلار به کار گرفته شود.

1. مبانی و پیشینه کلی (General Basis and Background)

اصل ساختار-عملکرد: در فارماکولوژی یک اصل پذیرفته شده وجود دارد که «ساختار تعیین کننده عملکرد است». به بیان دیگر، اگر ساختار یک ماده فعال (خواه یک مولکول کوچک مثل پاراستامول یا یک پروتئین بزرگ مثل آنتی‌بادی مونوکلونال) ثابت بماند، عملکرد زیستی و اثربخشی آن نیز ثابت خواهد ماند. این اصل به محصولات زیستی نیز گسترش یافته است: اگر دو پروتئین ساختاری یکسان یا

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

بسیار مشابه داشته باشند، با گیرنده‌های یکسان به همان نحو کمی اتصال یافته و در نتیجه هم‌اثری (efficacy) و هم‌ایمنی یکسانی خواهند داشت. این موضوع پایه علمی مفهوم «بیوسیمیلار» است.

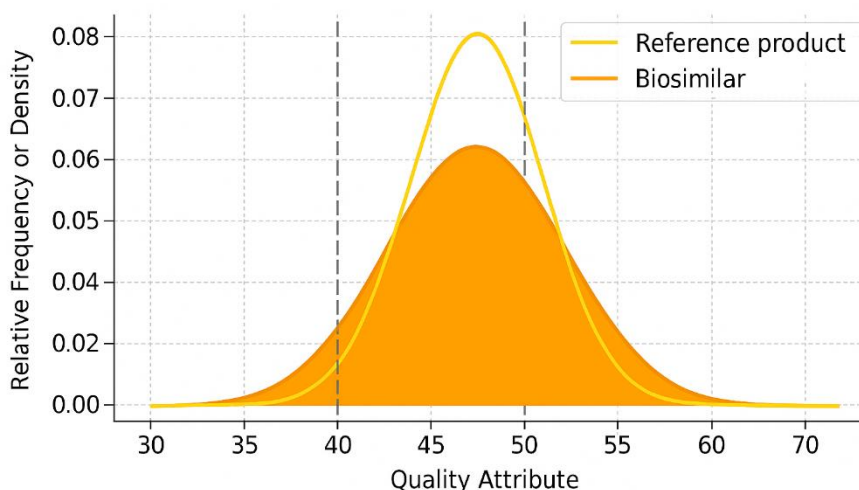
مفهوم Comparability قابلیت مقایسه: حدود ۳۰ سال پیش، با چالش تغییرات فرایند ساخت محصولات زیستی، مفهوم مطالعه مقایسه‌ای (comparability exercise) شکل گرفت. راهنمای ICH Q5E واژه **قابل قیاس (comparable)** را چنین تعریف می‌کند: «نتیجه‌گیری‌ای که طی آن محصولات قبل و بعد از تغییرات ساخت، از نظر ویژگی‌های کیفی به‌شدت مشابه بوده و هیچ تأثیر نامطلوبی بر ایمنی یا اثربخشی (از جمله ایمنی‌زایی) محصول نهایی مشاهده نشود». نکته مهم در این تعریف آن است که لزومی ندارد تمام ویژگی‌های کیفی دو محصول کاملاً یکسان باشند؛ بلکه بسیار مشابه بودن کافی است، مشروط بر این که دانش موجود نشان دهد تفاوت‌های جزئی، اثر نامطلوبی بر ایمنی و اثربخشی ندارند. به بیان ساده، وجود اختلافات کیفی جزئی قابل قبول است به شرط آن که از نظر بالینی بی‌اهمیت باشند. این مفهوم طی دهه‌های اخیر بسیار موفق بوده و به سازندگان اجازه داده است تا بدون انجام مطالعات بالینی غیرضروری، تغییرات عمده‌ای را در فرایند تولید زیست‌داروها اعمال کنند. برای مثال، تعویض بانک سلولی اصلی (Master Cell Bank) یک محصول زیستی - که از منظر علمی وضعیتی مشابه تولید یک بیوسیمیلار دارد - تنها با یک مطالعه مقایسه‌ای جامع کیفی انجام شده و نیازی به تکرار کارآزمایی بالینی نبوده است.

بیوسیمیلار و Comparability: ارزیابی شباهت یک بیوسیمیلار مبتنی بر همان اصول علمی ارزیابی تغییرات تولید یک محصول زیستی است. در واقع، تصریح می‌کند که باید شواهد مقایسه‌ای کافی ارائه شود تا ایمنی و اثربخشی مشابه بیوسیمیلار نسبت به محصول مرجع اثبات گردد یا با استدلال علمی توجیه شود. این بدان معناست که داده‌های کیفی (آنالیتیک) نقشی محوری در اثبات شباهت دارند و اگر از منظر کیفیت و فارماکوکینتیک تشابه کافی نشان داده شود، می‌توان از برخی مطالعات بالینی چشم‌پوشی کرد.

ویژگی‌های کیفی مشابه (Similar Analytical Quality Attributes): در ارزیابی بیوسیمیلار، به مجموعه ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و زیستی محصول که باید بسیار نزدیک به محصول مرجع باشند، ویژگی‌های کیفی مشابه گفته می‌شود. برخلاف داروهای کوچک‌مولکول که هویت شیمیایی یکسان دارند، در زیست‌داروها تنوع ذاتی وجود دارد؛ دو سری تولید ممکن است تفاوت‌های کوچکی مثلاً در میزان انواع زنجیره‌های قندی، الگوی بار الکتریکی پروتئین، میزان تجمعات و غیره داشته باشند. رویکرد سنتی در گذشته، اصرار بر انجام مطالعه اثربخشی بالینی برای هر تفاوت بود. اما رویکرد نوین (براساس ICH Q5E و راهنمای بیوسیمیلار (این است که اگر این تفاوت‌های آنالیزی نشان دهند که بر عملکرد بالینی اثر نمی‌گذارند، نیازی به مطالعات بالینی اضافه نیست. به عبارت دیگر، داده‌های آنالیزی قوی می‌توانند جایگزین بخشی از داده‌های بالینی شوند. البته اگر تفاوت بزرگ و معنی‌داری مشاهده شود که بالقوه بر اثربخشی یا ایمنی اثر دارد، آن وضعیت دیگر «مشابه» محسوب نشده و ممکن است حتی با انجام مطالعه بالینی (CES) هم جبران نشود.

شکل زیر مفهوم «بازه جمعیتی مرجع و قرارگیری جمعیت بیوسیمیلار در آن» را به صورت شماتیک نشان می‌دهد که چگونه ویژگی‌های کیفی بیوسیمیلار باید در محدوده تغییرات طبیعی محصول مرجع باقی بماند:

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری



Hypothetical distribution of a quality attribute in the reference product (yellow curve) and biosimilar (orange curve), illustrating the “population within the population” similarity requirement

نمودار توزیع فرضی یک ویژگی کیفی در محصول مرجع (منحنی زرد) و بیوسیمیلار (منحنی نارنجی) که محدوده تغییرپذیری طبیعی محصول مرجع (بین دو خط چین خاکستری) را نشان می‌دهد. شرط شباهت «جمعیت درون جمعیت» ایجاب می‌کند درصد معینی از توزیع بیوسیمیلار (ناحیه نارنجی پررنگ) به طور کامل در محدوده توزیع مرجع قرار گیرد. در این مثال فرضی، تقریباً کل منحنی بیوسیمیلار در محدوده مرجع است که نشان‌دهنده شباهت قابل قبول می‌باشد.

2. پیش‌نیازهای ارزیابی شباهت (Prerequisites for Similarity Assessment)

پیش از آغاز ارزیابی تطبیقی میان بیوسیمیلار و محصول مرجع، باید برخی شرایط اساسی برقرار باشد. اصول علمی مطالعه مقایسه‌ای یک بیوسیمیلار مبتنی بر اصولی است که برای ارزیابی تأثیر تغییرات فرایند ساخت یک محصول زیستی به کار می‌رود (ICH Q5E). همچنین تأکید شده که «ایمنی و اثربخشی مقایسه‌ای بیوسیمیلار نسبت به محصول مرجع باید اثبات یا توجیه گردد». با در نظر گرفتن این چارچوب، الزامات زیر به عنوان پیش‌نیازهای یک برنامه موفق ارزیابی شباهت شناخته می‌شوند:

- **شناخت کامل سازوکار اثر (MoA):** باید دانش علمی جامعی در مورد مکانیسم عملکرد مولکول و ارتباط ساختار و عملکرد آن وجود داشته باشد. این دانش کمک می‌کند ویژگی‌های کیفی بحرانی (CQAها) که بر کارایی یا ایمنی اثرگذارند شناسایی شوند.
- **قابلیت آنالیز دقیق ساختار و عملکرد:** روش‌های آنالیزی پیشرفته و چندبُعدی (Orthogonal) باید در دسترس باشند تا بتوان جزئیات ساختاری و عملکردی مولکول را با دقت بالا تعیین کرد. هر ویژگی کیفی مهم باید با یک یا دو روش مکمل اندازه‌گیری شود تا اطمینان حاصل گردد که تفاوتی پنهان نمانده است.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- **وجود آزمون‌های عملکرد زیستی (In Vitro Bioassays):** آزمون‌های زیستی قابل اعتماد (مثلاً آزمون‌های اتصال به گیرنده یا آزمون‌های سلولی برای سنجش قدرت اثر) باید فراهم باشند تا مقایسه عملکرد بیولوژیک بیوسیمیلار و مرجع ممکن شود. این آزمون‌ها به‌طور مستقیم قدرت اثر و عملکرد مولکول را می‌سنجند و حتی می‌توانند به عنوان شاخص‌های غیرمستقیم برای شباه ساختاری عمل کنند (چرا که اگر ساختار مولکول تفاوت کرده باشد، معمولاً در عملکرد in vitro منعکس می‌شود).
- **فرایند تولید پایدار و قابل تکرار:** باید یک فرایند تولید صنعتی تعریف شود که به‌طور مستمر محصولی با کیفیت بسیار مشابه محصول مرجع (RMP) تولید کند. سیستم کنترل کیفی فرایند (کنترل مواد اولیه، شرایط فرایند، آزمون‌های حین تولید و محصول نهایی) باید به نحوی برقرار باشد که یکنواختی سری ساخت‌ها تضمین گردد و هر سری ساخت خارج از مشخصات، پیش از رسیدن به بیمار حذف شود. به عبارتی، اگر فرایند تولید بیوسیمیلار نتواند خودبه‌خود محصولی سازگار و مشابه تولید کند، مقایسه با مرجع نیز بی‌معنی خواهد بود.
- **وجود پروتکل مدون برای ارزیابی شباهت:** پیش از شروع مطالعات مقایسه‌ای اصلی، باید پروتکل جامعی طراحی و مکتوب شده باشد که از ابتدا تمامی جنبه‌های ارزیابی شباهت را مشخص کند.

با فراهم بودن موارد فوق، می‌توان امید داشت که مطالعه مقایسه‌ای آنالیزی (شامل داده‌های گسترده in vitro و فارماکوکینتیک انسانی) قادر باشد نشان دهد هیچ تفاوت معناداری در ساختار و سایر ویژگی‌های کیفی میان بیوسیمیلار و مرجع وجود ندارد و اثرات فارماکولوژیک کلیدی نیز هم‌ارز هستند. در این حالت اثربخشی و ایمنی مشابه را می‌توان از این شباهت استنباط کرد، بدون آن که حتماً نیاز به مطالعه بالینی بزرگ (مطالعه CES) باشد.

از سوی دیگر، نقش داده‌های بالینی در سناریوی بیوسیمیلار بازتعریف شده است. طبق راهنمای EMA: هدف از داده‌های بالینی، برطرف کردن عدم قطعیت‌های جزئی باقی‌مانده از مراحل قبلی (آنالیزی و غیربالینی) و تأیید عملکرد بالینی مشابه است. داده‌های بالینی نمی‌توانند تفاوت‌های اساسی در ویژگی‌های کیفی را توجیه کنند. با این حال، در مواردی که مکانیزم اثر یا رابطه ساختار-عملکرد به‌خوبی درک نشده، ممکن است هنوز به انجام مطالعه CES نیاز باشد. نکته مهم این است که مطالعات اثربخشی نباید به عنوان راهی برای پوشاندن کم‌کاری‌ها در بخش کیفیت استفاده شوند. اگر تفاوت بزرگی در کیفیت وجود دارد، اصولاً آن محصول نمی‌تواند به عنوان بیوسیمیلار پذیرفته شود مگر آن که با تغییرات فرایند، آن تفاوت رفع گردد.

خلاصه‌ای از ارزیابی ریسک ویژگی‌های کیفی: پس از شناسایی ویژگی‌های کیفی (QAها)، باید یک ارزیابی علمی ریسک انجام شود تا مشخص گردد کدام ویژگی‌ها بحرانی هستند (QAها) و تغییر در هر کدام تا چه اندازه می‌تواند بر عملکرد بالینی اثر بگذارد. برای این کار از دانش پیشین درباره مولکول و فرآورده مرجع استفاده می‌شود (مثلاً می‌دانیم اتصال به گیرنده معینی عامل اثربخشی اصلی است، یا تجمعات پروتئینی می‌توانند ایمنی‌زایی را افزایش دهند). این پیش‌دانش مشخص می‌کند کدام آزمون‌ها و خواص را باید بحرانی در نظر بگیریم. به عنوان مثال:

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- تعامل دارو با گیرنده‌ها/هدف‌ها (مثلاً اتصال به رسپتورهای سطح سلول یا لیگاندها) اساس بسیاری از اثرات بیولوژیک است. بنابراین ویژگی‌هایی که این تعاملات را تحت تأثیر قرار می‌دهند مثل ساختار جایگاه اتصال یا الگوهای گلیکوزیلاسیون در جایگاه‌های مربوط به گیرنده Fc بحرانی محسوب می‌شوند.
- همیشه نمی‌توان برای هر CQA یک ارتباط کمی مستقیم با اثر بالینی یافت؛ چون اثربخشی نتیجه مجموع چندین عامل کیفی است. در این موارد، همان‌طور که EMA اشاره کرده، باید مجموعه ویژگی‌ها را به صورت کل‌نگر ارزیابی کرد و قضاوت را بر پایه کل داده‌های آنالیزی گذاشت.

پس از ارزیابی اولیه ریسک، رتبه‌بندی میزان بحرانی بودن هر ویژگی انجام می‌شود. این رتبه‌بندی (که می‌تواند همسو با راهنمای ICH Q9 در مورد مدیریت ریسک کیفیت باشد) مشخص می‌کند کدام ویژگی‌ها در اولویت بررسی دقیق‌تر قرار دارند. مثلاً در یک آنتی‌بادی مونوکلونال، فعالیت اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن یا گیرنده Fc یک CQA ریسک-بالا (Tier 1) است، در حالی که یک ویژگی مثل مقدار جزئی از یک ناخالصی فرایندی ممکن است Tier 3 (کم‌خطر) در نظر گرفته شود.

3. پروتکل ارزیابی شباهت (Similarity Assessment Protocol)

توسعه یک محصول زیستی فرایندی مرحله‌ای و تکرارشونده (iterative) است. به این معنا که ابتدا کار بر اساس دانش اولیه (مثلاً اطلاعاتی که از محصول مرجع منتشر شده یا مطالعات اکتشافی خود شرکت به دست آمده) شروع می‌شود؛ سپس در حین توسعه، با کسب اطلاعات جدید ممکن است طرح‌ها اصلاح شوند و مطالعات لازم دقیق‌تر مشخص گردند. برای اطمینان از این‌که ارزیابی نهایی شباهت کاملاً دقیق و قوی خواهد بود، EMA تأکید می‌کند که باید از همان ابتدا یک پروتکل مدون برای ارزیابی شباهت تدوین گردد و پیش از آغاز مطالعات محوری نهایی، این پروتکل مورد توافق قرار گیرد. حتی توصیه شده که شرکت‌ها از مشاوره علمی EMA استفاده کنند تا پیش از اجرای آزمایش‌های نهایی، بر سر پروتکل و طراحی آن توافق حاصل شود.

اجزای کلیدی پروتکل شباهت: پروتکل باید همه بخش‌های مهم آنالیز مقایسه‌ای را پوشش دهد. جدول زیر برخی اجزای کلیدی یک پروتکل ارزیابی شباهت و توضیح هر کدام را فهرست کرده است:

مؤلفه پروتکل ارزیابی شباهت	توضیحات و ملاحظات
تعداد سری ساخت‌های محصول مرجع (RMP)	باید مشخص شود چند سری ساخت مختلف از RMP در آنالیز استفاده می‌شود و برنامه نمونه‌برداری چگونه است. هر چه تنوع ذاتی و واریانس صفات بیشتر باشد، به تعداد بیشتری سری ساخت نیاز است. سری ساخت‌های مرجع باید تحت شرایط توصیه‌شده نگهداری شوند و در طول عمر قفسه‌ای (shelf-life) آزمون شوند.
تعداد و نوع سری ساخت‌های بیوسیمیلار	تعداد سری ساخت‌های بیوسیمیلار ذکر شود. تأکید بر استفاده از سری ساخت‌های تولیدی در مقیاس تجاری است. سری ساخت‌هایی که در مطالعه بالینی PK/PD استفاده شده‌اند و سری ساخت‌های تولید در مقیاس پایین (توسعه‌ای) در صورت نیاز می‌توانند گنجانده شوند، اما تنها در صورتی که نشان داده شود آن سری ساخت‌های توسعه‌ای کاملاً با فرایند تجاری قابل

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

مقایسه‌اند. استفاده ناسری ساختا از سری ساخت توسعه ممکن است عدم قطعیت ایجاد کند، لذا باید با احتیاط عمل شود.	
پروتکل باید فهرست جامع ویژگی‌های مقایسه‌شونده را به همراه دلیل اهمیت هر کدام ارائه کند. باید مشخص شود هر QA تا چه حد بحرانی است و آیا ارتباط شناخته‌شده‌ای با پارامترهای بالینی دارد) مثلاً یک QA مرتبط با مشخصه‌های فارماکوکینتیک یا ایمنی‌زایی است. (این بخش نشان می‌دهد تیم توسعه درک روشنی از CQA های محصول دارد.	فهرست ویژگی‌های کیفی (QAs) و دلایل انتخاب
باید "شرط شباهت" برای هر نوع ویژگی به‌طور دقیق تعریف شود و دامنه/معیار پذیرش برای آن ذکر گردد. همچنین استراتژی کلی تحلیل (مثلاً استفاده از رویکرد آماری معین یا تعیین حدود پذیرش مبتنی بر داده‌های مرجع) باید تبیین شود.	شرط شباهت و معیارهای پذیرش
تمامی روش‌های آزمایشگاهی (فیزیکی/شیمیایی و زیستی) که برای مقایسه به کار می‌روند باید فهرست شوند. درجه اعتبارسنجی یا کالیبراسیون هر روش مشخص گردد) مثلاً آیا روش طبق استانداردهای GLP/GMP تأیید شده است؟ (همچنین باید فهرست آزمون‌های زیستی in vitro که انجام خواهد شد (مانند انواع بیواسی‌ها: آزمون اتصال، آزمون عملکرد سلولی، سنجش قدرت اثر) ارائه شود.	روش‌های آنالیزی و وضعیت اعتبارسنجی آن‌ها
پروتکل باید توضیح دهد اگر در طی مقایسه یک تفاوت مشاهده شد چه اقدامی صورت می‌گیرد. مثلاً اگر یکی از سری ساخت‌های بیوسیمیلار از معیار شباهت خارج شد، آیا آن سری ساخت کنار گذاشته می‌شود؟ یا برنامه تکرار آزمون و بررسی علل دارد؟ همچنین تکلیف تفاوت‌های جزئی که نیاز به بررسی بیشتر دارند (مثل انجام تست‌های تکمیلی یا تحلیل آماری عمیق‌تر) باید مشخص شود.	برنامه اقدام در برابر تفاوت‌ها
اگر قرار است رویکرد بالینی کاهش‌یافته (بدون انجام مطالعه بالینی اثربخشی یا CES) اتخاذ شود، باید در پروتکل توضیح داده شود چرا این امر از نظر علمی قابل قبول است. به عبارتی استدلال شود که براساس دانش حاضر، نشان دادن شباهت در CQA های بحرانی تضمین می‌کند عملکرد بالینی یکسان خواهد بود. این بحث باید EMA را قانع کند که عدم انجام CES لطمه‌ای به اثبات اثربخشی/ایمنی نمی‌زند.	توجیه انتخاب رویکرد بالینی (Tailored Clinical Approach)

با تدوین این پروتکل و تبیین شفاف تمامی جزئیات، سطح اطمینان نهاد نظارتی نسبت به برنامه توسعه بیوسیمیلار افزایش می‌یابد EMA، تأکید دارد قبل از اجرای مطالعات تطبیقی نهایی، پروتکل با آنها مطرح و تأیید شود (از طریق فرایند Scientific Advice)، این کار ریسک عدم پذیرش نتایج در پایان کار را کاهش می‌دهد.

4. سری ساخت‌های مورد استفاده در ارزیابی شباهت (Batches to be Included in the Similarity Assessment)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

یکی از مهم ترین پرسش ها در طراحی مطالعه شباهت این است: چند سری ساخت و کدام سری ساخت ها از هر محصول باید با هم مقایسه شوند؟ تصمیم گیری در این باره باید طوری باشد که نماینده تنوع واقعی هر دو محصول باشد.

- سری ساخت های محصول مرجع (RMP):** نتیجه گیری درباره شباهت اساساً باید بر مقایسه با سری ساخت های تولید شده محصول مرجع در مقیاس تجاری استوار باشد. تجربه ی فعلی برای محصولات شناخته شده نشان داده برای اغلب محصولات زیستی، ۴ تا ۶ سری ساخت مختلف از RMP عددی مناسب است که هم تغییرپذیری بین سری ساختی محصول مرجع را پوشش می دهد و هم امکان تحلیل آماری فراهم می کند. انتخاب دقیق تعداد سری ساخت ها بسته به ویژگی های محصول است؛ مثلاً هرچه پراکندگی ویژگی های مرجع بیشتر باشد یا آزمون ها حساس تر باشند، برای اطمینان از هم پوشانی توزیع ها، به تعداد بیشتری سری ساخت نیاز است. همچنین استقلال سری ساخت ها مهم است (ترجیحاً سری ساخت های مربوط به زمان ها و مکان های تولید مختلف از محصول مرجع جمع آوری شود). توجه شود که سری ساخت های مرجع باید در شرایط نگهداری توصیه شده (دما، نور و غیره) انبار شوند و پیش از انقضا مورد آزمون قرار گیرند. حتی توصیه می شود دوره نمونه برداری طولانی شود تا هرگونه تغییر احتمالی تدریجی در ویژگی های مرجع (drift) در طول زمان نیز آشکار گردد. به بیان دیگر، اگر محصول مرجع طی سالیان اندکی تغییرات نامحسوسی در مشخصات داشته باشد، نمونه گیری سری ساخت های مربوط به سال های مختلف آن را نشان خواهد داد.

- سری ساخت های محصول بیوسیمیلار:** تمام سری ساخت های مقیاس صنعتی که در مراحل توسعه ساخته شده اند باید در ارزیابی گنجانده شوند. این شامل سری ساخت های تولید نهایی (مقیاس تجاری) و همچنین سری ساخت هایی که برای مطالعات بالینی PK/PD استفاده شده اند می شود. علت این است که می خواهیم مطمئن شویم سری ساختی که در مطالعه بالینی به بیمار تزریق شده، با سری ساخت های دیگر محصول مطابقت داشته و تفاوتی نداشته است. اگر طی توسعه، سری ساخت های آزمایشی در مقیاس کوچک تر ساخته شده اند، می توان آن ها را نیز مقایسه کرد مشروط به این که هم خوانی کاملشان با فرایند تولید نهایی ثابت شده باشد EMA هشدار می دهد که استفاده از سری ساخت های توسعه که شرایط ساخت متفاوتی داشته اند می تواند عدم قطعیت وارد کند و بهتر است تنها در صورتی وارد مقایسه شوند که مطابقت کامل آن ها با سری ساخت تجاری اثبات گردد. به طور خلاصه، هر سری ساخت بیوسیمیلار که وارد مطالعه می شود باید نماینده فرایند نهایی تولید باشد.

هرگونه انحراف از اصول فوق (مثلاً استفاده نکردن از برخی سری ساخت های تجاری، یا استفاده از سری ساخت توسعه) باید در پروتکل ذکر و از نظر علمی توجیه شود. به علاوه، باید حد کفایت تعداد سری ساخت ها با داده تجربی پشتیبانی شود. اگر مثلاً تنها ۴ سری ساخت مرجع در دسترس بوده است، باید داده هایی ارائه شود که نشان دهد همین تعداد برای برآورد واریانس به قدر کافی بوده است.

با اتخاذ چنین رویکردی، عدم قطعیت های ناشی از نمونه گیری محدود کاهش می یابد. هدف این است که پس از آزمون این مجموعه سری ساخت ها بتوان با اطمینان گفت: "کیفیت محصول بیوسیمیلار در چارچوب تغییرات طبیعی کیفیت محصول مرجع قرار می گیرد".

5. ملاحظات آنالیزی (Analytical Considerations)

در مقایسه ویژگی های کیفی، کیفیت ابزارها و روش های آنالیزی نقش تعیین کننده دارد. این بخش یادآوری می کند که باید از بهترین روش های موجود استفاده شود و نکاتی را در اجرای آزمون های مقایسه ای بیان می کند:

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- **روش‌های پیشرفته و هم‌راستا:** روش‌های آنالیزی که استفاده می‌شوند باید به‌روز، دقیق و ترجیحاً **Orthogonal** (مستقل و مکمل یکدیگر) باشند. برای هر خصوصیت، بهتر است بیش از یک روش با اصول فیزیکی متفاوت به کار رود تا نتایج یکدیگر را تأیید کنند، EMA اشاره می‌کند که برخی رویه‌های قدیمی مانند آزمایش هم‌زمان نمونه مرجع و نمونه آزمایشی در یک ران (side-by-side testing) که زمانی اجباری بودند، امروزه با وجود دستگاه‌های بسیار دقیق، دیگر لزوم سابق را ندارند. زیرا روش‌های مدرن دقت بالا و واریانس روزانه کمی دارند که با واریانس بین‌روزی قابل مقایسه است؛ لذا می‌توان نتایج را حتی اگر در روزهای جداگانه انجام شده باشند، با هم مقایسه کرد. البته اگر روشی واریانس بین‌ران بالایی دارد (مثلاً برخی تست‌های پیچیده بیوفیزیکی مانند SPR تحت شرایط خاص)، آنگاه انجام آزمون‌ها به‌صورت side-by-side (در یک سری) می‌تواند مفید باشد.
- **گنجاندن آزمون‌های عملکردی (فارماکولوژی In Vitro):** علاوه بر ویژگی‌های صرفاً فیزیکوشیمیایی، انتظار می‌رود آزمون‌های عملکردی مرتبط و افتراق‌دهنده نیز انجام شوند. برای مثال، آزمون اتصال به رسپتور هدف، آزمون فعال‌سازی سلولی یا سنجش اثر بیولوژیک (potency) باید وجود داشته باشد. این آزمون‌ها دو فایده عمده دارند:
 - (۱) کمک به شناسایی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی بحرانی (مثلاً اگر تفاوتی در یک نوع گلیکوزیلاسیون مشاهده شد، آیا در آزمون اتصال هم اثر می‌گذارد؟)؛
 - (۲) ارائه داده مقایسه‌ای بیولوژیک بین بیوسیمیلار و مرجع. اگر فارماکولوژی in vitro هر دو محصول یکسان باشد، قویاً نشان می‌دهد فعالیت زیستی و در نتیجه فعالیت درمانی آن‌ها یکی است. این داده‌ها می‌توانند طیف وسیعی داشته باشند: سنجش قدرت اثر، بررسی رابطه دوز-پاسخ، اتصال به اهداف اصلی، و حتی اتصال به گیرنده‌های فرعی مرتبط با فارماکوکینتیک (مثلاً گیرنده FcRn برای آنتی‌بادی‌ها که بر نیمه‌عمر آن‌ها تأثیر دارد).
- **حفظ نمونه‌های مرجع از طریق انجماد:** از آنجا که تهیه تعداد زیادی سری ساخت مرجع گاهی چالش‌برانگیز است، برخی شرکت‌ها روش فریز کردن نمونه‌های مرجع را به کار برده‌اند تا بتوانند نمونه‌های یک سری ساخت را در طول زمان چند بار مورد آزمون قرار دهند، EMA ذکر کرده که این کار قابل قبول است به شرط آن که داده کافی ارائه شود مبنی بر اینکه فرایند انجماد/یخ‌گشایی روی ویژگی‌های کیفی اثر ندارد. به بیان دیگر، باید نشان داده شود که مثلاً محتوای پروتئین، ساختار و سایر خصوصیات یک سری ساخت مرجع پس از یک نوبت فریز و دیفریز تغییری نمی‌کند. اگر چنین داده‌ای ارائه گردد، می‌توان نمونه‌های مرجع را ذخیره کرد و در بازه‌های زمانی مختلف استفاده نمود تا مصرف تعداد زیادی ویال تجاری کاهش یابد.
- **یکنواختی روش‌ها در طول توسعه:** ممکن است در طول توسعه، روش‌های آنالیتیک تغییر یا بهبود یابند (مثلاً نسخه جدید دستگاه معرفی شود یا روش جایگزین دقیق‌تری به کار گرفته شود). سند EMA یادآور می‌شود که باید نتایج روش قدیمی با روش جدید قابل تطبیق باشند. اگر لازم باشد، باید برخی سری ساخت‌ها دوباره با روش نهایی اندازه‌گیری شوند یا ارتباط نتایج قدیم و جدید با آزمایش‌های مقایسه‌ای تعیین گردد. در نهایت، تمام داده‌های ارائه‌شده در پرونده باید قابل اعتماد و قابل‌قیاس باشند و تغییر روش‌ها نباید مانع تفسیر درست شباهت شود.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- تفکیک تفاوت واقعی از خطای روش: نکته بسیار مهم دیگر این است که دقت و صحت روش‌های اندازه‌گیری باید به حدی بالا باشد که هر تفاوت مشاهده‌شده واقعاً ناشی از تفاوت بین نمونه‌ها باشد نه ناشی از خطای روش. اگر یک دستگاه خطای اندازه‌گیری بزرگی دارد، ممکن است تفاوت ۵٪ بین دو نمونه صرفاً ناشی از واریانس روش باشد. بنابراین در گزینش روش‌ها، آن‌هایی انتخاب شوند که کمترین انحراف معیار و خطای سیستماتیک را دارند. همچنین هر جا اختلافی دیده شد، ابتدا باید مطمئن شویم از نظر آماری و با در نظر گرفتن خطای روش، اختلاف معنادار است یا خیر.

6. ارزیابی شباهت فیزیکوشیمیایی و عملکردی

(Assessment of Physicochemical and Functional Similarity)

این بخش به قلب تحلیل شباهت می‌پردازد: این که چگونه می‌توان شواهد متقنی ارائه کرد که محصول بیوسیمیلار از نظر کیفی واقعاً مشابه است. راهنمای کیفیت EMA (انتشار ۲۰۱۴) و راهنمای FDA (انتشار ۲۰۱۹) هر دو چارچوب‌هایی برای این ارزیابی پیشنهاد داده‌اند. رایج‌ترین رویکرد که اکنون به کار می‌رود به این صورت است:

- تضمین مشخصات محصول در محدوده تغییرات مرجع:** سازنده باید نشان دهد بیوسیمیلار تمامی ویژگی‌های کیفی مهم خود را در محدوده تغییرات بین‌سری ساختی محصول مرجع دارد. برای این کار، سیستم کنترل کیفیت تولید (کنترل در هنگام آزادسازی محصول) باید تضمین کند که در آینده تولید نیز همین وضعیت حفظ خواهد شد. به این معنی که اگر امروز یک سری ساخت بیوسیمیلار شبیه مرجع بود، سری ساخت‌های سال بعد نیز (تا زمانی که فرآیند تغییری نکرده) در همین حدود خواهند بود. در نتیجه، مشخصات هدف کیفی محصول (QTPP) باید بر اساس مشخصاتی که در طول توسعه برای مرجع مشاهده شده تعیین گردد EMA، بیان می‌کند هر سری ساخت بیوسیمیلاری که پروفایل کیفیتش داخل دامنه تغییرات سری ساخت‌های مرجع باشد، انتظار می‌رود همان عملکرد بالینی را داشته باشد و تفاوت‌های جزئی در این محدوده تأثیر بالینی معناداری ندارند.
- اشاره به استانداردهای بین‌المللی:** این رویکرد در راهنمای EMA 2014 (مسائل کیفی) آمده و FDA نیز در راهنمای ۲۰۱۹ خود به رویکردهای مشابه اشاره کرده است. حتی سازمان بهداشت جهانی (WHO) در دستورالعمل ۲۰۲۲ خود بر ارزیابی مشابه تأکید دارد. بنابراین یک توافق کلی بین‌المللی وجود دارد که ارزیابی آماری جامع ویژگی‌های کیفی بهترین راه اثبات شباهت است و می‌تواند در موارد مناسب جایگزین مطالعات بالینی شود. با این حال، EMA اشاره می‌کند که تعدادی رویکرد آماری نوین نیز در مقالات پیشنهاد شده و شرکت‌ها می‌توانند بسته به مورد از آن‌ها استفاده کنند. این نشان می‌دهد نهادهای نظارتی از نوآوری در روش‌های آماری استقبال می‌کنند، البته مشروط بر این که روش پیشنهادی متقن باشد.

در ادامه، دو مفهوم آماری کلیدی که پایه طراحی آزمون‌های شباهت هستند معرفی می‌شوند: **شرط شباهت و معیار شباهت**، این مفاهیم برای تنظیم معیارهای تصمیم‌گیری آماری استفاده می‌شوند.

6.1. شرط شباهت (Similarity Condition)

تعریف: شرط شباهت یک بیان مختصر از وضعیت توزیع داده‌ها است که در صورت برآورده شدن آن، می‌توان نتیجه گرفت دو محصول مشابه‌اند. به بیان فنی‌تر، شرط شباهت مشخص می‌کند که دو توزیع آماری (یکی مربوط به بیوسیمیلار و یکی مربوط به RMP تحت چه

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

شرایطی آنقدر به هم نزدیک هستند که تفاوتشان از نظر عملی ناچیز تلقی شود. تعیین این شرط گاهی دشوار است، چون همان طور که گفته شد، ارتباط کمی مستقیم بین سطح یک CQA و عملکرد بالینی همیشه در دسترس نیست. بنابراین اغلب شرط شباهت بر مبنای شباهت توزیع های کیفی صرف تعریف می شود تا بر مبنای ملاحظات مستقیم بالینی. سند EMA تصریح می کند که «عملکرد نهایی بالینی نتیجه اثر چندین CQA است؛ پس شباهت باید به صورت کل نگر بررسی شود و نمی توان برای هر CQA به تنهایی یک معیار بالینی معین کرد». به این ترتیب، شرط شباهت معمولاً یک تعریف آماری/ریاضی است نه یک معیار بالینی.

مثال - شرط «جمعیت درون جمعیت»: برای ویژگی هایی که مقدار پیوسته دارند (continuous data)، یک شرط رایج «Population Within Population» یا «قرارگیری یک جمعیت در دل جمعیت دیگر» است. این شرط به زبان ساده می گوید: «درصد معینی از نمونه های بیوسیمیلار باید در محدوده ای قرار گیرند که درصد معینی از نمونه های مرجع در آن محدوده قرار گرفته اند.» مثلاً ممکن است تعریف کنیم ۹۰٪ داده های بیوسیمیلار در بازه ای واقع شوند که ۹۹٪ داده های مرجع را پوشش می دهد. این قبیل تعریف ها عملاً بیان می کنند که توزیع بیوسیمیلار به طور کامل زیرمجموعه ای از توزیع مرجع است. شکل فرضی ارائه شده در بخش قبل نمونه ای از چنین شرطی بود. این روش مشکل تعیین حد تفاوت قابل قبول را تا حدی حل می کند، چون حدود قابل قبول مستقیماً از پراکندگی طبیعی مرجع استخراج می شود.

سایر شروط برای انواع صفات:

- برای برخی ویژگی ها مثل ناخالصی های مرتبط با محصول (مانند تجمعات یا قطعات پروتئینی)، ممکن است شرط شباهت ساده تر باشد: مثلاً «عدم افزایش در سطح ناخالصی X نسبت به مرجع». یعنی اگر در محصول مرجع حداکثر ۲٪ از نوعی ناخالصی وجود دارد، بیوسیمیلار نیز نباید بیش از ۲٪ از آن ناخالصی داشته باشد (ترجیحاً کمتر). این یک انتظار از پیش تعیین شده است و نیاز به تعریف پیچیده آماری ندارد.
- برای ویژگی هایی مثل محتوای پروتئین یا ناخالصی های فرایندی (که معمولاً مقیاس اسمی یا یک استاندارد مطلق برای قبولی دارند)، شرط می تواند به شکل مقایسه با یک استاندارد باشد: مثلاً محتوای پروتئین محصول در $5\% \pm$ مقدار برچسب باشد و مشابه مرجع باشد.
- برای صفات کیفی ترتیبی یا اسمی (مثل توالی اسید آمینه که باید کاملاً یکسان باشد)، شرط شباهت بدیهی است: هیچ تفاوتی در توالی قابل قبول نیست. یا مثلاً در الگوی باندهای SDS-PAGE که مقایسه چشمی می شود، شرط می تواند این گونه بیان شود: «شکل کلی پروفایل مشابه باشد و باند اضافی غیرمنتظره ظاهر نشود. راهنما اذعان دارد که برای این نوع صفات، تعریف شرط شباهت همواره صریح و عددی نیست؛ اما توصیه می کند شرکت ها در پروتکل خود شرایط پذیرش برای همه انواع QA (حتی کیفی) را از پیش توصیف کنند. به عنوان مثال: کروماتوگرام دو محصول از نظر شکل و تعداد پیک ها باید قابل قیاس باشد. بنابراین شرط شباهت در حکم جمله ای کیفی/ریاضی است که وضعیت ایده آل شباهت را تعریف می کند. اما چگونه تصمیم بگیریم که این شرط در عمل برقرار شده یا نه؟ این جا مفهوم معیار شباهت مطرح می شود.

6.2. معیار شباهت (Similarity Criteria)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

برای این که بفهمیم شرط شباهت برآورده شده است یا خیر، نیاز به معیار قابل اندازه گیری داریم. معیار شباهت در واقع یک شاخص آماری یا حد آستانه ای است که اگر داده های ما از آن عبور کنند، می توان گفت شرط شباهت حاصل شده است. انتخاب معیار مناسب خود یک کار علمی مهم است و باید با توجه به ماهیت داده و اهمیت آن صفت کیفی انجام شود.

ویژگی های معیار شباهت:

- معیار باید تا حد ممکن از داده ها و دانش موجود استخراج شود. برای مثال، اگر پراکندگی طبیعی RMP را می دانیم، معیار باید آن را در نظر بگیرد. یا اگر می دانیم تفاوت ۱۰٪ در قدرت یک محصول تأثیر بالینی ندارد، می توان معیار را $\pm 10\%$ در نظر گرفت.
- معیار باید هم واریانس سری ساخت های مرجع و هم واریانس سری ساخت های بیوسیمیلار را لحاظ کند. مثلاً اگر هر دو پراکندگی کمی دارند، معیار می تواند سخت گیرانه تر باشد، اما اگر ذاتاً پراکندگی بالا است، معیار باید آن را منعکس کند.

انواع معیارها: در روش های آماری، چندین رویکرد برای تعیین معیار شباهت موجود است و EMA/ICH هیچ روش واحدی را الزام نکرده اند؛ اما برخی مثال ها رایج شده اند:

- **آزمون معادلی (Equivalence Test):** در این روش، حدودی برای تفاوت قابل قبول تعیین می شود و با آزمون های آماری (مانند آزمون t یا محاسبه فاصله اطمینان (بررسی می شود که تفاوت میانگین دو جمعیت در آن حدود قرار دارد یا خیر، FDA این روش را برای Tier 1 (ویژگی های بسیار بحرانی) توصیه کرده است. مثلاً ممکن است معیار تعیین شود: «فاصله اطمینان ۹۰٪ نسبت میانگین قدرت بیوسیمیلار به میانگین مرجع باید بین ۰.۸ تا ۱.۲۵ باشد». اگر داده های ما این شرط را تأمین کنند، نتیجه می گیریم شباهت برقرار است.
- **روش محدوده کیفیت (Quality Range):** این روش مطابق همان مفهوم «جمعیت درون جمعیت» تعریف می شود. به طور مثال: ۹۰٪ داده های بیوسیمیلار باید در بازه میانگین مرجع $\pm 3SD$ مرجع قرار گیرند، FDA این رویکرد را به عنوان Tier 2 (ویژگی های با اهمیت متوسط) به کار می برد.
- **روش های توزیعی دیگر:** استفاده از مقایسه فاصله اطمینان برای واریانس ها، یا روش های مبتنی بر بیز نیز ممکن است. برخی پژوهش ها از حدود تحمل (Tolerance Interval) استفاده می کنند (مثلاً بازه ای که ۹۹٪ داده های مرجع با اطمینان ۹۵٪ در آن قرار می گیرد). نکته این جاست که EMA در جزئیات این موارد ورود نکرده و انتخاب هر روش را به توسعه دهنده واگذار کرده است، به شرط آن که با استدلال علمی توجیه شود.

به طور خلاصه، شرکت باید از قبل معیار پذیرش برای هر CQA را تعریف کند و در پرونده ثبت محصول ذکر نماید. سپس نتایج آزمایش ها بررسی شوند که آیا این معیارها برآورده شده اند یا خیر.

مثال عددی: فرض کنیم برای یک بیوسیمیلار هورمون رشد، قدرت بیولوژیک محصول مرجع ۱۰۰ واحد با انحراف معیار ۵ واحد است. تیم توسعه شرط شباهت را «عدم تفاوت معنادار در قدرت اثر» تعریف می کند. معیار را تعیین می کند: «فاصله اطمینان ۹۵٪ نسبت میانگین قدرت بیوسیمیلار به مرجع باید در بازه ۰.۹ تا ۱.۱ قرار گیرد». اگر آزمایش ها نشان داد میانگین قدرت بیوسیمیلار ۹۸ واحد است و فاصله

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

اطمینان ۹۵٪ نسبت این میانگین به ۱۰۰ در بازه ۰،۹۵ تا ۱،۰۲ قرار گرفت (که کاملاً در محدوده ۰،۹-۱،۱ است)، نتیجه می‌گیریم معیار شباهت تأمین شده و این CQA مشابه است. در غیر اینصورت، یا باید تفاوت با استدلال دیگری توجیه شود یا پروژه شکست خورده محسوب گردد.

توجه: EMA و FDA هر دو تأکید دارند که “مجموع شواهد” ملاک تصمیم‌گیری است و نباید صرفاً به گذراندن/نگردن یک آزمون آماری اکتفا کرد. برای مثال اگر یک CQA کمی خارج از محدوده بود اما باقی ۲۰ CQA کاملاً مشابه بودند و آن یک مورد هم با اصلاح فرایند قابل بهبود است، ممکن است با اقدامات تکمیلی مشکل حل شود. رویکرد بیش از حد صفر و یکی (قبولی/رد) در این حوزه توصیه نمی‌شود، بلکه قضاوت علمی کلی ضروری است.

7. ابهامات در ارزیابی شباهت (Uncertainties in the Similarity Assessment)

در این بخش EMA حوزه‌هایی را مطرح می‌کند که حتی پس از یک مطالعه آنالیزی قوی، هنوز ممکن است عدم قطعیت (Residual Uncertainty) باقی بماند. به عبارت دیگر، کدام تفاوت‌های مشاهده‌شده یا جنبه‌ها ممکن است ما را در شباهت کامل مردد کند و نیاز به بررسی بیشتر (احیاناً انجام مطالعات اضافی) داشته باشد. چند زیرمجموعه مهم ذکر شده که تجربه نشان داده منابع معمول تفاوت یا چالش در پرونده‌های بیوسیمیلار هستند:

۷.۱. ساختار اولیه و ساختار مرتبه بالا

اثبات شباهت ساختاری مولکول بیوسیمیلار با مرجع از ضروری‌ترین بخش‌هاست، به‌ویژه برای اطمینان از این‌که دارو به همان گیرنده هدف مورد نظر اتصال اختصاصی دارد. ساختار اولیه (توالی اسید آمینه) باید کاملاً یکسان باشد؛ در غیر این صورت محصول اصولاً بیوسیمیلار محسوب نمی‌شود. ساختارهای ثانویه و سوم تا جایی که با تکنیک‌هایی مانند CD، FTIR، DSC و سایر روش‌ها قابل اندازه‌گیری هستند نیز باید قابل قیاس باشند. اگر اختلاف قابل توجهی مثلاً در الگوی تاخوردگی پروتئین مشاهده شود، یک علامت خطر مهم است، EMA تأکید می‌کند بدون تأیید ساختار مشابه، نمی‌توان انتظار داشت برهم‌کنش دارو-رستپور مشابه باشد.

از آنجا که تکنیک‌های اندازه‌گیری ساختار سه‌بعدی غیرمستقیم‌اند (مثل تحلیل پیوندهای دی‌سولفیدی، طیف‌سنجی‌ها، یا حتی اتکا بر آزمون‌های عملکردی به عنوان نماینده ساختار)، هر گونه ابهام در این قسمت معمولاً منجر به درخواست داده‌های بیشتر می‌شود. اگر ساختار مولکول به‌طور کامل مشخص نباشد یا نشانگرهای کافی برای یکسانی ارائه نشود، ممکن است نهاد ناظری احساس کند بدون **مطالعه اثربخشی بالینی (CES)** نمی‌توان ریسک تفاوت را پذیرفت؛ زیرا شاید تفاوتی نامرئی در ساختار وجود داشته باشد که بر اثربخشی یا ایمنی اثر بگذارد. بنابراین شباهت کامل در توالی و تاخوردگی مولکول کلیدی است. تفاوت‌های جزئی – مثلاً درصدی از یک ایزومر فضایی یا یک واریانت ساختاری – اگر در عملکرد *in vitro* اثر نداشته و در محدوده مرجع باشند، قابل قبول‌اند؛ در غیر این صورت باید در همین مرحله متوقف شد یا داده‌های تکمیلی ارائه گردد.

۷.۲. محتوای پروتئین

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

غلظت یا محتوای پروتئین در فرآورده یکی از عوامل به ظاهر ساده ولی بسیار مهم است EMA. یادآور می‌شود سری ساخت یا سری ساخت‌هایی از بیوسیمیلار که در مطالعه بالینی فارماکوکینتیک (PK) استفاده می‌شوند، باید از نظر غلظت و محتوای پروتئین با محصول مرجع هم‌خوانی داشته باشند. دلیل این امر واضح است: اگر مثلاً ویال بیوسیمیلار عملاً ۱۰٪ ماده مؤثره کمتر یا بیشتر داشته باشد، نتایج PK (مانند Cmax) به اشتباه متفاوت خواهد شد که ربطی به خود مولکول ندارد بلکه صرفاً ناشی از تفاوت دوز تزریق شده است. پس باید اطمینان حاصل کرد دوز مؤثر تحویلی یکسان است. این نکات فنی مانند اطمینان از دقت روش سنجش پروتئین و عدم تفاوت معنادار در حجم پرشده در ویال‌ها بسیار اهمیت دارد. تفاوت‌های اندک (در حد $\pm 5\%$) معمولاً قابل چشم‌پوشی یا از لحاظ بالینی خنثی‌اند، اما اگر اختلاف غلظت فرمولاسیون بیشتر باشد، شاید نیاز به تنظیم دوز یا انجام یک مطالعه PK اضافی برای اثبات هم‌ارزی دوز باشد.

۷.۳. فعالیت بیولوژیک

قدرت و فعالیت زیستی محصول، چکیده‌ای از اثر کل ساختار مولکول است، EMA تأکید می‌کند «اثبات فعالیت زیستی قابل مقایسه از اهمیت بحرانی برخوردار است». اگر یکی از سری ساخت‌های بیوسیمیلار نتواند معیار شباهت را در آزمون فعالیت زیستی (مثلاً قدرت اثربخشی سلولی) کسب کند، نمی‌توان نتیجه‌گیری کرد که محصول به طور کلی مشابه است. چنین وضعیتی یا نشان‌دهنده یک تفاوت ساختاری مهم است یا مشکل در پایداری/فرآوری محصول. در برخی پرونده‌ها مشاهده شده که فعالیت *in vitro* بیوسیمیلار کمی پایین‌تر بوده اما شرکت تولیدکننده با افزایش دوز در بالین توانسته اثر را نشان دهد؛ ولی رویکرد امروزی این است که نباید هیچ تفاوت معناداری در *potency* مشاهده شود. اگر مشاهده شد، راه‌حل اصولی اصلاح فرآیند و افزایش شباهت است، نه این‌که سریعاً به سراغ مطالعه CES برویم. تنها در صورتی که علی‌رغم تمام تلاش‌ها تفاوت اندکی باقی بماند، آنگاه شاید مطالعات تکمیلی *in vivo* یا بالینی برای بررسی اثر آن تفاوت لازم شود.

۷.۴. الگوی بار الکتریکی (Charge Variants)

مولکول‌های پروتئینی معمولاً مخلوطی از گونه‌های باردار (ایزوفرم‌های ایزوالکتریک) هستند که ناشی از فرآیندهای پس از ترجمه مانند دامیداسیون، سیالیاسیون و غیره است EMA. اشاره می‌کند که تفاوت‌هایی در پروفایل بار الکتریکی میان بیوسیمیلار و مرجع غیرمعمول نیست، چرا که عوامل زیادی می‌تواند بر آن اثر بگذارد. اما سؤال مهم این است: آیا این تفاوت معنی‌دار است؟ مثلاً اگر بیوسیمیلار درصد ایزوفرم بازی بیشتری دارد، آیا روی فعالیت یا پایداری محصول اثر می‌گذارد؟ غالباً، تا زمانی که این ایزوفرم‌ها در محدوده مشاهده‌شده برای مرجع باشند، قابل قبول است. حتی محصول مرجع گاهی بین سری ساخت‌ها در نسبت ایزوفرم‌ها اختلاف دارد. اما اگر بیوسیمیلار یک پیک کاملاً جدید در پروفایل شارژ نشان دهد یا سهم یک ایزوفرم خارج از محدوده مرجع باشد، باید بررسی شود که آیا آن ایزوفرم جدید خاصیتی نامطلوب (مثلاً تمایل به تجمع یا پاکسازی سریع‌تر) دارد یا خیر. اگر بله، احتمالاً بدون رفع آن تفاوت نمی‌توان جلو رفت. اگر نه (مثلاً نشان داده شود آن ایزوفرم اثر خاصی ندارد و در مرجع هم وجود داشته ولی کم بوده)، شاید قابل اغماض باشد. به طور کلی، تفاوت در ایزوفرم‌های باردار باید با داده‌های تکمیلی (مثلاً اثبات عدم اثر بر عملکرد یا PK) توجیه شود.

۷.۵. گلیکوزیلاسیون

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

تفاوت در الگوهای گلیکوزیلاسیون از چالش برانگیزترین موارد در توسعه بیوسیمیلارها است، EMA صراحتاً بیان کرده: «بر اساس تجربه تاکنون، تفاوت در گلیکوزیلاسیون بین بیوسیمیلار و مرجع می تواند توجه اش دشوار باشد». علت این است که قندهای متصل به پروتئین می توانند روی چندین مورد اثر بگذارند: نیمه عمر گردش خون (از طریق گیرنده های پاک سازی مانند گیرنده های گلیکان شناس)، ایمنی زایی (مثلاً حضور یا عدم حضور آنتی ژن های قندی ایمنی زا)، و حتی فعالیت بیولوژیک مثلاً برخی آنتی بادی ها اگر فاقد گلیکوزیلاسیون کامل باشند عملکرد Fc آن ها مختل می شود، بنابراین اگر الگوی گلیکانی بیوسیمیلار به طور واضح با مرجع فرق داشته باشد، نهاد ناظر بسیار سخت گیر خواهد شد. البته تفاوت جزئی قابل قبول است: مثلاً درصد کمی تفاوت در یک گونه گلیکان که مشخص شده اثر قابل توجهی ندارد. اما تفاوت های عمده (مثل نبودن یک نوع گلیکوزیلاسیون مهم که مرجع دارد، یا وجود یک قند غیربومی و ناآشنا) غالباً غیرقابل قبول هستند و یا باید با یک مطالعه بالینی (اثر بخشی/ایمنی) اثرشان بررسی شود. برای نمونه، اگر محصول مرجع فاقد یک آنتی ژن قندی ایمونوژنیک خاص در گلیکان ها است ولی بیوسیمیلار آن آنتی ژن را دارد، احتمالاً نیاز به آزمون های اضافی ایمنی زایی یا حتی مطالعه CES خواهد بود. پیام کلیدی این است که تلاش کنید الگوی گلیکانی را تا حد امکان مشابه نگه دارید، چرا که هر اختلاف در اینجا به دشواری قابل استدلال و چشم پوشی است.

۷.۶. ناخالصی ها

محصولات زیستی علاوه بر ماده موثره اصلی، حاوی انواع ناخالصی ها هستند (ناخالصی های مرتبط با محصول مانند پروتئین های تخریب شده یا تجمع یافته، و ناخالصی های فرایندی مانند پروتئین های سلولی باقی مانده)، تفاوت در سطح ناخالصی ها می تواند پیامد داشته باشد: برای مثال تجمعات پروتئین (aggregates) اگر در بیوسیمیلار بیش از مرجع باشد، ریسک ایمنی زایی آنتی ژنی را افزایش می دهد. بنابراین اگر مشاهده شود درصد تجمعات یا قطعات تخریب شده پروتئین در بیوسیمیلار بالاتر است، معمولاً قابل قبول نیست. شرکت باید یا فرآیند را بهبود دهد یا نشان دهد این تفاوت در محدوده امن و بی اثر است. همچنین ناخالصی های فرایندی مثل بقایای DNA میزبان، پروتئین های میزبان، بقایای مواد مصرفی فرایند طبق استانداردهای ICH باید زیر حد مشخصی باشند. اگرچه این ها در محصول مرجع و بیوسیمیلار می توانند متفاوت باشند (چون فرایند ساخت فرق دارد)، اما باید هر دو زیر حد مجاز و ترجیحاً در یک مرتبه بزرگی باشند. در مجموع، EMA انتظار دارد بیوسیمیلار ناخالصی بیشتری نسبت به مرجع نداشته باشد؛ برابر یا کمتر بودن میزان ناخالصی ها ایده آل است. در غیر این صورت، ممکن است مطالعات تکمیلی (مثلاً آزمون های اختصاصی ایمنی زایی) لازم شود یا محصول به کلی رد شود.

جمع بندی بخش ابهامات: هدف از مرور موارد بالا این است که هیچ تفاوت مهمی از قلم نیفتد. باید از خود بپرسد: آیا هنوز جنبه ای از کیفیت محصول باقی مانده که نگران کننده باشد؟ اگر بله، آیا با داده های آنالیزی بیشتر (in vitro یا شاید مطالعات in vivo کوتاه مدت) می توان عدم قطعیت را رفع کرد یا خیر؟

مطالعه CES نباید جایگزین توسعه ناقص کیفیت شود یا برای توجیه تفاوت های بزرگ ویژگی های کیفی به کار رود. یعنی اگر در موارد بالا مشکلی هست، ابتدا باید در بخش کیفیت و غیربالینی حل شود. تنها زمانی که تمامی کارهای ممکن را انجام دادیم و باز اندکی عدم قطعیت غیرقابل رفع باقی ماند، آنگاه مطالعه CES مطرح می شود، آن هم برای تأیید نهایی.

۸. جمع بندی نهایی در جنبه های کیفیت (Final Reflection on Quality Aspects)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

EMA جمع‌بندی می‌کند که تحت چه شرایطی می‌توان از مطالعات بالینی اثربخشی (CES) چشم‌پوشی کرد و صرفاً با تکیه بر داده‌های کیفیت و مطالعات فارماکوکینتیک، بیوسیمیلار را تأیید نمود. همچنین بیان می‌کند در چه شرایطی هنوز انجام CES لازم خواهد بود.

بر اساس این جمع‌بندی، اگر بسته داده‌های کیفیت شواهد محکمی از شباهت ارائه کند، بازنگری در نیاز به CES ممکن است یعنی شاید بتوان CES را حذف کرد یک بسته کیفی «محکم» حداقل شامل موارد زیر است:

- **درک کامل مکانیزم اثر و ارتباط ساختار-عملکرد:** یعنی CQA های کلیدی مشخص و تحت کنترل باشند و ارزیابی ریسک نشان داده باشد هیچ تفاوت معناداری در آن‌ها باقی نمانده است. وقتی بدانیم کدام خواص برای اثربخشی مهم‌اند و آن‌ها را اندازه گرفته‌ایم و مشابه‌اند، آسوده‌خاطر خواهیم بود.
 - **استفاده از روش‌های آنالیزی بسیار حساس و دقیق:** داده‌های ارائه‌شده باید بالاترین وضوح را داشته باشند تا کوچک‌ترین تفاوت‌ها را هم نشان دهند. اگر ابزارهای به‌کاررفته به قدر کافی حساس نباشند، نمی‌توان با اطمینان اعلام کرد محصول واقعاً «highly similar» است.
 - **بررسی تعداد کافی از سری ساخت‌های مرجع:** تا اطمینان حاصل شود تغییرپذیری طبیعی محصول مرجع به‌درستی برآورد شده است. همچنین پروفایل هدف کیفیت (QTPP) بیوسیمیلار باید در طول توسعه بر اساس همین تغییرپذیری تعیین شده باشد. این تضمین می‌کند آنچه تولید می‌شود معمولاً داخل محدوده مرجع باقی می‌ماند.
 - **برنامه‌ریزی از پیش برای مطالعه شباهت در قالب پروتکل:** نه این‌که بعداً به صورت بداهه تصمیم‌گیری شود. پروتکل با تعیین شرط شباهت و معیارها و سایر اجزا باید از قبل وجود داشته و طبق آن عمل شده باشد. وقتی همه چیز نظام‌مند پیش برود، نتیجه قابل اعتمادتر خواهد بود.
- در چنین شرایطی، می‌توان گفت بسته داده‌های کیفیت و PK آن قدر قوی است که اثربخشی و ایمنی مشابه را می‌توان نتیجه گرفت. در این حالت، مطالعه CES ممکن است قابل حذف باشد، EMA اذعان کرده که طی سال‌های اخیر در مواردی که مکانیزم اثر ساده و داده‌های آنالیزی واقعاً محکم بوده‌اند، عملاً مطالعه CES حذف شده است (مثلاً در برخی هورمون‌ها که شاخص‌های PD جایگزین مناسبی داشته‌اند).
- اما در سوی مقابل، EMA تأکید می‌کند که CES در شرایط زیر کماکان لازم خواهد بود:
- اگر حساسیت و دقت داده‌های کیفیت کافی نباشد – چه به دلیل محدودیت فناوری چه به دلیل طراحی ضعیف مطالعه – در این صورت نمی‌توان تنها به آن‌ها تکیه کرد.
 - اگر مکانیزم اثر یا رابطه ساختار-عملکرد ناشناخته یا پیچیده باشد. در این حالت، حتی اگر داده آنالیزی شباهت را نشان دهد، چون نمی‌دانیم همه CQA های مهم کدام‌اند، همچنان ممکن است تفاوتی جزئی روی اثربخشی نمود کند که قابل پیش‌بینی نباشد. برای مثال در یک داروی مبتنی بر سلول یا محصولی با چندین جزء فعال، این عدم قطعیت بالاست. (EMA مثال می‌زند که محصولات سلولی پیچیده معمولاً در این دسته‌اند که بدون مطالعه بالینی نمی‌توان ریسک آن‌ها را پذیرفت).

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- اگر مواردی از تفاوت مشاهده شده که نمی‌توان اثرشان را به طور کامل ارزیابی ریسک کرد. فرضاً یک تفاوت کوچک در یک CQA دیده شده ولی دقیقاً معلوم نیست پیامدش چیست. در بسیاری از چنین مواردی سازمان‌های نظارتی به سمت مطالعات بالینی اضافی سوق پیدا می‌کنند تا با داده انسانی خیالشان راحت شود.

در انتها یک جمله مهم آمده: به یاد داشته باشید CES نباید به عنوان جایگزین توسعه ناقص کیفیت یا برای توجیه تفاوت‌های بزرگ ویژگی‌های کیفی استفاده شود. مفهوم اینکه اول کیفیت، بعد بالین. یعنی اگر کیفیت به درستی انجام شود، شاید مطالعه بالینی گسترده لازم نباشد؛ ولی اگر کیفیت ناقص باشد، انجام مطالعه بالینی هم نمی‌تواند معجزه کند.

مقایسه رویکرد EMA و FDA در ارزیابی شباهت آنالیزی

هر دو نهاد EMA و FDA هدف مشترکی در ارزیابی بیوسیمیلارها دارند: اثبات این که محصول زیستی جدید از نظر کیفیت، ایمنی و اثربخشی تفاوت معناداری با محصول مرجع ندارد. با این حال، در گذر زمان تأکیدات و جزئیات اجرای آن‌ها تفاوت‌هایی پیدا کرده که به چند مورد اصلی می‌توان اشاره کرد:

- **مبنای علمی مشترک:** هر دو بر اصول ICH Q5E (comparability) تکیه دارند، EMA صریحاً اعلام می‌کند که اصول توسعه بیوسیمیلار همان اصول اعمال تغییرات در فرایند تولید یک محصول زیستی است، FDA نیز در راهنماهایش اشاره می‌کند که کیفیت یک بیوسیمیلار باید در حد محصول مرجع باشد به طوری که هیچ تأثیر نامطلوب بالینی از تفاوت‌ها مشاهده نشود. هر دو به مفهوم «highly similar» بودن اشاره دارند. بنابراین پایه تئوری یکی است.
- **طراحی مطالعات آنالیزی و تعداد سری ساخت‌ها:** EMA به صورت کیفی توصیه می‌کند ۶-۱۵ سری ساخت مرجع استفاده شود و حتی می‌گوید «غیرممکن است عدد دقیقی برای همه حالات تعیین کنیم، FDA «اما در پیش‌نویس‌های اولیه راهنمای خود (۲۰۱۷) پیشنهاد داده بود حداقل ۱۰ سری ساخت مرجع و ۱۰ سری ساخت بیوسیمیلار مقایسه شوند. این پیشنهاد در راستای ایجاد یک استاندارد حداقلی بود. البته در نسخه‌های نهایی FDA این اعداد انعطاف‌پذیرتر شدند، ولی به هر حال هر دو تأکید دارند که باید نمونه‌های کافی برای مقایسه در دست باشد.
- **طبقه‌بندی ریسک ویژگی‌ها:** FDA شاید صریح‌تر این موضوع را ساختاری کرده است. آن‌ها در رهنمود ۲۰۱۷ خود یک سیستم سه‌لایه (3-Tier) معرفی کردند:

○ Tier 1 برای CQA های بسیار مهم (بالاترین ریسک) – نیازمند آزمون‌های آماری سخت‌گیرانه (معادلی)

○ Tier 2 برای CQA های متوسط – نیازمند معیارهای مقایسه‌ای مانند محدوده کیفیت

○ Tier 3 برای صفات کم‌اهمیت – مقایسه توصیفی/چشمی کافی است

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

در این راهنما تصریح شده بود Tier 1 معمولاً مواردی مثل قدرت اثر مرتبط با مکانیزم عمل (MoA) را شامل می‌شود EMA. در سند Reflection Paper 2025 خود دقیقاً از واژه "Tier" استفاده نکرده ولی مفهوم رتبه‌بندی ریسک را بیان کرده و به Reflection Paper آماری 2021 EMA نیز ارجاع داده است. در عمل، رویکرد EMA انعطاف‌پذیرتر است و اجازه می‌دهد شرکت با استدلال علمی خود نشان دهد چه روش آماری برای هر صفت مناسب است، در حالی که FDA جزئیات بیشتری را از قبل مشخص کرده بود.

- **رویکرد آماری:** هر دو نهاد استفاده از آزمون‌های آماری را برای نشان دادن شباهت تشویق می‌کنند ولی نحوه بیانشان متفاوت بوده است FDA. در پیش‌نویس ۲۰۱۷ خود تأکید داشت که معیارهای پذیرش باید بر اساس داده‌های مرجع تنظیم شود و حتماً قبل از دیدن نتایج بیوسیمیلار، در قالب یک برنامه آنالیز آماری شباهت (Analytical Similarity Statistical Analysis Plan) تعیین گردد EMA. نیز در Reflection 2025 همین را بیان می‌کند که باید قبل از شروع مطالعه اصلی، معیارها و روش‌ها در پروتکل تعریف شده باشند. تفاوت در این است که راهنمای FDA (به‌ویژه نسخه نهایی ۲۰۲۵/۲۰۱۹) جزئیات بیشتری از انواع روش‌ها و چگونگی تعیین حدود ارائه داده است، در حالی که EMA بیشتر به بیان اصول اکتفا کرده. برای مثال، FDA گفت Tier 1 «معمولاً آزمون فاصله اطمینان ۹۰٪ در محدوده معین» و حتی ذکر کرد «عدم قبولی یا قبولی یک CQA به تنهایی تعیین‌کننده نیست و کل شواهد بررسی می‌شود EMA». «هم در متن خود اشاره مشابهی دارد که باید به شکل کل‌نگر تصمیم گرفت. در کل می‌توان گفت FDA ساختاریافته‌تر (prescriptive) و EMA منعطف‌تر (principle-based) عمل می‌کنند.

- **حذف مطالعات بالینی EMA:** شاید از نظر تئوری پیش‌روتر در ایده حذف مطالعات اثربخشی بالینی (CES) باشد. همان‌طور که در این سند آمده، EMA باور دارد بسیاری از مطالعات CES اطلاعات جدیدی اضافه نمی‌کنند. این دیدگاه منجر به انتشار Reflection Paper 2025 شد FDA. نیز در مواردی مانند انسولین‌ها یا برخی هورمون‌ها مطالعه اثربخشی بالینی را حذف کرده، اما هنوز در ایالات متحده برای اغلب بیوسیمیلارهای آنتی‌بادی یک مطالعه فاز ۳ (اثربخشی) انجام می‌شود. البته تفاوت در ماهیت قوانین هم بوده: تا همین اواخر، FDA برای برچسب «قابل تعویض (Interchangeable)» عملاً یک مطالعه بالینی (مطالعه تعویض یا switching study) مطالبه می‌کرد، در حالی که در اروپا مفهوم interchangeability جدا از فرآیند تأیید محصول است و نیاز به مطالعه جداگانه ندارد. به طور خلاصه، EMA در رویکرد کاهش داده‌های بالینی جسورانه‌تر ظاهر شده (مطابق سند ۲۰۲۵)، در حالی که FDA با وجود به‌روزرسانی راهنماهای خود، احتمالاً هنوز محافظه‌کارانه‌تر عمل می‌کند (هرچند هر دو بر مجموعه کل شواهد - totality of evidence - تأکید دارند). (البته با انتشار راهنمای نهایی FDA در ۲۰۲۵، این شکاف کمتر شده و FDA هم صراحتاً اشاره دارد که در برخی موارد شاید داده‌های آنالیزی و PK کافی باشند.

- **استفاده از منابع و استانداردها:** هر دو سازمان استانداردهای بین‌المللی را پذیرفته‌اند EMA. به ICH Q5E، Q9 و راهنمای خودش اشاره می‌کند؛ FDA نیز به ICH ها و همچنین فارماکوپیه‌ها و استانداردهای USP استناد می‌کند (مثلاً در انتخاب متدها). تفاوت خاصی در این زمینه نیست، جز در برخی اصطلاحات یا تأکیدات جزئی.

نتیجه‌گیری مقایسه: برای یک شرکت که می‌خواهد هم در اتحادیه اروپا و هم در ایالات متحده مجوز بازاریابی بگیرد، بهترین راه این است که ترکیبی از سخت‌گیری‌های هر دو نهاد را اعمال کند: پروتکل و برنامه آماری دقیقی مشابه انتظارات FDA طراحی کند، معیارهای

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

پذیرش را سخت گیرانه و مبتنی بر داده‌های مرجع قرار دهد، و همه CQA ها را با بهترین روش‌های موجود ارزیابی کند (رویکرد EMA). این باعث می‌شود پرونده نزد هر دو نهاد قابل قبول باشد. همان‌طور که EMA در این سند گفته، FDA (در راهنمای ۲۰۱۹) و سازمان جهانی بهداشت (WHO) در راهنمای ۲۰۲۲ (نیز رویکردهای مشابهی اتخاذ کرده‌اند و به نظر می‌رسد رویکردها به سمت همگرایی پیش می‌روند.

۹. پیوست مطالعات ارزیابی کیفی

مطالعات ارزیابی کیفی مولکول بیوسیمیلار به صورت جدول زیر است

Category	Quality Attribute	Methods	Purpose / Description
Physicochemical properties	Molecular Weight or Size	- Orbitrap MS - Quadrupole TOF MS - MALDI TOF - Reduced&Nonreduced SDS-PAGE (Silver and Coomassie staining) - Reduced/Nonreduced ESI-MS - SEC-MALLS - LC/MS	Determine molecular weight, purity, aggregation (HMWS), and size distribution.
	Molar Absorptivity (Extinction coefficient) & Spectroscopic profiles	- Amino Acid Analyzer - UV-Vis spectroscopy	Determine protein concentration and spectroscopic properties.
	Isoforms Pattern & pI	- cIEF - iCIEF - IEF 2D-GEL (IEF/SDS-PAGE)	Evaluate charge isoform pattern and isoelectric point (pI).
Primary structure	Amino Acid Sequence	- ESI-MS analysis - MALDI-TOF MS - Peptide Mapping with RP-UPLC analyzed by LC/MS & LC/MS/MS - Edman Degradation with LC-MS/MS - Reduced RP-HPLC-UV peptide mapping	Confirm amino acid sequence and detect modifications or truncations.
	Amino Acid Composition	Amino acid Analyzer	Determine amino acid composition and confirm overall protein identity.
	N&C-Terminal Variants (Pyroglutamate, VHS, Lysine, Proline Amidation)	- LC-MS/MS - N & C-terminal Sequencing by Edman Degradation - HIC-HPLC - IEX-HPLC - HPLC and MALDI-TOF/MS	Identify terminal modifications (pyroglutamate, amidation, lysine truncation).

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Category	Quality Attribute	Methods	Purpose / Description
Higher Order Structures	Disulfide bond localization & Free sulfhydryl groups	- LC-MS/MS - MALDI-TOF - Electrospray MS - Reduced Tryptic/Asp-N Peptide Map (Free Thiol Derivatization) - Enzymatic peptide mapping with LCMS (reduced&nonreduced) - Enzymatic peptide mapping with RP-HPLC-ESI-MS (nonreduced) - Ellman's assay	Identify disulfide linkage pattern and quantify free sulfhydryl groups.
	Secondary & Tertiary Structure	- Nonreduced peptide mapping, LC-UV-MS FarUV-CD - FT-IR - NearUV-CD - Intrinsic fluorescence spectroscopy HDX-MS X-ray crystallography	Evaluate folding, secondary and tertiary structure integrity.
	Thermal Transition Analysis	DSC	Determine protein thermal stability (melting temperature, T _m).
	Quaternary Structure	SE-HPLC SEC-MALLS Dynamic light scattering Analytical ultracentrifugation	Evaluate protein oligomerization, aggregation, and quaternary conformation.
PTMs	Glycosylation (Oligosaccharide Profiling, Monosaccharide Analysis, Sialic Acid Content, antennary profile, ...)	- CE-LIF - IEX - HILIC-UPLC/FLD - HPAEC-PAD - RP-HPLC - CE-SDS - MALDI-TOF MS - CE after fluorescent derivatization - ESI-MS - Tryptic peptide mapping with LCMS - ESI-TOF (with DTT and PNGaseF) 2-AB Labeled NP – UPLC - LC/ESI-QTOF-MS	Characterize glycan profile, monosaccharide composition, and sialic acid content.
	Other PTMs (Oxidation, Deamidation, Glycation,	Tryptic Peptide Mapping (reduced&nonreduced) with LC/MS	Detect and quantify oxidative, deamidated, or glycated variants

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Category	Quality Attribute	Methods	Purpose / Description
	Pyroglutamate formation, IsoAsp formation, ...)	- Reduced S-Carboxymethylated Asp-N Peptide Map - Peptide Mapping (reduced) Separated by RP-UPLC analyzed by LC/MS & LC/MS/MS - CE-SDS / RP-HPLC - IEC - HIC	
Size & Charge Heterogeneity	Size Variants & Impurities (Monomer, HMWS, LMWS, ...)	- SE-HPLC & Gel permeation chromatography (GPC) - SEC-MALLS - SE-HPLC-SLS - Nonreduced and reduced CE-SDS - CE-SDS NGS - SDS-PAGE (reduced and non-reduced) - Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation (AF4) - SV-AUC - DLS	Detect aggregates (HMWS), fragments (LMWS), and monomer purity.
	Charge Variants & Impurity	- CZE - IEF - cIEF - icIEF - IEX	Characterize charge heterogeneity and identify acidic/basic variants.
Functional Properties	Binding Assays (Target Antigen, FcRn, C1q, FcγReceptors)	- ELISA - SPR - Cell-based competitive-binding assay - Competitive ELISA - FcRn Affinity Chromatography	Measure binding affinity to target antigen or Fc receptors.
	Activity Assays (Target activity, ADCC, CDC, ADCP, Apoptosis)	- Functional cell-based assay - Biochemical assays - Animal-based biological assays - FACS	Evaluate biological potency and effector function.
ADC Specific	Drug (Chemical Structure, Stereochemistry, polymorph screening)	- Elemental analysis - FT-IR (ATR) - UV Spectrum ¹H-NMR Spectroscopy ¹³C-NMR Spectroscopy ¹H-¹H Homonuclear Correlation Spectroscopy (COSY)	Confirm small-molecule structure, stereochemistry, and polymorphism

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Category	Quality Attribute	Methods	Purpose / Description
	Antibody Drug Conjugate	1H-13C Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) Spectroscopy 1H-13C Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) Spectroscopy - High Resolution Positive Mode ESI-MS - Crystal X-ray structure analyses - Solvent vapor exposure method	Determine ADC purity, DAR (drug-to-antibody ratio), and residual impurities.
		Free Drug	
		Unconjugated mAb	
		Purity of Payload	
		Cross-linked species	
		Non-proteinaceous impurities	
		Elemental impurities	
		Residual Solvents	
		Related Substances	
		DAR (drug-antibody ratio)	
		Assay	

ویژگی آزمون های پیشنهادی مولکول بیوسیمیلار به شرح جدول زیر است

Abbreviation	Full Form
MS	Mass Spectrometry
TOF	Time-of-Flight
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
SEC-MALLS	Size-Exclusion Chromatography coupled with Multi-Angle Laser Light Scattering
LC/MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
UV-Vis	Ultraviolet–Visible Spectroscopy
cIEF	Capillary Isoelectric Focusing
iCIEF / icIEF	Imaged Capillary Isoelectric Focusing
IEF	Isoelectric Focusing

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

2D-GEL	Two-Dimensional Gel Electrophoresis
RP-UPLC	Reversed-Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography
LC/MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
RP-HPLC	Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography
HIC-HPLC	Hydrophobic Interaction Chromatography-High Performance Liquid Chromatography
IEX-HPLC / IEC	Ion-Exchange Chromatography-High Performance Liquid Chromatography
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
CD (FarUV-CD / NearUV-CD)	Circular Dichroism
HDX-MS	Hydrogen-Deuterium Exchange Mass Spectrometry
DSC	Differential Scanning Calorimetry
SE-HPLC	Size-Exclusion High-Performance Liquid Chromatography
DLS	Dynamic Light Scattering
AUC / SV-AUC	Analytical Ultracentrifugation / Sedimentation Velocity-Analytical Ultracentrifugation
CE-LIF	Capillary Electrophoresis-Laser-Induced Fluorescence
HILIC-UPLC/FLD	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Ultra-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection
HPAEC-PAD	High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection
CE-SDS / CE-SDS NGS	Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate / Next Generation CE-SDS
ESI-TOF	Electrospray Ionization-Time-of-Flight
PNase F	Peptide: N-Glycosidase F (used for deglycosylation)
NP-UPLC	Normal-Phase Ultra-Performance Liquid Chromatography
QTOF / LC/ESI-QTOF-MS	Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry / Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
AF4	Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
SPR	Surface Plasmon Resonance
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
ATR-FTIR	Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy
NMR (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR)	Nuclear Magnetic Resonance (Proton / Carbon-13)
COSY	Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
GC	Gas Chromatography
UV	Ultraviolet Spectroscopy
MALS	Multi-Angle Light Scattering
SLS	Static Light Scattering
RP-HPLC-UV	Reversed-Phase HPLC with Ultraviolet Detection

مطالعات ارزیابی کیفی سلول تولید کننده مولکول بیوسیمیلار به صورت جدول زیر است

Characterization of MCB and WCB for Mammalian Cell Lines (CHO, SP2/0, Vero)

Test Category	Test Performed	MCB	WCB	EPC
VIABILITY & GROWTH				
	Post-Thaw Viability	✓	✓	✓
	Doubling Time / Growth Kinetics	✓	✓	✓
IDENTITY				
	Species Identification (Isoenzyme / DNA Barcoding)	✓	(✓)	✓
	STR DNA Profiling	✓	✓	(✓)
PURITY & STERILITY				
	Sterility (Bacteria & Fungi)	✓	✓	✓
	Mycoplasma (Culture & PCR)	✓	✓	✓
VIRAL SAFETY				
	In Vitro Adventitious Virus Assay	✓	(Note 1)	✓
	In Vivo Adventitious Virus Test	✓	(Note 1)	✓
	Mouse Antibody Production (MAP)	✓ (Note 2)	(Note 1)	✓ (Note 2)
	Hamster Antibody Production (HAP)	✓ (Note 3)	(Note 1)	✓ (Note 3)
	Retrovirus Testing (TEM/Infectivity)	✓ (Note 4)	(Note 1)	✓ (Note 4)
	Virus-Specific PCR Panel (e.g., MMV, Bovine, Porcine)	✓	(Note 1)	✓
	Reverse Transcriptase (for Retrovirus)	(✓) (Note 4)	(Note 1)	✓ (Note 4)
GENETIC CHARACTERIZATION				
	Copy Number Analysis (qPCR/ddPCR)	✓	-	✓
	Sequence Verification (Sanger/NGS)	✓	-	✓
	Genetic Stability Assessment	✓	-	✓
PRODUCTIVITY				

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Test Category	Test Performed	MCB	WCB	EPC
	Specific Productivity / Titer	✓	-	✓

Notes:

1. **WCB Viral Testing:** Per ICH Q5A, viral testing for WCBs is generally not required if the MCB has been thoroughly tested and the WCB is derived under a well-controlled system.
2. **MAP Test:** Essential for cell lines of murine origin (like SP2/0) or those exposed to murine-derived materials.
3. **HAP Test:** Essential for cell lines of hamster origin (like BHK) or those exposed to hamster-derived materials. May be considered for VERO based on risk assessment.
4. **Retrovirus Testing:** A core battery for SP2/0. For CHO and VERO, it is performed to detect contamination with exogenous retroviruses, not endogenous ones.

Characterization of MCB and WCB for Hi-5 and Sf9 Insect Cell Lines

Test / Analysis Category	MCB (Master Cell Bank)	WCB (Working Cell Bank)	Recommended Method(s)
1. Identity			
Species Verification	✓	-	Isoenzyme Analysis by electrophoresis (e.g., on agarose gel).
Genetic Identity	✓	✓	DNA Fingerprinting: PCR-based methods like RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), or STR (Short Tandem Repeat) analysis.
Cell Morphology	✓	(Visual inspection)	Phase-Contrast Microscopy.
2. Purity (Freedom from Contaminants)			
Sterility (Bacteria & Fungi)	✓	✓	Direct Inoculation according to USP <71> or Membrane Filtration according to Ph. Eur. 2.6.27.
Mycoplasma	✓	✓	Culture Method (the gold standard, 28-day incubation) and/or Indicator Cell Culture (DNA staining with Hoechst 33258) per Ph. Eur. 2.6.7. Nucleic Acid Amplification Test (NAAT/PCR) as a rapid alternative.
Specific Insect Viruses	✓	(Reduced Panel or PCR)	PCR or RT-PCR with virus-specific primers for pathogens like: • *Insect Iridescent Virus (IIV-6)* • Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV) • Densonucleosis Virus (DNV) • Spodoptera exigua Ascovirus (SeAV)

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Test / Analysis Category	MCB (Master Cell Bank)	WCB (Working Cell Bank)	Recommended Method(s)
Broad Viral Screening	✓	-	Transmission Electron Microscopy (TEM).
Adventitious Viruses (General)	✓	-	In Vitro Assay: Inoculation of cell lysates/ supernatants onto a panel of indicator cell lines (e.g., Vero, MRC-5 for mammals; Sf9, Hi-5 for insects) and monitoring for Cytopathic Effect (CPE).
3. Genetic Stability & Function			
Viability & Growth Kinetics	✓	✓	Trypan Blue Exclusion (for viability) and Cell Counting (for growth curve: population doubling time, maximum cell density).
Karyotype Stability	✓	-	Karyotyping/Giemsa Banding of metaphase chromosomes.
Susceptibility to Baculovirus	✓	✓	Infection Test: Infect cells with a standard baculovirus (e.g., baculo-GFP) at a specific MOI and monitor infection progression via fluorescence or cell morphology.
4. Baculovirus-Specific Safety			
Freedom from Adventitious Baculovirus	✓	-	PCR with primers for common baculovirus genes (e.g., polyhedrin, gp64). In Vivo Assay: Amplify cell lysate in permissive cells and check for viral production (e.g., by plaque assay or TEM).

Characterization of MCB and WCB for yeast (*Pichia pastoris*)

Test / Analysis Category	MCB	WCB	Recommended Method(s)
1. Identity			
Species/Strain Verification	✓	✓	PCR Amplification of species-specific genomic sequences (e.g., AOX1 gene) or Sequencing of the D1/D2 domain of the 26S rRNA gene.
Plasmid/Expression Construct Identity	✓	✓	Restriction Endonuclease Mapping (Digestion) of isolated plasmid DNA followed by agarose gel electrophoresis. PCR of the HBsAg gene insert.
Host Strain Genotype	✓	(Confirmation from MCB)	Phenotypic Testing on selective media
2. Purity (Freedom from Contaminants)			

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Test / Analysis Category	MCB	WCB	Recommended Method(s)
Sterility (Bacteria & Fungi)	✓	✓	Membrane Filtration per USP <71>/Ph. Eur. 2.6.27 or Direct Inoculation of culture media.
Mycoplasma	✓	✓	Culture Method and/or Indicator Cell Culture (DNA staining) per Ph. Eur. PCR as a rapid method.
Bacteriophage & Yeast Viral Contaminants	✓	(Optional, or by process validation)	PCR for known yeast viruses (e.g., L-A virus). Plaque Assay or Biolayer Interferometry for bacteriophage detection.
Adventitious Viruses (General)	✓	-	In Vitro Assay: Inoculation of cell bank lysate onto a panel of mammalian indicator cell lines (e.g., Vero, MRC-5) and observation for Cytopathic Effect (CPE). In Vivo Assay (e.g., egg embryonation).
3. Genetic Stability			
Plasmid Sequence & Integrity	✓	(Targeted testing)	Full Plasmid Sequencing of multiple clones from the MCB. Sanger Sequencing of the HBsAg insert and critical regions from the WCB.
Plasmid Copy Number & Retention	✓	✓	qPCR to determine the average plasmid copy number per cell. Plating on Selective vs. Non-Selective Media to determine plasmid retention rate (>90% is typical).
Phenotypic Stability	✓	✓	Fermentation Performance in lab-scale bioreactors: Assess growth rate, methanol metabolism (if applicable), and consistent HBsAg expression levels compared to the MCB baseline.
4. Vector-Host System Specifics			
Integration into Genome (if applicable)	✓	✓	Southern Blot Analysis or Long-Range PCR.
Absence of Antibiotic Resistance Genes (if claimed)	✓	✓	PCR and Culture on media containing the relevant antibiotic.

Characterization for E. coli Cell Banks

Test Category	Test Performed	MCB	WCB	EPC
VIABILITY & GROWTH				
	Post-Thaw Viability (Cell Count)	✓	✓	(✓)
	Growth Kinetics (Doubling Time)	✓	✓	(✓)
	Plating Efficiency (CFU)	✓	✓	-

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

Test Category	Test Performed	MCB	WCB	EPC
IDENTITY				
	Genotypic Identity (DNA Fingerprinting)	✓	✓	(✓)
	Phenotypic Identity (Biochemical Profile)	✓	(✓)	-
	Plasmid Retention (without selection)	✓	-	✓
PURITY & STERILITY				
	Sterility (Bacteria & Fungi)	✓	✓	✓
	Bacteriophage Contamination	✓	-	(✓)
	Absence of Host Cell Proteins/Contaminants	-	-	✓
GENETIC CHARACTERIZATION				
	Plasmid Sequence Verification	✓	-	✓
	Plasmid Copy Number	✓	-	✓
	Restriction Map Analysis	✓	-	(✓)
	Genetic Stability (at or beyond EPC limit)	✓	-	✓
PRODUCT-SPECIFIC ANALYSIS				
	Expression Stability & Productivity	✓	-	✓

✓ = Routinely Performed. A core test for that bank type.

(✓) = May be performed or conditionally required. Often done as in-process testing or based on risk assessment.

- = Typically Not Performed. The test is not a standard requirement for this bank type.

پیوست E – مثال های رگولاتوری درباره حذف مطالعه تطبیقی اثربخشی/ایمنی «Waive CES»

۱ G-CSF (فیلوگراستیم/پگ فیلوگراستیم) الگوی کلاسیک حذف CES :

- موضع رگولاتوری (EMA) : در راهنمای اختصاصی rhG-CSF تصریح شده که با تحلیل های مقایسه ای قوی + PK/PD در داوطلبان سالم (HV) ، می توان بدون انجام CES در بیماران، بسندگی شواهد را نشان داد (ANC به عنوان PD حساس).
- ارزیابی های در پرونده فیلوگراستیم ارزیابی پاسخ PD در افراد سالم برای اثبات اثربخشی بیوسیمیلار rhG-CSF کافی تلقی می شود و چارچوب PK/PD به صورت روشن پذیرفته شده است.
- مصادیق منتشر شده (اتحادیه اروپا) : صفحه EPAR/PAR نشان می دهد بسته بالینی PD در HV است و نیازی به CES بیمار-محور جدید دیده نشده است. روند مشابه برای بسیاری از برنامه های پگ فیلوگراستیم گزارش شده است (برنامه به برنامه ممکن است تفاوت هایی وجود داشته باشد، ولی «الگوی PK/PD-محور» جافتاده است).

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

- موضع به روز FDA درباره PK/PD به جای CES (قابل تعمیم به G-CSF): اسناد و سخنرانی های FDA تصریح می کنند که بیوسیمیلارها می توانند صرفاً با PK و PD بیومارکرهای مناسب، بدون مطالعه اثربخشی تطبیقی، تأیید شوند؛ اغلب در HVها انجام می گیرد.

۲ PTH تری پاراتاید «CES-Light» (با اتکای اصلی به PK و PD ساده)

- نمونه روشن اتحادیه اروپا Terrosa/ RGB-10 : EPAR تصریح می کند (مطالعات اثربخشی/ایمنی انجام شده با Forsteo نیاز نیست برای Terrosa تکرار شود)؛ یک مطالعه PK در ۵۴ زن سالم هم ارزی مواجهه را نشان داده و اثر مشابه بر کلسیم خون به عنوان PD مکانیکی گزارش شده است .
- مستندات تکمیلی/برگه اطلاعات محصول : اسناد Terrosa و مرورهای علمی مرتبط، رویکرد BE-محور در HV با PD کلسیم و ایمنی/ایمونونسیته را تأیید می کنند

۳ مونوکلونال آنتی بادی ها — (mAbs) جریان جدید «Waive CES»

- جهت گیری FDA صریحاً اعلام می کند که وقتی PD بیومارکر حساس در دسترس باشد، PK/PD می تواند جایگزین CES شود و حتی در نبود PD مناسب، باید سنجید که آیا CES واقعاً عدم قطعیت معناداری را کم می کند یا خیر. برنامه ها می توانند در HV اجرا شوند اگر ایمنی اجازه دهد .
 - نخستین پذیرش حذف CES برای یک mAb پرونده اوستکینوماب/استلارا FDA برای اولین بار حذف CES را برای یک مونوکلونال آنتی بادی پذیرفته است و پرونده در مراحل آخر ورود به بازار قرار دارد و تحت بررسی قرار گرفته است .
- الگوی پیشنهادی برای ارزیابی و حذف CES در مونوکلونال آنتی بادی ها (mAbs) :
- تحلیل جامع و عملکرد مبتنی بر مکانیسم اثر (MoA) : شامل بررسی دقیق اتصال به هدف (binding/kinetics) ، ارزیابی عملکردهای Fc-effector در صورت ارتباط بالینی، و سنجش مسیرهای سیگنالینگ پایین دست مانند مهار فسفوریلاسیون STAT یا ترشح سیتوکاین ها. این مقایسه باید با پوشش کامل دامنه تغییرپذیری فرآورده مرجع (۴ تا ۶ سری ساخت) انجام شود.
- مطالعات فارماکوکینتیک (PK) : در جمعیت حساس و کم تغییر (ترجیحاً داوطلبان سالم در صورت ایمن بودن)، با تحلیل دقیق تأثیر آنتی بادی های ضد دارو (ADA) بر نتایج PK برای اطمینان از حساسیت کافی مطالعه.
- مطالعات فارماکودینامیک (PD) : در صورت وجود بیومارکر معتبر، باید از شاخصی استفاده شود که لزومی به تقلید اندپوینت اثربخشی بالینی ندارد، اما از نظر فارماکولوژیک بسیار حساس و مرتبط با مسیر عملکرد دارو است.

راهنمای مطالعات ثبت بیوسیمیلار			عنوان
۱۴۰۴/۰۸/۰۴	تاریخ شروع اجراء	GUI-DPNA-BIO-013	شماره
-	تاریخ اعتبار	00	شماره بازنگری

ارزیابی چندلایه ایمونوژنسیته: شامل سنجش ADA و Nab با روش‌های اعتبارسنجی شده و تحلیل اثر آن‌ها بر روی فارماکوکینتیک و پاسخ دارویی برای کنترل کامل عدم قطعیت‌های ایمنی.

برنامه برون‌یابی اندیکاسیون‌ها: بر پایه نگاشت دقیق مکانیسم اثر، رفتار فارماکوکینتیکی و داده‌های ایمنی، برای اثبات هم‌پوشانی منطقی در تمام موارد مصرف.