

基于免疫球蛋白 G 降解酶切和高效液相色谱的 抗体电荷异构体分析技术

苏阳, 王阳, 胡萍*

(神州细胞工程有限公司, 质量控制一部, 北京 100176)

摘要 **目的:**探索和优化单克隆抗体电荷异构体分析的酶切预处理和高效液相色谱检测方法。**方法:**采用和优化基于 Thermo ProPac™ WCX - 10 色谱柱的离子交换色谱检测方法, 以含 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐和 1 mol · L⁻¹ 氯化钠缓冲液 (pH 6.3) 为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.5 mL · min⁻¹, 检测信号为波长 280 nm 吸收度, 采用免疫球蛋白 G 降解酶 (IdeS) 切前后的电荷异构体检测, 并对方法的专属性、线性、重复性、精密度等指标进行考察。**结果:**基于阳离子交换色谱 (CEX) 方法和酶切处理, 以几种商品化抗体为例, 展示该方法的应用, 对完整的 IgGs 与 IdeS 酶切产生的 F(ab')₂ 和 Fc 区域进行比较分析提供更详细和更特异的电荷异构体信息。通过方法学验证, 空白溶剂无干扰峰出现, 进样量在 10 ~ 80 μg 范围内, 进样量与峰面积的线性关系良好 ($R^2 = 1.000$); 6 次进样测得的峰面积 RSD 为 0.52%; 日间精密度 3.3%; 耐用性良好; 在 24 h 内样本基本稳定, 测得的峰面积 RSD 为 3.5%; 3 批样品检测结果的峰面积 RSD 为 2.5%。**结论:**该方法可用于全流程的抗体药物研发, 包括早期阶段的分子筛选, 中期产业化的工艺开发, 直至产品上市质量标准和稳定性研究。**关键词:** 阳离子交换色谱; 电荷异构体; 脱酰胺; 免疫球蛋白 G 降解酶 (IdeS 酶); 单克隆抗体; 抗体稳定性; 质量控制

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793 (2021) 12 - 2078 - 09

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2021.12.05

Charge heterogeneity analysis of therapeutic antibody based on IgG - degrading enzyme of streptococcus pyogenes and cation exchange chromatography

SU Yang, WANG Yang, HU Ping *

(Sinocelltech Ltd., Quality Control Department I, Beijing 100176, China)

Abstract Objective: To explore and optimize enzyme digestion pretreatment and high - performance liquid chromatography for charge isomer analysis of monoclonal antibody. **Methods:** An ion - exchange chromatography method based on Thermo ProPac™ WCX - 10 column was adopted and optimized. The phosphate buffer solution (pH 6.3) containing 10 mmol · L⁻¹ phosphate and 1 mol · L⁻¹ sodium chloride was used as mobile phase for gradient elution. The flow rate was 0.5 mL · min⁻¹, and the detection wavelength for protein adsorbance was 280 nm. Charge isomers were detected before and after IdeS cutting, and the specificity, linearity, repeatability and

* 通信作者 Tel: (010) 58628288; E - mail: ping_hu@sinocelltech.com

第一作者 Tel: 18842351246; E - mail: 942123205@qq.com

precision of the method were investigated. **Results:** The method was applied to several commercial antibody products as examples of demonstrating the method application based on cation exchange chromatography (CEX) and enzyme digestion. Results of comparative analyses of the intact IgG versus $F(ab')_2$ and Fc sub-domains generated by IdeS digestion provide more specific information about the location of the charge differences. There was no interference peak in the blank solvent; the linear relationship between the sample volume and the absorption peak was good within the range of 10 – 80 μg , with R^2 being 1.0; the RSD of the peak area for six injections was 0.52%; The daytime precision was 3.3%; the assay has good durability; the sample was stable within 24 h, and the RSD of the peak was 3.5%; the RSD of the peak area for the three batches of samples was 2.5%.

Conclusion: The method could be applied to the whole process of antibody drug development, including molecular screening in the early stage, industrial process development in the middle stage, and product quality standards and stability studies.

Keywords: cation exchange chromatography; charge heterogeneity; IgG – degrading enzyme of *Streptococcus pyogenes* (IdeS); antibody; antibody stability; deamidation; quality control

重组单克隆抗体(mAb)产品中有很多可能的异构体,他们包括来自翻译后修饰以及物理和化学机理所致降解,在过去的20年中已有大量报道^[1],这些异构体的形成有可能发生在产品整个生产和使用周期内的任何阶段。有文献报道,仅与电荷相关的翻译后修饰(如N-末端谷氨酸环化、C-末端赖氨酸截除、脱酰胺、氧化、唾液酸修饰等)的异质性即可达 10^8 种可能^[2],变体能够通过改变电荷基团的数量或结构或位置,使抗体表面电荷发生变化,造成电荷异质性,当其含量达到或超过一定限度时就会对抗体的结构、稳定性和生物功能产生影响,因此,抗体的电荷异构体成为需要重点关注的产品质量参数。

抗体的电荷异质性可以借助常规的毛细管等电点电泳(capillary isoelectric focusing electrophoresis, cIEFE)、离子交换色谱(ion exchange chromatography, IEC)、及疏水作用色谱(hydrophobic interaction chromatography, HIC)等分析手段进行分离和检测^[1],也可以使用质谱或质谱肽图法进行更细致的分析。最常用且高通量分析这类异质体的技术是阳离子交换色谱法(CEX-HPLC),将样品中的各组分依照其组分的表面电荷与介子相互作用的差异进行分离,根据出峰时间可将抗体或任何蛋白所含电荷异构体分为(位于靶值的)主峰和相对主峰位移的酸性峰和碱性峰。天冬酰胺的去酰胺化^[3-7]、赖氨酸的糖基化^[8-10]、二硫键的错配^[11-13]、三硫键的形成^[14]以及糖基化中的唾液酸^[15]等都会引起抗体酸性电荷变体的形成,C-末端赖氨酸的切除^[16]、N-末端焦谷氨

酸的形成^[17]、天冬氨酸的异构化^[4]及脯氨酸的酰胺化^[18],甚至抗体的多聚体^[19]等则会引起抗体碱性电荷变体的形成。电荷变体的产生,尤其是某些关键位点,可能会直接影响到抗体药物的结合能力、生物学活性、药代动力学、免疫原性以及结构稳定性等,进而影响到药物在临床使用时的有效性和安全性,因此,电荷变体是抗体生物药品的一类重要的质量属性。

恒定域的电荷修饰(如脱酰胺)通常是每个IgG亚型,甚至每个蛋白分子的常见修饰,而影响可变域的修饰,尤其是互补决定区(CRD),则需要特别关注,其对mAb结合和活性的潜在影响需要进行深入研究。目前文献中已有大量报道采用木瓜蛋白酶将重组mAb片段化为Fab和Fc,并采用肽图和CEX法对其进行分析,但研究和应用中发现这种方法在铰链区进行高度特异性切割后通过CEX研究mAb的关键质量属性的想法很难实现,其原因主要是来自木瓜蛋白酶切的特异性和可控性有限。因此,尝试引入IdeS(immunoglobulin G – degrading enzyme of *streptococcus pyogenes*)酶做mAb电荷异构体检测的预处理,发现它不仅可快速生成 $F(ab')_2$ 和Fc片段,而且不会过度消化或进一步降解,保证了分析方法的稳定性和重复性。

本文描述了1种快速分析技术平台,用于评估单克隆抗体的电荷变体,主要基于阳离子交换色谱(CEX)对完整的IgG与IdeS酶解后产物的对比方法确定抗体电荷变体的生成位置,结果可展示抗体

电荷变体、修饰或降解位点是否位于抗体的 F(ab')₂ 和 Fc 区域。该方法不仅可用于抗体药物研发的早期筛选先导分子,即筛选出易于开发的最佳候选抗体(最佳克隆、最佳配方),并可对比不同批次的差异性,而且也可以进一步用于 mAb 产品的质量控制在生产工艺开发和制剂配方的建立。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

U3000 高效液相色谱仪,包括 UV 检测器,四元低压梯度泵,在线真空脱气机,自动进样器,柱温箱(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);XL4 Capsule 超纯水(Opticap 公司);SB-800D 超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司);MSU623S-1CE-D1 千分之一电子天平(sartorius 公司)。

1.2 试剂

修美乐样品:批号 84354XH02, 07051XH01, 80318XH01, 84354XH02, 1102639, 均购于艾伯维公

司;美罗华样品:批号 H0256, 购于 Roche 公司;安维汀样品:批号 H0196B04, 购于 Roche 公司;羧肽酶 B, 货号 C9584, 购于 Sigma 公司;FabRICATOR 酶(即 IdeS 酶), 货号 AO-FR1-020, 购于 GENOVIS 公司, 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(NaH₂PO₄ · 2H₂O 和 Na₂HPO₄ · 12H₂O, 用磷酸和氢氧化钠溶液调 pH 6.3 和 7.0); 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐/1 mol · L⁻¹ 氯化钠(在 1 L 磷酸盐缓冲液中加入 58.4 g 氯化钠, 使终浓度为 1 mol · L⁻¹ 氯化钠和 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐, 并用磷酸或氢氧化钠溶液调 pH 6.3)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

ThermoProPac™ WCX-10 色谱柱(4 mm × 250 mm), 流动相 A 为 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.3), 流动相 B 为 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐/1 mol · L⁻¹ 氯化钠(pH 6.3), 柱温为 35 °C, 进样体积为 40 μL, 流速为 0.5 mL · min⁻¹, 修美乐、美罗华和安维汀样品洗脱梯度如表 1 和表 2 所示。

表 1 修美乐洗脱梯度

Tab. 1 Humira elution gradient

时间(time)/min	流动相 A(mobile phase)/%	流动相 B(mobile phase)/%	流速(flow rate)/(mL · min ⁻¹)
0	100	0	0.5
45.00	84	16	0.5
55.00	0	100	0.5
55.01	100	0	0.5
75.00	100	0	0.5

表 2 美罗华和安维汀洗脱梯度

Tab. 2 Rituximab, avastin elution gradient

时间(time)/min	流动相 A(mobile phase)/%	流动相 B(mobile phase)/%	流速(flow rate)/(mL · min ⁻¹)
0	100	0	0.5
45.00	87	13	0.5
55.00	0	100	0.5
55.01	100	0	0.5
75.00	100	0	0.5

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液 取修美乐、美罗华、安维汀, 分别加入 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0) 稀释成 1 mg · mL⁻¹ 的溶液。

2.2.2 酶切后供试品溶液 取 50 μg 的修美乐样品

与 50 U(2.5 μL) 的 IdeS 酶混匀, 37 °C 水浴孵育 1 h; 取 50 μg 的修美乐样品与 10 μL 羧肽酶 B 混匀, 37 °C 水浴孵育 2 h, 取酶切产物, 加入 50 U(2.5 μL) 的 IdeS 酶混匀, 37 °C 水浴孵育 1 h; 取 50 μg 的美罗华样品与 50 U(2.5 μL) 的 IdeS 酶混匀, 37 °C 水浴孵育

1 h;取 50 μg 的安维汀样品与 50 U(2.5 μL)的 IdeS 酶混匀,37 °C 水浴孵育 1 h。

2.2.3 空白对照溶液 取 10 μL 羧肽酶 B 与 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)混匀,37 °C 水浴孵育 2 h,再加入 50 U(2.5 μL)的 IdeS 酶混匀,37 °C 水浴孵育 1 h;取 50 U(2.5 μL)的 IdeS 与 10 mmol · L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.0)混匀,37 °C 水浴孵育 1 h。

2.3 结果

本研究选择 3 个市场上常见的治疗性单克隆抗体 IgG1,也是生物类似药物研发的热点产品,其等电点范围为 8.5~9.2,适用于 Fekete 等^[20-21]所描述的盐梯度模式 CEX 的碱性范围。在 IMGT 数据库中可找到修美乐、美罗华和安维汀的氨基酸序列,由于它们的 CDR 区序列不同,其 F(ab')₂ 的序列不同,但 Fc 部分的序列具有高度的相似性。完整的 mAb 被

IdeS 酶切后的 Fc 区(等电点较低)在保留时间为 10~25 min 之间洗脱,而他们的 F(ab')₂ 区(等电点相对较高)会在不同的保留时间内被洗脱。

2.3.1 修美乐 文献中也广泛报道修美乐的电荷变异体通常采用 cIEF 和 CEX 方法进行表征分析,当用羧肽酶 B(CpB)处理时,可见其碱性区的一部分异质性来自 C-末端的赖氨酸,包括全抗体分子有 1 个(K1)和 2 个(K2)赖氨酸。

通过 IdeS 酶切修美乐样品(图 1B)可清晰地检测到 F(ab')₂ 区和 Fc 区域,SDS-PAGE 结果显示 IDES 处理后样品的表观分子量约为 25 和 100 kDa 2 个组分,分别是 Fc 和 F(ab')₂。CEX 可以使 Fc 和 F(ab')₂ 2 个成分达到很好的分离(图 1),Fc 区含有碱性电荷异构体,而 F(ab')₂ 部分含有少量酸性电荷异构体,很显然,这种分析提供比未处理样品 CEX 更详细的信息。

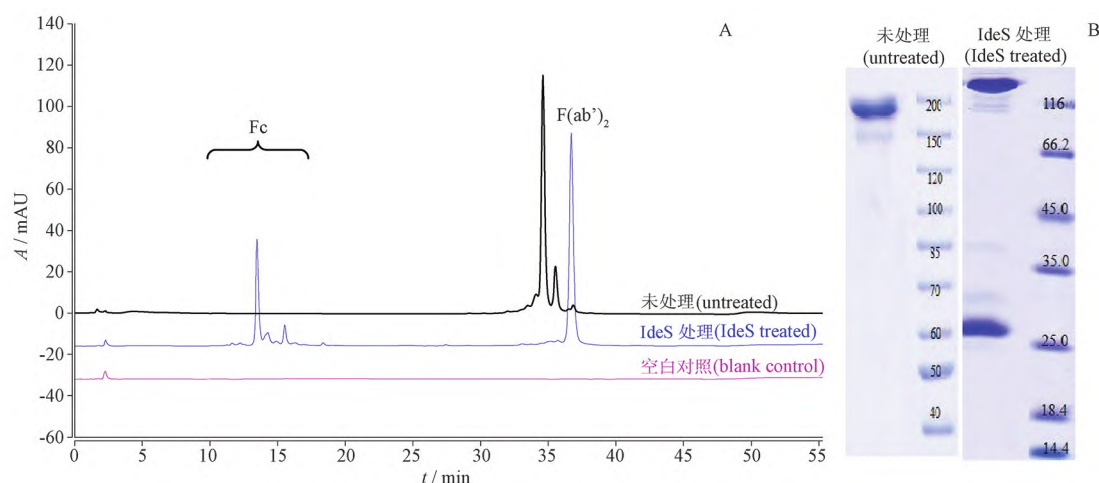


图 1 CEX-HPLC(A)及非还原 SDS-PAGE 分析 IdeS 酶切前后的修美乐(B)

Fig. 1 Humira analyzed either intact or IdeS digested within identical analytical conditions by CEX-HPLC(A) and non-reductive SDS-PAGE(B)

然后加入 CpB 酶,F(ab')₂ 区基本无变化,Fc 区碱性区的 K1 和 K2 减小,K0 升高,确定其为 C-末端赖氨酸变体(图 2)。

2.3.2 美罗华 对于美罗华单抗,通过 IdeS 酶切和 CEX 的对比研究可以得到常规未处理样品 CEX 所得不到的结构信息。如图 3 所示,IdeS 酶切和 CEX 分离可以得到很纯的 F(ab')₂ 区和 Fc 区域蛋白段。未处理美罗华样品的 CEX 谱图显示其 C 末端赖氨酸已在生产过程中几乎被完全剪切掉,因

此,由赖氨酸存在引起的电荷变异体比例非常低。通过 IdeS 酶切美罗华样品可有效检测到 F(ab')₂ 区不仅具有部分酸性峰残留(很可能来自脱酰胺),而且不同于修美乐,其 F(ab')₂ 区域还含有碱性峰(图 3),部分碱性峰来自 N-末端氨基酸的的环化,这与已有多个文献报道的美罗华数据一致^[22]。另外,美罗华的 Fc 区除单个主峰贡献外,只有相对微小的酸性峰(Fc 区的脱酰胺)和碱性峰(C-末端赖氨酸残留)。

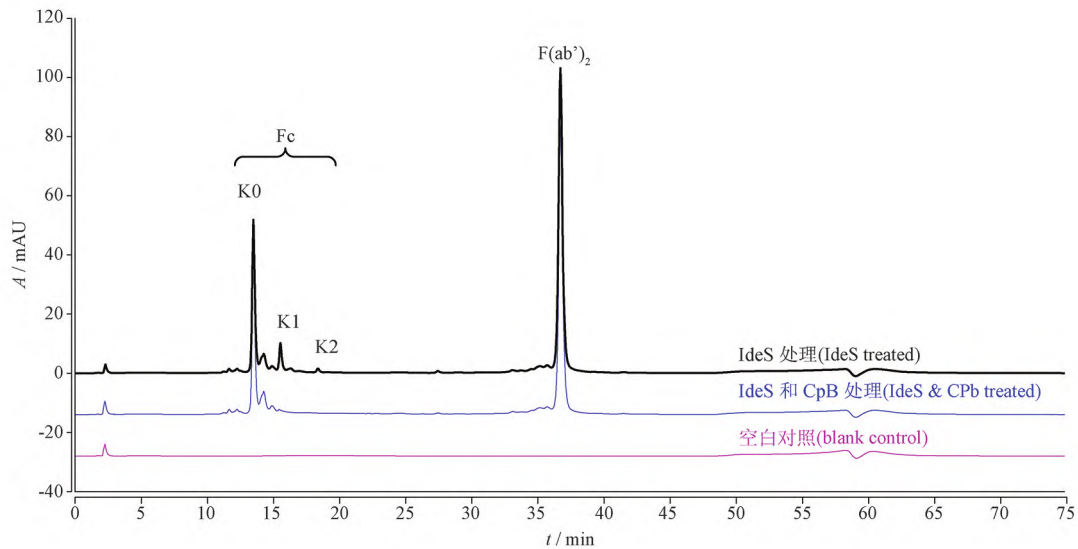


图2 CEX-HPLC 分析 IdeS 和 CpB 酶切后的修美乐

Fig. 2 Humira analyzed either IdeS digested or IdeS and CpB digested within identical analytical conditions by CEX-HPLC

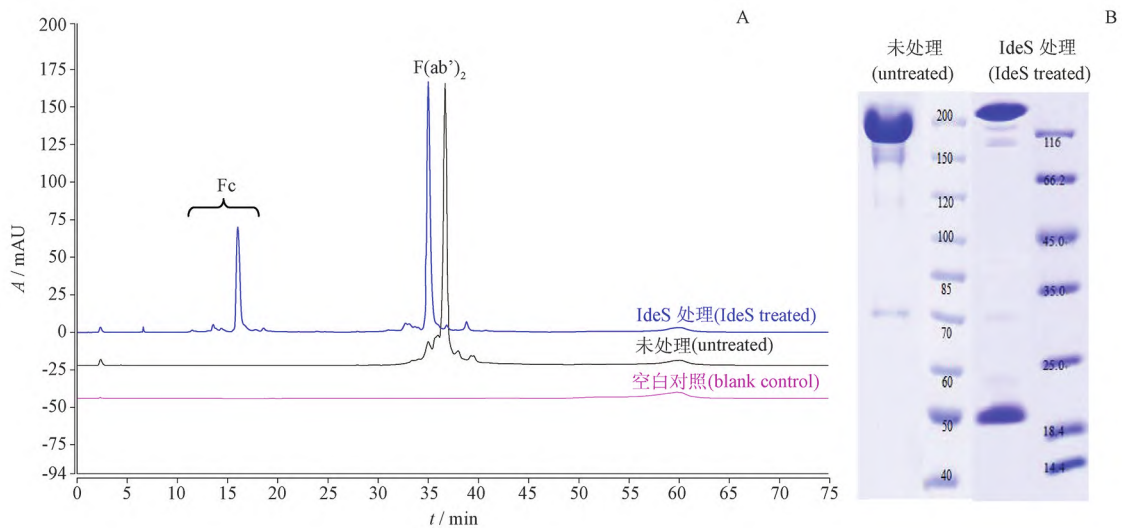


图3 CEX-HPLC(A) 及非还原 SDS-PAGE 分析 IdeS 酶切前后(B) 的美罗华

Fig. 3 Rituximab analyzed either intact or IdeS digested within identical analytical conditions by CEX-HPLC(A) and non-reductive SDS-PAGE(B)

2.3.3 安维汀 安维汀单抗的研究结果与美罗华类似(图4),由于C-末端赖氨酸在生产过程中几乎被完全剪切,由赖氨酸引起的电荷变异体比例非常低。IdeS 酶切前后的安维汀样品几乎没有因赖氨酸所致的电荷异构体,而且安维汀产品中的酸性异构体大多来自分子的 F(ab')₂ 区域。

作为本方法在抗体稳定性研究应用的范例,将安维汀在 45 °C 加速 0、1、2、4 周后,分别进行完整抗体和酶切分区域 [F(ab')₂、Fc] 的 CEX-HPLC

分析。

完整抗体的分析结果显示见图5。

随着安维汀样品在 45 °C 放置时间到 4 周时,安维汀的酸性区含量从 29.4% 增加到 49.1% (表3),该方法可有效检测到安维汀的脱酰胺情况,而且多个酸性峰的存在显示多个脱酰胺位点的贡献。

抗体安维汀经 IdeS 酶切后分区域 [Fc 和 F(ab')₂] 的分析结果显示见图6。

随着安维汀样品在 45 °C 中放置时间的增加,可

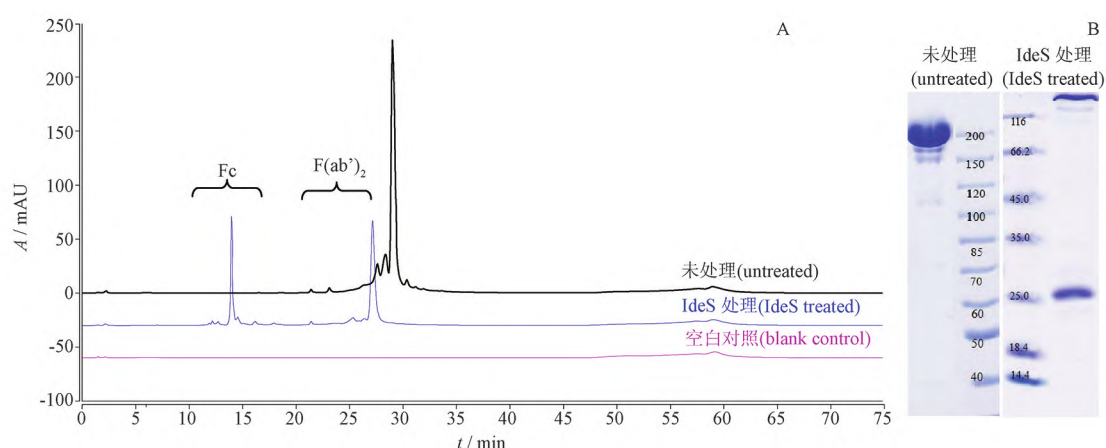


图4 CEX-HPLC(A)及非还原 SDS-PAGE 分析 IdeS 酶切前后(B)的安维汀

Fig. 4 Avastin analyzed either intact or IdeS digested within identical analytical conditions by CEX-HPLC(A) and non-reductive SDS-PAGE(B)

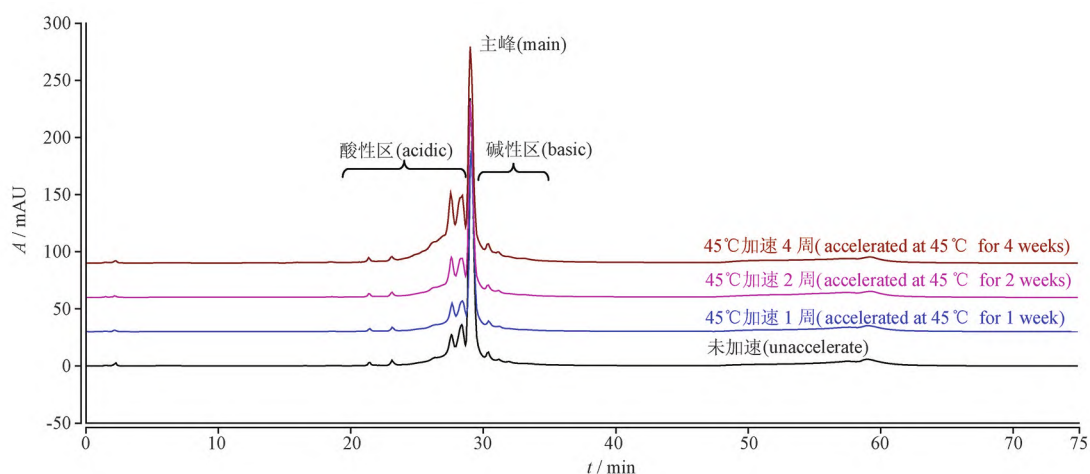


图5 CEX-HPLC 分析加速安维汀

Fig. 5 Analysis of accelerated Avastin by CEX-HPLC

表3 安维汀在 45 °C加速的 CEX-HPLC 数据

Tab. 3 CEX-HPLC data of Avastin acceleration at 45 °C

在 45 °C 放置时间(storage time at 45 °C)/周(week)	酸性峰(acidic)/%	主峰(main)/%	碱性峰(basic)/%
0	29.4	60.6	10.0
1	34.5	54.9	10.6
2	39.1	50.5	10.4
4	49.1	39.2	11.7

有效检测到安维汀酸性区增高(即脱酰胺水平增高),且脱酰胺发生在 Fc 区(图 6,酸性区含量由 9.9% 增加到 22.4%,表 4)和 F(ab')₂ 区(图 6,酸性区含量由 20.6% 增加到 35.1%,表 5)。同时,实验数据也支持 Fc 区和 F(ab')₂ 区脱酰胺存在对称位点,也存在多位点。

3 方法学验证

3.1 专属性和系统适用性考察

分别取空白对照溶液、修美乐(批号:07051XH01)IdeS 酶切后供试品溶液各 40 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。结果见图 7,酶切后供试品修美乐的 Fc 区域主峰保留时间 16.21 min,理论塔

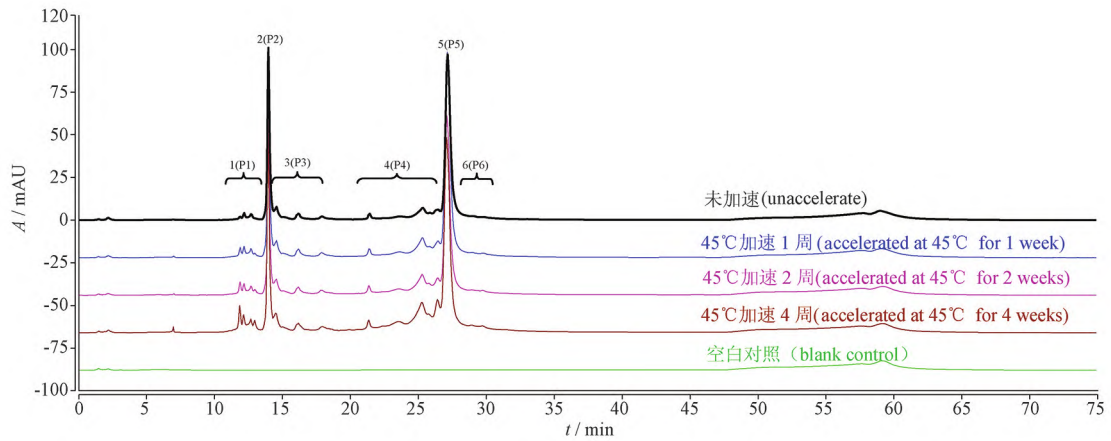


图 6 CEX-HPLC 分析 IdeS 酶切后的加速安维汀

Fig. 6 Analysis for accelerated Avastin of IdeS digestion by CEX-HPLC

表 4 Fc 区的电荷异质性结果

Tab. 4 Charge heterogeneity results in Fc region

在 45 °C 放置时间 (storage time at 45 °C) / 周 (week)	峰 1 (peak 1) / %	峰 2 (peak 2) / %	峰 3 (peak 3) / %
0	9.9	69.0	21.1
1	12.8	65.3	21.9
2	15.0	63.2	21.8
4	22.4	55.9	21.8

表 5 F(ab')₂ 区的电荷异质性结果

Tab. 5 Charge heterogeneity results in F(ab')₂ region

在 45 °C 放置时间 (storage time at 45 °C) / 周 (week)	峰 4 (peak 4) / %	峰 5 (peak 5) / %	峰 6 (peak 6) / %
0	20.6	74.1	5.3
1	24.0	70.8	5.2
2	26.7	67.5	5.8
4	35.1	58.6	6.3

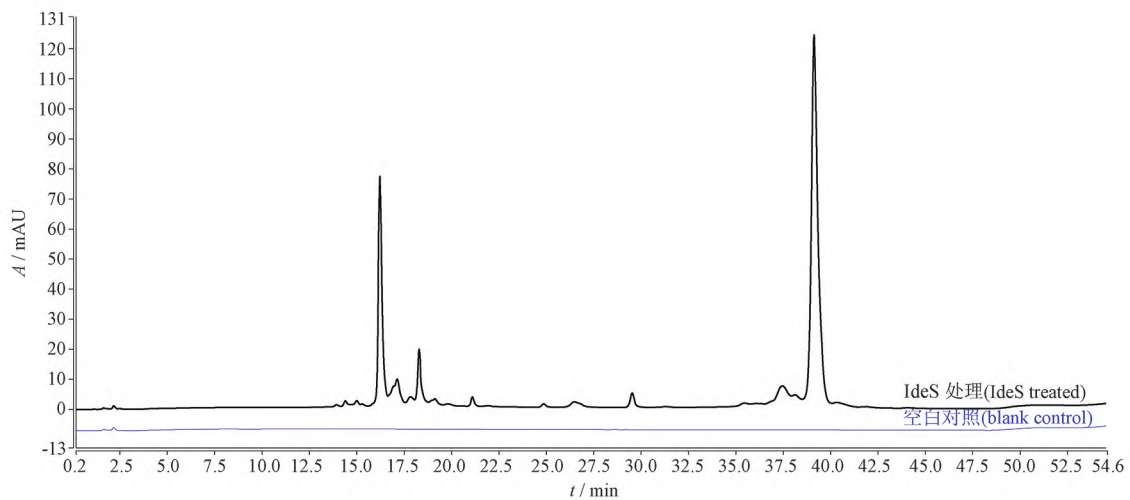


图 7 CEX-HPLC 分析 IdeS 酶切后的修美乐色谱图

Fig. 7 Chromatogram for IdeS digested Humira by CEX-HPLC

板数为 36752;酶切后供试品修美乐的 F(ab')₂ 区域主峰保留时间 39.13 min,理论塔板数 71058;空白对照品溶液无干扰峰出现。结果表明本方法的专属性和系统适用性良好。

3.2 线性关系

精确地吸取修美乐 IdeS 酶切后供试品溶液 10、20、40、60、80 μL(浓度 1 mg · mL⁻¹),在“2.1”色谱条件下,取上述酶切后供试品溶液分别进样分析,以峰面积 Y 对进样量(μg)进行回归,绘制标准曲线,计算各组分的回归方程:

$$Y = 2.713X + 1.008 \quad r^2 = 1.000$$

表明进样量在 10 ~ 80 μg 范围内与峰面积呈良好的线性关系,选择最佳进样量监测批次间一致性。

3.3 精密度试验

3.3.1 日内精密度 精确地吸取修美乐 IdeS 酶切后供试品溶液 40 μL(浓度 1 mg · mL⁻¹),在“2.1”项色谱条件下连续进样 6 次,记录色谱图峰面积,峰面积的 RSD 为 0.52%,保留时间的 RSD 为 0.040%,表明本方法的进样精密度良好。

3.3.2 日间精密度 精确地吸取修美乐 IdeS 酶切后供试品溶液 40 μL(浓度 1 mg · mL⁻¹),在“2.1”项色谱条件下连续 3 d 取酶切后供试品溶液,每天分别进样 3 次,记录色谱图峰面积,峰面积的 RSD 为 3.31%,保留时间的 RSD 为 0.19%,表明本方法的中间精密度良好。

3.4 耐用性试验

精确地吸取修美乐 IdeS 酶切后供试品溶液 40 μL(浓度 1 mg · mL⁻¹),在“2.1”项色谱条件下,设置柱温为 33、35、37 °C,考察温度控制对样品和检测方法的影响,记录色谱图峰面积,峰面积的 RSD 为 1.4%,保留时间的 RSD 为 0.21%,3 个不同温度结果无明显差别,表明本方法针对温度的耐用性良好。

3.5 稳定性试验

精确地吸取修美乐 IdeS 酶切后同一供试品溶液,分别在 0、4、8、12、24 h 进样 40 μL(浓度 1 mg · mL⁻¹),在“2.1”项色谱条件下,测定酶切后样品的峰面积 RSD 为 3.5%,表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

3.6 样品测定

取 3 批精确地吸取修美乐 IdeS 酶切后供试品溶液,在“2.1”项色谱条件下,分别进样 40 μL(浓度 1 mg · mL⁻¹),每批样品重复进样 2 次,批号为

80318XH01、84354XH02、1102639 的样品峰面积的 RSD 为 2.4%。

4 讨论

完整的 mAb 经 IdeS 酶切后进行 CEX 分析可获得更详细的关于电荷异构体结构和质量信息,本文展示的方法可有效、可靠地帮助抗体药物研究者分别探讨 Fc 和 F(ab')₂ 各自区域相关的酸性和碱性电荷异构体的含量和变化。通常,Fc 区域的酸性区可以考虑是天冬酰胺脱酰胺的贡献,Fc 区域的碱性区可能是由于 C-末端赖氨酸的不完全去除,或由肽基甘氨酸甲氧基化单氧合酶(PAM)催化的 C-末端脯氨酸酰胺化反应(-PCONH₂)^[23]。F(ab')₂ 区域的碱性区可能是由于 N 端不完全环化^[22]导致的,可表现为多个峰,而且如果 F(ab')₂ 区域出现酸性区分,应该引起重视,即需要建立或应用其他的分析方法进一步确认其来源和对药代、免疫原性和活性等产品质量的影响。

本研究的方法学考察结果表明,其专属性、线性、精密度、耐用性、稳定性良好,建立的方法适用于单抗的 Fc 和 F(ab')₂ 各区域相关的酸性和碱性电荷异构体表征考察和定量分析。

本研究展示 CEX 是 1 种快速、可靠的电荷异构体表征分析技术,结合简单、可靠、和特异的 IdeS 酶切技术可提供更深层次和定量的抗体结构、生物类似药相似性、产品批间一致性、和随时间及存储条件变化信息。而且,即使该酶切和色谱组合分析的局限性导致难以确定酸性和碱性变异体的准确来源,该方法也可以较方便和高效地用于收集相关液相色谱组分,然后利用质谱分析、或绘制肽图对比、或进行相关生物活性分析,对不同组分进行更深入、精确的表征和生物功能影响性分析。因此,该方法具有很广的通用性,有助于支持各个阶段的抗体药物开发、研制和质量把控。

参考文献

- [1] BECK A, WAGNER - ROUSSET E, AYOUB D, *et al*, Characterization of therapeutic antibodies and related products[J]. *Anal Chem*, 2013, 85(2):715
 - [2] 韦薇,罗建辉,尹红章,等. 重组单克隆抗体相关物质和相关杂质的研究与评价[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(8): 906
- WEI W, LUO JH, YIN HZ, *et al*, Comments on the development and assessment of the drug impurities and substances related to recombinant monoclonal antibodies [J]. *Chin J New Drugs*, 2014,

- 23(8):906
- [3] GERVAIS D. Protein deamidation in biopharmaceutical manufacture: understanding, control and impact[J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2016, 91(3): 569
- [4] HARRIS RJ, KABAKOFF B, MACCHI FD, *et al.* Identification of multiple sources of charge heterogeneity in a recombinant antibody [J]. *J Chromatogr B*, 2001, 752(2): 233
- [5] VLASAK J, BUSSAT M C, WANGS, *et al.* Identification and characterization of asparagines deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody[J]. *Anal Biochem*, 2009, 392(2): 145. PH
- [6] YAN B, STEEN S, HAMBLY D, *et al.* Succinimide formation at Asn 55 in the complementarity determining region of a recombinant monoclonal antibody IgG1 heavy chain[J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98(10):3509
- [7] ZHANG YT, HU J, PACE AL, *et al.* Characterization of asparagines 330 deamidation in an Fc – fragment of IgG1 using cation exchange chromatography and peptide mapping [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 965:65PH
- [8] GOETZE AM, LIU YD, ARROLL T, *et al.* Rates and impact of human antibody) glycation *in vivo* [J]. *Glycobiology*, 2012, 22(2):221
- [9] MILLER AK, HAMBLY DM, KERWIN BA, *et al.* Characterization of site – specific glycation during process development of a human therapeutic monoclonal antibody[J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(7): 2543
- [10] QUAN C, ALCALA E, PETKOVSKA I, *et al.* A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it affects charge – based behavior[J]. *Anal Biochem*, 2008, 373(2):179
- [11] DILLON TM, RICCI MS, VEZINA C, *et al.* Structural and functional characterization of disulfide isoforms of the human IgG2 subclass[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23):16206
- [12] WANG X, KUMAR S, SINGH SK. Disulfide scrambling in IgG2 monoclonal antibodies: insights from molecular dynamics simulations[J]. *Pharm Res*, 2011, 28(12): 3128
- [13] WYPYCH J, LI M, GUO A, *et al.* Human IgG2 antibodies display disulfide – mediated structural isoforms [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23):16194
- [14] PRISTATSKY R, COHEN SL, KRANTZ D, *et al.* Evidence for trisulfide bonds in a recombinant variant of a human IgG2 monoclonal antibody [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(15):6148
- [15] KHAWLI LA, GOSWAMI S, HUTCHINSON R, *et al.* Charge variants in IgG1: isolation, characterization, *in vitro* binding properties and pharmacokinetics in rats [J]. *MAbs*, 2010, 2(6):613
- [16] ANTES B, AMON S, RIZZI A, *et al.* Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis – Y specific IgG antibody and its relation to Fc – mediate defector function [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852(1–2): 250
- [17] DICK LW, KIM C, QIU D, *et al.* Determination of the origin of the N – terminal pyro – glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 97(3): 544
- [18] JOHNSON KA, PAISLEY – FLANGO K, TANGARONE BS, *et al.* Cation exchange – HPLC and mass spectrometry reveal C – terminal amidation of an IgG1 heavy chain[J]. *Anal Biochem*, 2007, 360(1):75
- [19] ISHII Y, TSUKAHARA M, WAKAMATSU K. A rapid method for simultaneous evaluation of free light chain content and aggregate content in culture media of Chinese hamster ovary cells expressing monoclonal antibodies for cell line screening [J]. *J Biosci Bioeng*, 2016, 121(4):464
- [20] FEKETE S, BECK A, FEKETE J, *et al.* Method development for the separation of monoclonal antibody charge variants in cation exchange chromatography, Part II: pH gradient approach [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 102: 282
- [21] FEKETE S, BECK A, GUILLARME D. Characterization of cation exchanger stationary phases applied for the separations of therapeutic monoclonal antibodies[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 111:169
- [22] DU Y, WALSH A, EHRICK R, *et al.* Chromatographic analysis of the acidic and basic species of recombinant monoclonal antibodies [J]. *MAbs*, 2012, 4(5):578
- [23] 张鑫涛 rCHO 细胞培养表达的单克隆抗体电荷异质性研究 [D]. 上海:华东理工大学,2017
- ZHANG XT. Study on Charge Heterogeneity of Monoclonal Antibody Produced in Reho Cell Cultures [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2017

(本文于2021年10月15日修改回)