

## · 综述 ·

# 抗体异质性对抗体药物功能和代谢影响的研究进展

王辰, 张哲文, 李盈淳, 张喜全, 赵伟\*

(正大天晴药业集团股份有限公司研究院, 南京 211100)

**摘要** 抗体药物常呈现微观不均一性, 即“异质性”, 包括糖基化、电荷、相对分子质量大小等相关的异构体。这些异构体绝大部分来自于“细胞工厂”对重组蛋白的翻译后修饰作用, 如聚体、降解、糖基化修饰、氧化、脱酰基化、二硫键错配等。这些修饰不仅对抗体的质量、安全性和有效性均可能造成影响, 而且也是整个抗体生产工艺的重要指征。本文对抗体糖基化、电荷及相对分子质量大小等异质性与药物有效性、安全性、药代动力学及免疫原性等的联系进行综述, 有助于进一步认识抗体结构与功能关系, 并希望为抗体药物尤其是生物类似药物的开发提供一定的依据和指导。

**关键词** 生物类似药; 新药研发; 抗体异质性; 糖基化

中图分类号 Q511; Q819 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)05-0614-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170518

引用本文 王辰, 张哲文, 李盈淳, 等. 抗体异质性对抗体药物功能和代谢影响的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(5):614–621.

Cite this article as: WANG Chen, ZHANG Zhewen, LI Yingchun, et al. Advances of the effects of antibody heterogeneity on the function and metabolism of monoclonal antibody drugs[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(5):614–621.

## Advances of the effects of antibody heterogeneity on the function and metabolism of monoclonal antibody drugs

WANG Chen, ZHANG Zhewen, LI Yingchun, ZHANG Xiquan, ZHAO Wei\*

Chia-Tai Tianqing Pharmaceutical Research Institute, Nanjing 211100, China

**Abstract** Antibody drugs often show “heterogeneity”, including the related isomers differing from one another in glycosylation, charge or molecular size. Most of these isomers come from post-translational modifications, such as aggregation, degradation, glycosylation, oxidation, deamidation or disulfide misfolding, of the recombinant protein in the “cell factories”. These modifications not only influence the quality, safety and efficacy of the antibodies, but also serve as an important indication of product quality throughout the whole process of antibody production. This paper reviews the relationship between glycosylation, charge and size heterogeneities of monoclonal antibodies and drug efficacy, safety, pharmacokinetics as well as immunogenicity, contributing to a better understanding of the relationship between antibody structure and function. It will provide some support and guidance for the research and development of antibody drugs, especially biosimilars.

**Key words** biosimilar; drug discovery; antibody heterogeneity; glycosylation

目前生物药物应用日趋广泛, 特别是抗体药物, 以其靶点明确、不良反应小、作用效果明显等优点, 占据了当代生物药物产业的主导地位。自1986年首个抗体药物OKT3<sup>TM</sup>上市以来, 抗体药物得到了迅速的发展, 截至目前, 全球共批准上市了

63个抗体药物。2014年, 全球销售额排名前10的药品中就有7个是抗体类生物药物, 总市值高达600亿美元。随着众多重磅炸弹级生物药物的专利保护陆续到期, 国内外都掀起了生物类似药的研发热潮。

然而,与小分子药物相比,生物大分子的单克隆抗体的结构要复杂得多,这无疑为生物类似药的研发及临床应用带来了挑战。抗体药物常呈现微观不均一性,即“异质性”<sup>[1]</sup>,糖基化、电荷、相对分子质量大小、形态等相关的异构体。这些异构体绝大部分来自于“细胞工厂”对重组蛋白的翻译后修饰作用,如聚体、降解、糖基化修饰、氧化、脱酰基化、二硫键错配等。这些修饰不仅对抗体的质量、安全性和有效性可能造成影响,而且也是整个生产工艺的重要指征<sup>[2]</sup>。随着质量源于设计(quality by design,QbD)理念<sup>[3]</sup>逐步在生物制药产业的深入,对异构体分离并进行性质鉴定已成为生物药物生产过程设计时必须考虑的因素。关键质量属性(critical quality attributes,CQAs)的确立也有赖于这些异构体对于药物活性、安全性等方面的信息。本文对抗体异质性与药物有效性、安全性、药代动力学及免疫原性等的联系进行综述,有助于进一步认识抗体结构与功能关系,并希望为抗体药物尤其是生物类似药物的开发提供一定的依据和指导。

单克隆抗体是由两条重链和两条轻链通过共价键和非共价键联合形成的生物大分子,每条链又由可变区和恒定区构成。同时,抗体可经木瓜蛋白酶水解为Fc和Fab片段。治疗性抗体在体内的生理活性主要由两个机制介导:一是引起靶标抗原中和或者凋亡的作用,主要通过Fab段识别并特异性结合抗原物质,抑制或者促进信号传导或者介导凋亡作用,该生理活性的作用依赖于抗体可变区与抗原的亲和力;二是抗体的免疫效应,主要包括抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity,ADCC)和补体依赖性细胞介导的细胞毒作用(complement dependent cellular cytotoxicity,CDC),抗体Fc段具有细胞毒作用效应细胞配体结合位点,可分别与NK细胞表面表达的Fc $\gamma$ R IIIa 和补体级联反应的补体C1q组分相结合,介导ADCC和CDC作用。因而,抗体Fab段的修饰会影响抗体抗原的亲和力,从而改变抗体的中和效应;而抗体Fc段的修饰也会对抗体的ADCC和CDC效应造成影响(图1)<sup>[4]</sup>。

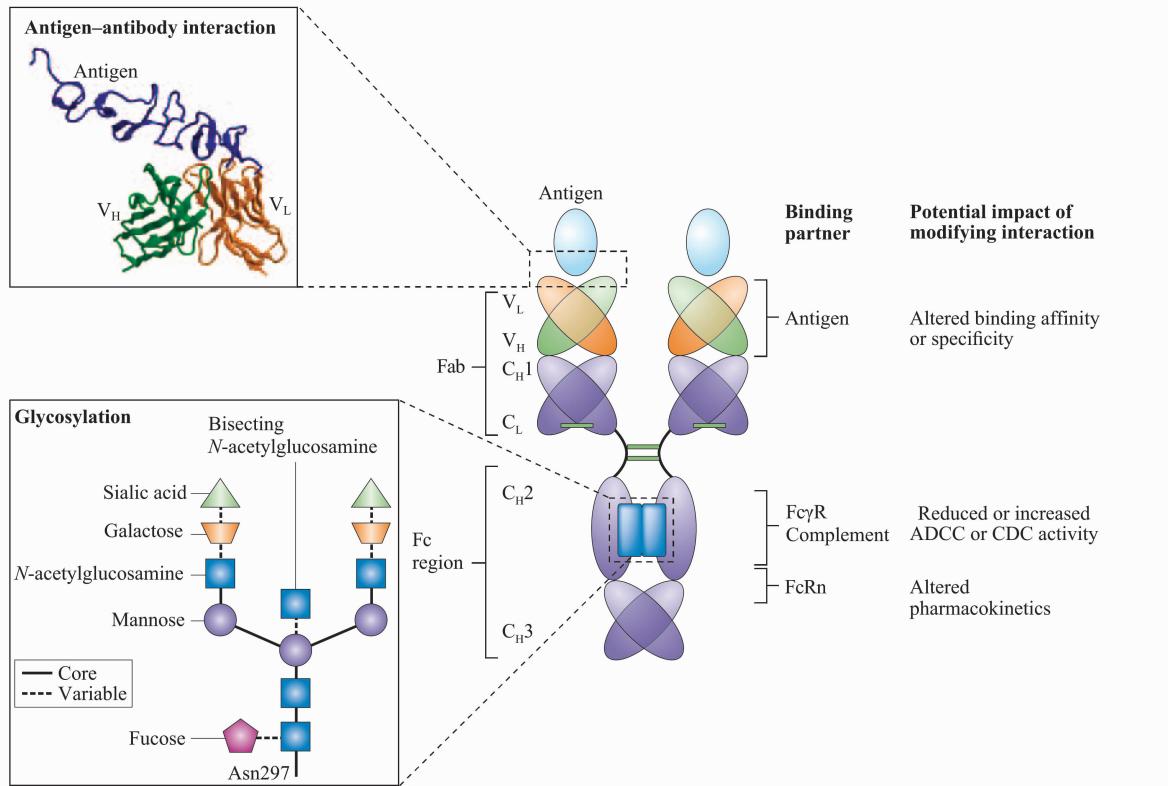


Figure 1 Pharmacodynamic mechanism of therapeutic antibodies<sup>[14]</sup>

## 1 糖基化异质性

蛋白质的糖基化以附连于天冬酰胺(N-连接)或丝氨酸/苏氨酸(O-连接)侧链的寡糖形式发生,其中前者是最主要的糖基化形式。研究表明,上市抗体均在其Fc段具有一个保守的N-糖基化修饰位点Asn297,大部分该位点修饰的聚糖为二分支双触角结构。由于具有不同的末端糖残基,如半乳糖、岩藻糖、甘露糖或唾液酸等,使抗体呈现出高度的异质性。根据分支糖链上半乳糖(G)的数量和连接方式以及是否具有岩藻糖(F)等可分为G0F,G1F,G2F等多种糖基化类型。目前美国和欧盟批准上市的大多数抗体均以CHO或SP2/0细胞(或NS0细胞)作为生产表达系统。虽然早期研究表明,哺乳细胞生产的抗体糖型与人类血清抗体基本相似,但仍然存在着一些差别:例如CHO细胞产生抗体存在着少量人体血清抗体所不具备的高甘露糖型修饰<sup>[5]</sup>;鼠SP2/0细胞(或NS0细胞)生产的抗体具有少量的人体所不存在的半乳糖- $\alpha$ -1,3-半乳糖修饰<sup>[6]</sup>。同时CHO细胞与鼠源细胞生产过程中产生的糖基化修饰也有所不同:鼠SP2/0细胞(或NS0细胞)具有与CHO细胞不同的唾液酸修饰,以N-羟乙酰基神经氨酸代替了人体中常见的N-乙酰基神经氨酸<sup>[7]</sup>;此外,CHO细胞生产抗体的半乳糖修饰水平更低,存在更多的G0F糖型<sup>[8]</sup>。这些糖基化修饰差异对抗体药物的体内活性、代谢及免疫原性等都会造成显著的影响。

此外研究表明,人血清中15%~25%的IgGFab段也存在N-糖基化修饰,糖基化位点集中分布于重链或轻链的CDR区及骨架区<sup>[9]</sup>。与Fc段糖基化不同的是,Fab段糖基化发生高度唾液酸化及半乳糖基化的概率更高,且Fab段高甘露糖结构也常有报道<sup>[10]</sup>。一些重组抗体如西妥昔单抗在重链可变区Asn 99存在Fab N-糖基化,该位点糖基化由于相对抗原结合位点具有较大的空间位阻,可能会严重影响抗体与抗原结合的亲和力<sup>[11]</sup>。

### 1.1 半乳糖修饰

半乳糖修饰对于抗体的CDC作用具有重要影响。研究表明,去除治疗性抗体Campath-1H CH2区域的半乳糖残基,在不改变ADCC活性的同时降低了其CDC活性<sup>[12]</sup>。同时又有报道指出,体外完全去除利妥昔Fc段Asn297位的半乳糖残基,其

CDC活性出现明显降低;然而体外添加完全半乳糖修饰,其CDC活性同样也出现了一定的下降:推测中等程度的末端半乳糖基化修饰对于抗体Fc段与C1q的结合是必需且最理想的,而过量的半乳糖修饰反而具有抑制效果。由此得出结论,若抗体药物的活性机制是以其CDC效应为基础,例如在利妥昔生物类似药的开发中,需要严格控制Fc段半乳糖修饰的水平<sup>[13]</sup>。迄今为止,还缺少抗体药物Fc段半乳糖修饰对安全性方面的直接关联数据,因此对于并非依靠CDC效应发挥主要活性的抗体药物,可以适当放宽对半乳糖修饰的控制。

抗体的半乳糖修饰对于其免疫原性也有重要影响:不同于CHO细胞,鼠源SP2/0细胞产生的抗体多存在半乳糖- $\alpha$ -1,3-半乳糖修饰<sup>[6]</sup>,而人体循环中有1%针对半乳糖- $\alpha$ -1,3-半乳糖的IgE抗体,因此具有该糖链结构的抗体易引发过敏反应。研究发现,美国部分区域使用来源于鼠源SP2/0细胞的西妥昔单抗治疗结直肠癌,具有极高的超敏反应发生率<sup>[6]</sup>。同时由于半乳糖- $\alpha$ -1,3-半乳糖修饰所引发的严重免疫原性,治疗性抗体的循环半衰期也会随之降低<sup>[3]</sup>。

### 1.2 岩藻糖修饰和平分型GlcNAc修饰

超过90%的CHO细胞生产抗体都存在岩藻糖修饰。核心岩藻糖对于抗体的ADCC效应影响重大,去除核心岩藻糖的抗体与FcγRⅢa有着很强的结合能力从而能明显提高ADCC效应<sup>[14]</sup>,同时CDC活性不受岩藻糖的影响<sup>[3]</sup>。平分型N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)修饰是糖蛋白N-聚糖核心的常见分支修饰形式,哺乳类动物细胞GlcNAc可由-1,4-GlcNAc转移酶Ⅲ(GnT-Ⅲ)催化形成平分型GlcNAc。高表达GnT-Ⅲ可以抑制哺乳类细胞N-聚糖核心结构的-1,6岩藻糖基化修饰,从而有效提高抗体的ADCC效应<sup>[15]</sup>。

### 1.3 高甘露糖修饰

工程细胞产生抗体存在着少量人体血清抗体所不具备的高甘露糖型修饰。试验表明具有高甘露糖结构的抗体在体内可与肝脏中甘露糖受体结合,加快抗体的血清清除速率,显著降低抗体的半衰期<sup>[16]</sup>。Alessandri等<sup>[17]</sup>实验证明高甘露糖修饰抗体的血浆清除速率比岩藻糖修饰组快40%,并指出抗体药物质量研究中应该对这种高甘露糖型进行重点检测,其存在及其比例可能会对抗体的药

代研究产生重要影响。而 Millward 等<sup>[18]</sup>研究却发现,高甘露糖基化抗体的半衰期与其他复杂聚糖修饰抗体相比并无明显差异,考虑高甘露糖修饰对于抗体药物半衰期的作用,可能需要根据抗体的具体属性来确定。

此外,高甘露糖结构也影响抗体药物的活性。类似于岩藻糖缺失抗体,具有高甘露糖结构的抗体与 FcR IIIa 有着很强的结合能力从而能明显提高 ADCC 活性<sup>[15]</sup>。当然,其对 ADCC 活性的作用可能得益于这种甘露糖结构在核心区域同样不具有岩藻糖修饰的缘故。同时,报道指出,抗体药物中存在的高甘露糖残基降低了抗体与 C1q 的结合能力,从而使得 CDC 活性明显下降<sup>[19]</sup>。

#### 1.4 唾液酸修饰

血清中抗体 Fc 段常常存在多种多样的唾液酸修饰,研究结果表明抗体的唾液酸化可以提高抗体的抗炎能力,同时通过下调抗体与 FcR IIIa 的亲和力,降低其 ADCC 活性<sup>[20]</sup>。此外研究发现,随着唾液酸修饰程度的增加,抗体的血清半衰期也随之升高<sup>[3]</sup>。

在哺乳动物表达系统产生的生物制剂中发现的唾液酸残基具有两种主要类型:*N*-乙酰基神经氨酸 (NeuAc, NANA) 和 *N*-羟乙酰基神经氨酸 (NeuGc, NGNA)。考虑到鼠 SP2/0 细胞(或 NS0 细胞)生产的抗体具有与人体血清中不同的 NGNA 唾液酸修饰,且已有关于 NGNA 在人体内的免疫原性报道<sup>[7]</sup>,控制 NeuAc: NeuGc 比率对于生物产品生产商来说至关重要的。但是,从实际情况来说大多数 NS0 生产抗体仅在 Fc 段存在极少的 NGNA 修饰(1% ~ 2%)。因此,上市的 NS0 或 SP2/0 抗体(例如 1998 年首次批准上市的帕利珠单抗),并未见与此糖型相关的严重不良事件报道<sup>[15]</sup>。

## 2 电荷异质性

在工程细胞表达过程中发生的多种翻译后修饰都会引起单克隆抗体的电荷异质性。采用离子交换色谱方法可将抗体大致分成 3 组峰,以阳离子交换色谱为例,中间峰为主峰,在主峰之前洗脱出峰的为酸性变异体峰,在主峰之后洗脱出峰的为碱性变异体峰<sup>[21]</sup>。其酸性峰来源于唾液酸化、脱酰胺、糖化、片段化抗体等,而其中对于 SP2/0 或 NS0 细胞所表达的单抗而言主要为唾液酸化修饰;碱性

峰则来源于 C 末端赖氨酸的不均一性、氧化、异构化、琥珀酰胺化等,其中主要为 C 末端赖氨酸的不均一性<sup>[21]</sup>。抗体的这种电荷异质性会影响抗体的稳定性、有效性、免疫原性或药代动力学,因此,在抗体药物工艺开发中,表面电荷不均一性检测作为质量考察的一个重要指标。

#### 2.1 Asn 脱酰胺和 Asp 异构化

Asn 脱酰胺和 Asp 异构化是抗体药物降解的主要原因,可直接影响抗体的体外稳定性、体内生物活性以及生物利用度等。Asn 脱酰胺后会生成琥珀酰亚胺,后者水解后生成 Asp 和 IsoAsp 的混合物<sup>[22]</sup>。在治疗性抗体生产和储存过程中,抗体的可变区,尤其是 CDR 区或者恒定区都可能存在脱酰胺反应。CDR 区域的脱酰胺直接影响到抗体和抗原的亲和力。赫赛汀是一种用于治疗 HER2<sup>+</sup>早期乳腺癌以及转移性胃癌的重组人 IgG1 抗体。近年来,针对赫赛汀的研究发现了一系列脱酰胺和异构化位点,其中 HC-Asp102 位的异构化作用极大的降低了药物的活性作用<sup>[22~23]</sup>。同时研究发现 Fc 片段具有一个保守的脱酰胺位点 Asn384,考虑到该残基位于 CH3 结构域,远离 FcRn 以及 FcR 结合位点,因而在此处发生的脱酰胺反应并不改变抗体相应的效应功能及循环半衰期<sup>[24]</sup>。琥珀酰亚胺是 Asn 脱酰胺和 Asp 异构化反应的中间体。多项研究证实,CDR 区琥珀酰亚胺的形成同样影响了抗体抗原的结合能力以及其效价<sup>[23]</sup>。

#### 2.2 糖化作用

糖化作用是葡萄糖或乳糖通过共价作用与抗体赖氨酸残基或是 N-端残基中的 NH2 基团连接的一种修饰形式<sup>[21]</sup>。Yuk 等<sup>[25]</sup>研究发现,在细胞培养过程中,较高的葡萄糖浓度可能会增加抗体的糖化程度。糖化反应可能会影响蛋白的生物学活性以及 PK 等参数,然而由于糖化作用发生于整个抗体分子,没有潜在糖化位点,因此发生糖化而导致的质量问题比较少见<sup>[3]</sup>。同时 Quan 等<sup>[26]</sup>研究证实发生在抗体重链 CDR 区域的糖化反应并不影响其与抗原的结合能力。另一项研究也表明,高度糖化的 IgG1 或 IgG2 抗体与非糖化的抗体相比与 FcR IIIa 和 FcRn 具有相当的亲和力<sup>[27]</sup>。由于人血清中普遍存在一定的葡萄糖,导致大部分人血浆蛋白均存在 10% ~ 20% 的糖化反应,因而糖化反应一般不会对免疫原性及安全性造成影响。

### 2.3 重链 C-末端赖氨酸的去除

IgG1 抗体重链的 C 末端常常具有赖氨酸(K)残基,而胞内的羧肽酶(CBP)可以特异性去除 C-末端的碱性氨基酸,但这种酶解往往不完全,因此抗体中往往呈现出多种脱赖氨酸的异构体(0 K, 1 K 和 2 K)<sup>[28]</sup>。这种 C-赖氨酸的不完全去除是抗体碱性变异峰的主要组成部分,通过对羧肽酶消化前后抗体色谱行为的比较可以有效阐明 C-赖氨酸占碱性组分的比重<sup>[21]</sup>。迄今为止的研究表明赖氨酸去除不影响抗体与抗原的结合、Fc 段介导的效应功能、抗体的半衰期以及其他生物学作用<sup>[21]</sup>。同时 DSC 研究也证实 C-末端的赖氨酸缺失与否并不影响 IgG1 抗体的热力学稳定性<sup>[29]</sup>。

### 2.4 N-焦谷氨酰化作用

抗体轻链和/或重链的 N 端谷氨酰胺可不完全环合成焦谷氨酸<sup>[21]</sup>。由于抗体的 N 端和 C 端并不具有与抗原或效应功能受体的结合位点,抗体的 N 端和 C 端发生的修饰并不影响抗体的结构、稳定性或者活性。研究发现,两条重链都具有 N-谷氨酰胺的抗体与只具有 1 个 N-谷氨酰胺的抗体生物活性方面并不具有差异性。

### 2.5 氧化作用

氧化作用也是一种常见的蛋白翻译后修饰,通常发生在蛋氨酸、色氨酸位点。其中蛋氨酸氧化在细胞培养、纯化、制剂以及储存过程中都有可能发生,是溶液形式的治疗用抗体发生降解的主要方式<sup>[30]</sup>。人 IgG1 Fc 段包含两个高度保守的蛋氨酸残基:CH2 结构域末端的 M252 和 CH3 结构域的 M428,均位于 CH2-CH3 界面,与多种配体结合位点非常靠近<sup>[31]</sup>,因而在该残基发生的氧化作用使得抗体与 protein A, protein G 以及 FcRn 的结合能力明显下降,抗体与 FcγR IIa 的亲和力略有下降<sup>[32-33]</sup>。此外,Wang 等<sup>[34]</sup>也发现蛋氨酸氧化还会导致体内半衰期的显著下降。同时也有报道指出,在某些情况下,氧化作用可能诱导聚体形成而引起一定的免疫原性<sup>[15]</sup>。

## 3 分子大小异质性

### 3.1 聚集

蛋白聚集是在发酵、纯化、制剂以及储存等各个制造过程中都普遍存在的问题,其对于抗体的质量、安全性和有效性都具有重要影响。考虑到聚集

体对于生物制品生物活性的作用,原料药及药物制剂产品中聚集体的水平是评估分子质量属性的关键因素<sup>[35]</sup>。众所周知,蛋白仅在折叠状态临界稳定,而大多数蛋白分子在被展开或部分展开的状态下具有形成聚集体的倾向,此时蛋白的高级结构被破坏,由此蛋白的疏水区域继而暴露,促进了分子间相互作用,从而易于发生聚集作用甚而引起随后的沉淀现象。聚体形成初期可以小的二聚体或片段存在,然后逐渐发展为更大的结构,例如亚可见或可见颗粒。聚集体的分子大小,结构以及可溶性决定了其对抗体生物学活性的影响程度。

聚体的存在会大大增加抗体的免疫原性,从而对抗体的安全性和有效性造成影响。蛋白聚集体在体内易引起免疫反应,直接导致一系列临床不良反应的发生,包括产生抑制药物治疗效应的中和性抗体(ADA);甚至与内源性蛋白发生交叉反应,造成严重的过敏性反应<sup>[36-38]</sup>。

### 3.2 片段

通过分子筛分析加速试验后的抗体样品经常能发现抗体片段化现象<sup>[39]</sup>。考虑到其可有效评估蛋白的纯度和完整性,单克隆抗体的片段化是亟需关注的关键质量属性。片段化产物是一个非常普遍存在的形式,通常来源于自发的或酶促反应引起的蛋白质的共价键断裂。蛋白质骨架在生理条件下极为稳定,但某些位点可能由于氨基酸序列(特定侧链的存在,可能会促进裂解)的功能、局部结构的延展性、溶剂的条件(pH、温度)以及金属或基团的存在会变得易于形成片段化产物<sup>[39]</sup>。

显而易见,断裂后的 Fab 片段产物不具有任何 Fc 段介导的抗体效应功能,其半衰期也明显下降;而 Fab + Fc 片段产物同样缺失需要两个 Fab 臂共同与靶向受体结合介导的活性作用。此外,有研究表明,片段化可通过改变聚集速率来影响单抗的质量属性。一项针对 IgG2 抗体的研究指出,聚集作用和片段化作用存在相互促进的因果联系,而更确切的发生机制还有待进一步研究<sup>[40]</sup>。

## 4 结构异构体

### 4.1 构象

蛋白质具有复杂的三维结构,其构象可根据所处的不同环境而发生巨大改变。这种构象的改变存在于整个制造过程中,可能由许多原因引起,包

括化学修饰(例如氧化和脱酰胺作用等)<sup>[41-42]</sup>。蛋白质三维结构的改变可导致生物活性的丧失,甚而形成可能引发免疫原性的新表位。例如细菌表达的包涵体在蛋白复折叠制造过程中就极易发生构象改变。治疗性蛋白的错误折叠,尤其是具有淀粉样特性的蛋白的错误折叠,对于提高生物制药的免疫原性以及破坏免疫耐受具有重要作用<sup>[3,43]</sup>。

#### 4.2 二硫键错误配对

二硫键广泛存在于原核和真核生物的激素、酶、免疫球蛋白、血浆、抑制剂和毒液等蛋白中,是一种常见的蛋白质翻译后修饰。IgG1型抗体中,共有16条二硫键,正确配对的链内、链间二硫键是维持重组抗体空间结构和发挥生物学功能的重要保障。而二硫键的错误配对可能会导致蛋白质结构和功能的改变。

二硫键插入一个硫原子所形成的三硫键已被发现普遍存在于IgG抗体中,研究表明其存在并不影响抗体的生物学活性、PK或是与抗原的结合能力<sup>[44]</sup>。抗体中的半胱氨酸残基一般存在于正确配对的二硫键中,然而人血清抗体以及重组抗体中常常也能检测到游离巯基,游离巯基的存在会破坏抗体结构,进而对药物的有效性产生影响。例如单克隆抗体Orthoclone,Xolair重链的CDR区均存在游离巯基,研究表明其存在造成了抗体效价的下降<sup>[45]</sup>。同时研究发现,具有大量游离巯基的IgG抗体更倾向于暴露疏水区域,而易于形成非共价聚体,从而导致抗体稳定性的下降<sup>[45]</sup>。此外,也有报道指出单克隆抗体中还存在游离半胱氨酸的半胱氨酸化以及非还原的硫醚键,然而这些翻译后修饰对于药物安全性和有效性的影响还未见报道<sup>[3,46-47]</sup>。

#### 5 结语

目前FDA和欧盟批准的63个抗体中除2个为大肠埃希菌表达无翻译后修饰外,所有的抗体均存在复杂的修饰作用并因此而呈现高度的异质性。研究表明,抗体糖基化、电荷性及分子大小等异质性对其药物功能和体内稳定性有着重要的影响。目前通过基因突变、特殊细胞模型等技术,已经可对抗体异质性与药物有效性、安全性、药代动力学及免疫原性等的关系进行比较透彻的分析。在此

基础上,旨在提高药物有效性和安全性,而对抗体进行定向改造的研究也在不断发展之中。基因泰克/罗氏公司基于GlycoMab™技术平台(该平台抗体生产细胞株为过量表达GnT-Ⅲ的CHO细胞系),研发出的ADCC加强型抗体Obinutuzumab(GA101),其ADCC活性可达利妥昔的100倍,已于2013年11月获得FDA“突破性疗法认定”<sup>[48]</sup>。中信国健选取CHO细胞代替NS0细胞作为西妥昔单抗的工程细胞株,研发生产的Biobetter药物CMAB009,可有效避免抗体药物的免疫原性,I期临床数据显示其较之原型药表现出更加令人满意的安全性数据<sup>[49]</sup>。北京天广实公司在针对赫赛汀的一项最新研究中,以LC-Gln30和HC-Glu102对两个降解位点LC-Asn30和HC-Asp102分别进行替换,在不改变药物活性的前提下,显著提高了抗体的稳定性<sup>[50]</sup>。

随着分析仪器和分析技术的不断更新,对抗体异质性的研究也越来越深入,这不仅有助于进一步认识抗体结构与功能关系,强大的分析方法也有利于对抗体药物尤其是生物类似药物进行质量和生产工艺的控制。此外,这也会促进新一代效用更高、半衰期更长并且不良反应更低的新型抗体药物产生。

#### 参考文献

- [1] Liu H, Gaza-Bulseco G, Faldu D, et al. Heterogeneity of monoclonal antibodies[J]. *J Pharm Sci*, 2008, **97**(7):2426-2447.
- [2] Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products [J]. *Anal Chem*, 2013, **85**(2):715-736.
- [3] Eon-Duval A, Broly H, Gleixner R. Quality attributes of recombinant therapeutic proteins: an assessment of impact on safety and efficacy as part of a quality by design development approach [J]. *Biotechnol Prog*, 2012, **28**(3):608-622.
- [4] Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design [J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, **6**(5):344-357.
- [5] Shi HH, Goudar CT. Recent advances in the understanding of biological implications and modulation methodologies of monoclonal antibody N-linked high mannose glycans [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2014, **111**(10):1907-1919.
- [6] Weiss J, Grilley Olson J, Deal AM, et al. Using the galactose- $\alpha$ -1,3-galactose enzyme-linked immunosorbent assay to predict anaphylaxis in response to cetuximab [J]. *Cancer*, 2016, **122**(11):1697-1701.
- [7] Liu L. Antibody glycosylation and its impact on the pharmacoki-

- netics and pharmacodynamics of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins[J]. *J Pharm Sci*, 2015, **104**(6):1866–1884.
- [8] Raju TS, Jordan RE. Galactosylation variations in marketed therapeutic antibodies[J]. *MAbs*, 2012, **4**(3):385–391.
- [9] van de Bovenkamp FS, Hafkenscheid L, Rispens T, et al. The emerging importance of IgG Fab glycosylation in immunity[J]. *J Immunol*, 2016, **196**:1435–1441.
- [10] Pathak Y, Benita S. *Antibody-Mediated Drug Delivery Systems: Concepts, Technology, and Applications* [M]. Hoboken: Wiley, 2012:157.
- [11] Fernandes D. Demonstrating comparability of antibody glycosylation during biomanufacturing[J]. *Eur Biopharm Rev*, 2005;106–110.
- [12] Reusch D, Tejada ML. Fc glycans of therapeutic antibodies as critical quality attributes[J]. *Glycobiology*, 2015, **25**(12):1325–1334.
- [13] Boyd PN, Lines AC, Patel AK. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H [J]. *Mol Immunol*, 1995, **32**(17/18):1311–1318.
- [14] Natsume A, Niwa R, Satoh M. Improving effector functions of antibodies for cancer treatment: enhancing ADCC and CDC[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2009, **3**:7–16.
- [15] Beck A, Reichert JM. Marketing approval of mogamulizumab: a triumph for glyco-engineering [J]. *MAbs*, 2012, **4**(4):419–425.
- [16] Pacis E, Yu M, Autsen J, et al. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation—what affects high mannose 5 glycoform[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**(10):2348–2358.
- [17] Alessandri L, Ouellette D, Acquah A, et al. Increased serum clearance of oligomannose species present on a human IgG1 molecule[J]. *MAbs*, 2012, **4**(4):509–520.
- [18] Millward TA, Heitzmann M, Bill K, et al. Effect of constant and variable domain glycosylation on pharmacokinetics of therapeutic antibodies in mice[J]. *Biologicals*, 2008, **36**(1):41–47.
- [19] Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2014, **34**(4):281–299.
- [20] Huhn C, Selman MH, Ruhaak LR, et al. IgG glycosylation analysis[J]. *Proteomics*, 2009, **9**(4):882–913.
- [21] 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):578–585.
- [22] Sydow J, Lipsmeier F, Larraillet V, et al. Structure-based prediction of asparagine and aspartate degradation sites in antibody variable regions[J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**(6):e100736.
- [23] 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):3509–3521.
- [24] Liu YD, van Enk JZ, Flynn GC. Human antibody Fc deamidation *in vivo*[J]. *Biologicals*, 2009, **37**(5):313–322.
- [25] Yuk IH, Zhang B, Yang Y, et al. Controlling glycation of recombinant antibody in fed-batch cell cultures[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**(11):2600–2610.
- [26] Quan C, Alcalá 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):179–191.
- [27] Goetze AM, Liu YD, Arroll T, et al. Rates and impact of human antibody glycation *in vivo*[J]. *Glycobiology*, 2012, **22**(2):221–234.
- [28] Hu Z, Zhang H, Haley B, et al. Carboxypeptidase D is the only enzyme responsible for antibody C-terminal lysine cleavage in Chinese hamster ovary (CHO) cells[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, **113**(10):2100–2106.
- [29] Liu H, Bulseco GG, Sun J. Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody[J]. *Immunol Lett*, 2006, **106**(2):144–153.
- [30] Correia IR. Stability of IgG isotypes in serum[J]. *MAbs*, 2010, **2**(3):221–232.
- [31] Gao X, Ji JA, Veeravalli K, et al. Effect of individual Fc methionine oxidation on FcRn binding: Met252 oxidation impairs FcRn binding more profoundly than Met428 oxidation[J]. *J Pharm Sci*, 2015, **104**(2):368–377.
- [32] Bertolotti-Ciarlet A, Wang W, Lownes R, et al. Impact of methionine oxidation on the binding of human IgG1 to Fc Rn and Fc gamma receptors[J]. *Mol Immunol*, 2009, **46**(8/9):1878–1882.
- [33] Pan H, Chen K, Chu L, et al. Methionine oxidation in human IgG2 Fc decreases binding affinities to protein A and FcRn[J]. *Protein Sci*, 2009, **18**(2):424–433.
- [34] Wang W, Vlasak J, Li Y, et al. Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies[J]. *Mol Immunol*, 2011, **48**(6/7):860–866.
- [35] 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):464–470.
- [36] Dengel S, Wehmer M, Hesse F, et al. Aggregation and chemical modification of monoclonal antibodies under upstream processing conditions[J]. *Pharm Res*, 2013, **30**(5):1380–1399.
- [37] Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, et al. Immunogenicity of therapeutic proteins: influence of aggregation[J]. *J Immunotoxicol*, 2014, **11**(2):99–109.
- [38] Roberts CJ. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control[J]. *Trends Biotechnol*, 2014, **32**(7):372–380.
- [39] Vlasak J, Ionescu R. Fragmentation of monoclonal antibodies[J]. *MAbs*, 2011, **3**(3):253–263.

- [40] Van Buren N, Rehder D, Gadgil H, et al. Elucidation of two major aggregation pathways in an IgG2 antibody [J]. *J Pharm Sci*, 2009, **98**(9):3013–3030.
- [41] Wei Z, Shacter E, Scheneman M, et al. The role of higher-order structure in defining biopharmaceutical quality [J]. *Bioprocess Int*, 2011, **9**:58–66.
- [42] Arbogast LW, Brinson RG, Formolo T, et al. 2D (1)H( N), (15)N Correlated NMR methods at natural abundance for obtaining structural Maps and statistical comparability of monoclonal antibodies [J]. *Pharm Res*, 2016, **33**(2):462–475.
- [43] Maas C, Hermeling S, Bouma B, et al. A role for protein misfolding in immunogenicity of biopharmaceuticals [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(4):2229–2236.
- [44] Gu S, Wen D, Weinreb PH, et al. Characterization of trisulfide modification in antibodies [J]. *Anal Biochem*, 2010, **400**(1):89–98.
- [45] Banks DD, Gadgil HS, Pipes GD, et al. Removal of cysteinylation from an unpaired sulfhydryl in the variable region of a recombinant monoclonal IgG1 antibody improves homogeneity, stability, and biological activity [J]. *J Pharm Sci*, 2008, **97**(2):775–790.
- [46] Liu H, May K. Disulfide bond structures of IgG molecules; structural variations, chemical modifications and possible impacts to stability and biological function [J]. *MAbs*, 2012, **4**(1):17–23.
- [47] Trexler-Schmidt M, Sargis S, Chiu J, et al. Identification and prevention of antibody disulfide bond reduction during cell culture manufacturing [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, **106**(3):452–461.
- [48] Hill BT, Kalaycio M. Profile of obinutuzumab for the treatment of patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia [J]. *Oncol Targets Ther*, 2015, **8**:2391–2397.
- [49] Wang C, He X, Zhou B, et al. Phase 1 study of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in patients with solid tumors [J]. *MAbs*, 2011, **3**(1):67–75.
- [50] Yang Y, Zhao J, Geng S, et al. Improving trastuzumab's stability profile by removing the two degradation hotspots [J]. *J Pharm Sci*, 2015, **104**(6):1960–1970.

