

生物药在生产过程中的稳定性问题及解决方案

方伟杰^{1*}, 黄永焯², 潘洪辉³, 胡兴江⁴

[摘要] 近年来,生物技术药物特别是单抗类生物药逐渐成为新药的研发主体。但蛋白质类生物药普遍存在结构复杂且不稳定的问题,尤其在生产过程中会经历多种不稳定性因素,造成生物药的降解和失活。生物药的制备工艺非常复杂,往往经历生物合成(如微生物发酵/细胞培养)、原液纯化和精制(如色谱纯化、除病毒)和制剂工艺(如制剂配置、无菌过滤、灌装、冻干和灯检)等各个生产以及储存、运输等环节。因此解决这些不稳定性问题是生物药最终成功应用于临床的关键。本文对生物药生产过程中的降解途径进行归纳,并提出相应的解决方案。

[关键词] 生物药;稳定性;生产过程;降解机制

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A

[文章编号] 1674-0440(2017)11-1012-07

DOI: 10.13220/j.cnki.jipr.2017.11.003



方伟杰,博士,浙江大学药学院副教授,兼任浙江省药学会生物制药专业青委会主任委员。主要从事生物药开发的关键技术及产业化研究。主持多项国家重大新药创制专项、国家自然科学基金等课题,为浙江省“千人计划”入选者、浙江省政府特聘专家,获2014年中国药学会-赛诺菲青年生物制药奖等荣誉。发表学术论文10余篇,申请专利11项,主持开发了10余项生物制剂并获新药临床批件。

Degradation of biotherapeutics during manufacturing processes and its solution

FANG Wei-jie^{1*}, HUANG Yong-zhuo², POON H. Fai³, HU Xing-jiang⁴

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. QuaCell Biotechnology Ltd., Zhongshan 528437, China; 4. Research Center for Clinical Pharmacy, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] Recently, biotherapeutics, especially monoclonal antibody-based biotherapeutics, have become increasingly important as novel therapeutic products. However, biotherapeutics are usually not only complex in structure, but also unstable, especially during the manufacturing bioprocesses, leading to their degradation and inactivation. The manufacturing processes are substantially complex, and generally include drug substance biosynthesis (*i.e.* fermentation or cell culture), purification and refinement (*i.e.* chromatography and viral clearance), and drug product formulation and fill-finish (*i.e.* compounding, sterilization, filling, freeze-drying and inspection). Therefore, it is of vital importance for biotherapeutics to remain stable during manufacturing processes. This review summarizes major factors that affect the degradation of biotherapeutics during manufacturing processes and proposes corresponding solutions in each step of the manufacturing process.

[Key words] biotherapeutics; stability; manufacturing process; degradation mechanism

随着生物技术(如重组DNA技术、淋巴细胞杂交瘤技术、噬菌体展示技术)和人类基因组学的发展,生物技术药物(生物药, biotherapeutics, biologics, biopharmaceuticals)特别是单抗类生物药逐渐成

为新药的研发主体^[1-3]。在近几年全球前10大最畅销的处方药物中生物药占了80%,在整个医药领域所占的比重也在逐年上升。相比传统的以化学合成为主的小分子药物,生物药主要是通过生物技术

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09J18107-002);国家自然科学基金资助项目(81741144)

作者简介(通讯作者):方伟杰, E-mail: wjfang@zju.edu.cn

作者单位:1. 310058 杭州,浙江大学药学院药物代谢与药物分析研究所(方伟杰); 2. 201203 上海,中国科学院上海药物研究所(黄永焯); 3. 528437 广东中山,中山康晟生物科技有限公司(潘洪辉); 4. 310003 杭州,浙江大学医学院附属第一医院临床药学研究中心(胡兴江)

方法特别是重组DNA技术来制备生产,具有高活性、高特异性和低毒性等特点,解决了许多传统小分子药物无法解决的医学难题,因此在挽救生命及改善患者生活质量方面发挥了越来越重要的作用。

但生物药的开发也面临诸多技术挑战。首先,生物药是生物大分子(相对分子质量通常在 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$),具有非常复杂的结构和组分^[4]。除一级结构即氨基酸序列,生物药通常还具有复杂的高级结构(如二级、三级甚至四级结构),这些高级结构是其发挥生物学活性的基础。同时,由于翻译后修饰、酶解及化学降解等因素,一般意义的生物药都是极复杂的混合物,含有百万甚至更多的分子。其次,生物药具有不稳定性,易发生化学降解和物理降解^[5-8]。化学降解涉及共价键的断裂和生成,而物理降解是生物药所特有,它们不涉及共价键的变化,而主要是蛋白质高级结构的改变,包括物理吸附(到疏水表面)、变性、解聚、聚集和沉淀。这些降解不仅会影响其生物学活性,还可能产生诸多安全性方面的问题。其次,和小分子药物不同,几乎所有的生物药均具有潜在的免疫原性,即能刺激机体形成特异抗体或致敏淋巴细胞的能力^[9-13]。除了和生物药本身的结构以外,免疫原性还和生物药的稳定性密切相关,特别是聚合物和蛋白质微粒^[14-17],易激发人体形成相应的抗体从而清除药物,影响药物的疗效,甚至由于交叉反应(cross reactivity)会中和(neutralization)人体内源性(endogenous)蛋白质。如使用人红细胞生成素(erythropoietin, Eprex[®])治疗时产生的抗体不仅会中和蛋白质药物,同时可结合人体内源性蛋白质使其失去活性,从而造成患者纯红细胞再生障碍^[18]。免疫反应还可能引发超敏反应,严重时甚至会危及患者生命。

影响生物药稳定性的因素较多。首先起决定性作用的是其内部分子结构如氨基酸序列、翻译后

修饰。其次是生物药所处的微环境,即处方因素如溶液的pH、盐离子以及影响蛋白质和周边环境发生相互作用的辅料,因其会影响生物药分子内和分子间的作用力^[6,19]。另外,蛋白质是非常精细的分子,生产过程可能会面临诸多外界破坏因素。生物药在生产过程中发生的某些细微变化(如构象)可能生产过程中或短期储存时难以通过现有分析技术观察到,但可能会影响长期储存过程的稳定性,从而对产品最终的质量产生较大的影响。生产设施、原辅料及包材的质量以及员工的培训和操作规范性也会对产品质量产生很大的影响。本文着重概述了生物药在生产过程中影响稳定性的常见问题并提出相应的解决方案。

1 生物药的制备工艺过程

生物药的制备工艺非常复杂,从其生物合成到最终分装成可临床使用的制剂通常需要经过生物合成(如微生物发酵/细胞培养)、原液纯化、精制(如色谱纯化、除病毒)和制剂工艺(如制剂配置、无菌过滤、灌装、冻干和灯检)等各个生产、储存及运输等环节(表1)。以目前最热门的抗体类生物药为例,一个典型的生产程序包括以下几个步骤:首先细胞株融化后在合理的生长环境进行逐步扩大,以最终满足生产的需要。在细胞培养过程中,生物药所处的环境包括细胞、各种蛋白质水解酶、营养物质和溶解氧等等,通常需要维持在相对较高的温度(>30℃)和中性pH条件下,保持≥10 d时间,直到足够的蛋白质合成并分泌至胞外为止。生物药合成结束后,通过离心或过滤的方法除去不溶性的细胞残渣,再将所含生物药的上清液通过亲和蛋白A色谱(protein A chromatography)、阳离子交换色谱和阴离子交换色谱等几步色谱柱纯化,并进行病毒的去和灭活。纯化后通过超滤或渗滤的方法把生物

表1 生物药的生产过程、不稳定性因素及解决方案

工艺步骤	不稳定因素	解决方案
微生物发酵/细胞培养	高温、pH、高盐、溶氧量,培养基如金属离子、氨基酸	优化发酵/培养条件,综合考虑细胞状态、表达量及产品稳定性
纯化(各种色谱法)	低pH、高盐、疏水表面吸附	选择合适色谱方法、避免极端条件、添加合适保护剂
除病毒/超滤	低pH、高温、表面活性剂、UV/γ射线、表面吸附、道南效应	优化除病毒及超滤条件,选择合适处方/保护剂、滤膜
原液冻融(如需要)	冰水表面降解、溶质浓缩、pH改变、低温变性	提高热力学稳定性和动力学稳定性、抑制疏水表面造成的降解、选择合理缓冲液
成品制备、灌装	局部浓度过高、pH、搅拌/机械力、气泡、接触表面、渗出物、光照(灯检)	选择合适处方、优化成品制备工艺、选择优质的材料
成品冻干(如需要)	冷冻、失水的破坏、粉末水分含量	选择合适保护剂及冻干曲线
储存、运输和使用	光照、振荡、高温、冻融,药物和包材相互作用	严格控制储存、运输和使用条件

药置换到适当的缓冲液里,通过原液(drug substance)保存,或加入最终制剂成分以半成品(final bulk)的形式保存。通过灌装到不同内包材(container-closure)得到成品,或进一步通过冷冻干燥处理制备成冻干粉末。在整个生产过程中,蛋白质经历了多种破坏因素,如低pH、高盐、冻融、光照、振荡、剪切以及各种(疏水)表面,这些因素都可能会造成蛋白质的结构变化或降解,从而影响生物药的质量,而每一个步骤都可通过优化设计来避免或降低造成的降解。

2 生物药在微生物发酵/细胞培养过程的降解及控制

微生物发酵/细胞培养工艺会影响其表达的蛋白质药物的稳定性,但关于生物药在微生物发酵/细胞培养过程中的稳定性研究报道不多,或说该问题还未受到足够的重视。造成这种现象可能的主要原因是,微生物发酵/细胞培养过程中更关注的是微生物/细胞生长及表达量的合适条件,而某些降解产物可通过后期的纯化除去,或因降解造成的蛋白质损失被认为是蛋白质表达不充分造成的。按照生物药研发的QbD原则以及FDA等相关指导原则,产品相关杂质最好能在生产的最前端被抑制,其次是通过纯化等工艺过程去除。如缺乏有效的除去方法,则要证明该杂质不会显著影响药物的安全性和有效性,但这会带来大量的额外研究,而且还存在由于研究针对性不强等一些不确定性因素的风险。所以优先的策略是考虑从源头抑制这些降解的产生。

造成蛋白质在微生物发酵/细胞培养过程中降解的因素有很多,首先是环境因素,如高温、中性pH、溶解氧、盐离子强度等^[20-23]。细胞培养的温度远高于通常的储存温度(如2~8℃),而和绝大多数化学反应一样,温度越高蛋白质的降解速度就越快。在中性pH条件下,很多蛋白质包括单抗更易发生聚集和脱酰胺化反应。较低浓度的溶解氧可能会造成蛋白质二硫键配对的不完全^[22-23]。另外,培养基的组分如金属离子(如铜离子)^[24]、氨基酸(如半胱氨酸)^[25]等也会影响生物药的质量,特别是会影响二硫键的形成及交换。优化的细胞培养条件可改善蛋白质的稳定性,但任何工艺必须同时具备有效性和可操作性。由于很多蛋白质的表达条件可能和蛋白质的稳定性相冲突,特别是微生物发酵/细胞培养条件的改变可能会影响目的蛋白表达量、细胞生长、工艺相关杂质和糖基化水平等。此时就要进行综合考量取舍优化。

3 生化药在纯化及除菌/除病毒过程中的降解及控制

3.1 纯化

纯化过程通常是用来去除杂质、提高药物纯度,但有些纯化过程的条件相对比较剧烈,蛋白质可能会发生降解。如用于纯化单抗的protein A亲和色谱通常需要在酸性条件(如pH 3~4)下进行洗脱,然而有些单抗对酸敏感,会造成生物药活性的降低或丢失。如抗CD52单抗阿仑珠单抗(alemtuzumab, Campath)在protein A色谱纯化后>25%发生了聚集^[26]。对于这些酸敏感蛋白,需要尽量减少洗脱时间,而洗脱下来后应及时中和洗脱液,或在较低温条件下洗脱。此外,使用优化的缓冲体系(如添加精氨酸)可显著抑制聚集的产生,提高抗体的回收率^[27]。

在离子交换色谱分离过程中,通常需要使用较高浓度的盐(如氯化钠和醋酸钠),还要调节溶液的pH以适合阴离子或阳离子交换色谱,同时确保这些条件不会影响蛋白质的质量^[28]。某些单抗对高盐较敏感,易形成蛋白质聚集如乳光和颗粒^[29]。我们发现用组氨酸作为缓冲液代替高盐进行洗脱,可有效抑制这类聚集反应(数据未发表)。

在疏水交换色谱中,蛋白质通过疏水基团和流动相的亲合力大小来进行分离,易吸附在疏水表面而变性^[30-31]。然而,它要比反相色谱温和得多,后者需要使用有机溶剂对蛋白质进行洗脱^[32]。也可采用在进样溶液或流动相中添加精氨酸的方法来提提高蛋白质的回收率^[33]。

3.2 灭菌/除病毒

由于生物药需要通过注射途径给药,灭菌/除病毒(sterilization and viral clearance)也是生物制药必须的工艺,主要包括物理去除法和化学灭活法。物理去除法是通过物理手段把细菌或病毒和生物药分离开,主要的方法有膜过滤法/纳滤法和色谱法。化学灭活法是通过化学方法灭活细菌或病毒,主要包括使用表面活性剂、加热、酸处理以及UV/γ-射线处理等。

热处理灭菌是指通过加热溶液至60℃维持10 h。在热处理灭菌时,需注意目标蛋白质是否能承受该条件^[34]。如人血白蛋白的融化温度(T_m)接近60℃,一般需要加入一些保护剂,如辛酸钠和乙酰色氨酸来提高 T_m 至>70℃后再进行热处理灭菌^[35]。同时还要注意一些杂蛋白的影响,特别是微量的、具有低融化温度的杂蛋白,这些杂质降解后形成的微粒将会成为蛋白质聚集的成核点(nucleation site),加速目标蛋白质的聚集。如溶液含蔗糖,还要考虑蔗

糖在高温条件下易发生水解反应形成葡萄糖和果糖,这两种还原型糖会和蛋白质的自由氨基发生 Maillard 反应,造成生物药的降解^[36]。

通过射线来灭菌,要注意因自由基引发的蛋白质化学和物理降解,通常需要加入一些自由基清除剂来保护蛋白质^[37]。

3.3 冻融

冻融是生物药生产中必须的过程,如在生产工艺不同步骤的等待过程,或变换厂区/转移等,也是原液长期保存的常用方法。另外,在成品运输或患者在家使用时也可能造成偶然性冻融。某些蛋白质对冻融非常敏感,特别是在无合适保护剂的情况下,极易造成蛋白质失活^[38]。所以,冻融实验也是制剂处方筛选必不可少的一部分。

蛋白质冻融破坏的机制有以下几种:首先,冷冻过程中形成的冰水表面是蛋白质变性的重要原因^[39-40],蛋白质倾向于吸附到这些表面中发生变性和聚集;其次,冷冻过程中大量的水结成冰后剩余溶质及蛋白质本身的浓度会急剧增加,而蛋白质浓度越高,发生分子间碰撞机会越多,则形成聚集就越严重^[41]。

根据蛋白质降解的反应机制,抑制冻融造成的蛋白质降解也有不同方式。如通常可加入表面活性剂(如聚山梨酯20、聚山梨酯80等)来抑制由冰水表面引起的降解^[39]。通过调节溶液 pH 和离子强度,加入辅料/保护剂的形式来增加热力学稳定性(使蛋白质维持在天然状态下)^[42]。长期储存生物药原液时,通常需把蛋白质保存在最大冻结浓缩液的玻璃化转变温度(glass transition temperature, T_g')以下,确保其具有非常低的运动性(动力学稳定性)^[43]。如含有蔗糖作为保护剂的蛋白质溶液,由于其 T_g' 约为 -30°C ,那就需要保持在 -40°C 甚至更低的温度下。

冻融的速率也会影响生物药的稳定性^[44-45]。如冷冻过慢会导致蛋白质长时间在较高浓度状态下,更易发生降解;相反,如在非常快的条件下(如放在 -80°C)可能会形成大量的冰水表面,也会引起由于表面造成的降解。融化的速度也非常重要,缓慢的融化(如 4°C)会导致在冰水表面融化的水重结晶而造成进一步的破坏^[44]。所以生产过程中一般建议尽量在较快速度下对冷冻产品进行融化,如使用流动水来加速融化。

另外,在冷冻过程中,某些溶质会由于冰的形成以及溶解度降低而结晶析出。最典型的是磷酸钠缓冲液,与磷酸二氢钠相比,磷酸氢二钠的溶解

度对温度非常敏感,在低温条件下会首先析出,从而导致溶液的 pH 下降最多达3~4个单位^[46],此时对酸敏感的蛋白质则易发生降解。某些具有多个亚基结构的蛋白质,如 aponecarnostatin 和葡萄球菌核酸酶等,由于连接亚基的疏水作用随温度下降而降低,在低温条件下会发生低温变性^[47-49]。

3.4 过滤/超滤

蛋白质溶液的膜过滤主要有3大类,分别是除菌过滤(sterile filtration)、除病毒纳滤(nano-filtration)和超滤/渗滤。除菌过滤主要用于去除不溶性微粒和病菌,通常用于最终成品灌装前;纳滤主要用于去除病毒;而超滤/渗滤主要用于将纯化后的样品置换到最终制剂的缓冲液中并进行浓缩,同时避免了直接向蛋白质溶液中加入强碱或强酸调节溶液的 pH,以及加入其他固体辅料时可能造成局部放热从而影响蛋白质的稳定性。但膜过滤本身会对蛋白质产生一些作用^[50],蛋白质和滤膜的相互作用可能会降低原液中蛋白质的浓度,还会使蛋白质变性,这对于低蛋白浓度药物影响更加显著。一般可通过加入表面活性剂来降低蛋白质和滤膜、蛋白质与蛋白质之间的相互作用。另外,一些质量不好的滤膜本身会脱落一些微粒,成为蛋白质聚集的成核点,加速蛋白质聚集^[51]。选择高质量的滤膜非常关键。

在超滤过程中还需要考虑道南效应(Donnan effect)^[52-54]。道南效应是指在膜过滤过程中,聚合物(如蛋白质大分子)被截留在膜内,溶液中带有相反电荷的电解质由于电荷相互吸引作用更多地聚集在聚合物周围,从而在超滤过程中不能完全透过滤膜,造成浓度升高。常规抗体在超滤液中带正电荷,所以阴离子电解质会随同抗体被富集、浓度升高。通常起始缓冲液浓度越低,超滤后蛋白质浓度越高,则道南效应越明显,对缓冲液的 pH 影响也更显著。如含有组氨酸的缓冲液,在超滤浓缩抗体药物时其 pH 值会上升,甚至会出现制剂 pH 值超出质量控制标准而使产品不合格的情况。

4 生物药在成品制备过程的降解及控制

4.1 配置与混合

在生产过程中,由于涉及到的生物药体积规模较大,制剂配置及混匀等操作变得很重要,如局部蛋白质或辅料浓度过高,或者溶液 pH 及离子强度的改变都可能会导致蛋白质变性或沉淀。生产时机械搅拌器的类型、大小、搅拌速度和时间都可能影响生物药的稳定性,如搅拌速率过高会导致蛋白

质聚集加速^[55]。所以要在实现均一混合的前提下尽可能优化这些参数。

4.2 灌装

生物药在灌装过程中易发生变性和聚集,主要是泵过程产生的机械力如剪切力^[56-59]以及一些析出物导致的降解^[60]。有文献报道,活塞泵的不锈钢会析出一些纳米颗粒,成为抗体聚集的成核点^[60]。灌装过程中产生的小气泡可使蛋白质在气液表面变性,而小气泡破碎时会产生自由基和(或)局部热量的变化,均有可能造成蛋白质变性^[61]。

4.3 冻干

生物药倾向于使用液体制剂,因从成本、工艺简便性以及患者使用方便性等角度来说液体制剂相比冻干制剂均具有显著优势。但某些蛋白质在水溶液中非常不稳定,如通过制剂优化后还未能达到足够的稳定性,那么就应考虑使用冻干制剂。冻干过程会形成很多破坏因素,首先是在冷冻过程中的破坏因素,前已详述。此外蛋白质在干燥的条件下也可能会遇到降解因素。如蛋白质表面的水化层对蛋白质的稳定性非常重要,Hageman^[62]提出蛋白质表面包含大约7%的水,这部分水对维持蛋白质结构非常重要,而冻干以后的含水量一般在1%~2%之间,所以在脱水时需要有其他物质来代替水的作用。因此选择合适的处方和冻干工艺非常关键。一般认为二糖如蔗糖和海藻糖均能比较有效地起到氢键供体(hydrogen bond donor)的作用,而高分子化合物由于位阻效应不能有效发挥水替代物的作用保护效果不佳^[63-65]。另外,在控制冻干水分含水量(如1%~2%)的前提下,蔗糖和海藻糖能形成具有较高 T_g 的无定型粉末,使整个体系维持在固体状态,抑制在长期储存过程中的物理和化学降解^[64-65]。然而对多肽类生物药(如高血糖素),由于它们无相对固定的高级结构,不能起到氢键作用的高分子糖如羟乙基淀粉也能发挥和海藻糖类似的保护作用^[66]。最近有报道使用氨基酸作为新型生物药冻干保护剂^[67-69],尤其是精氨酸,单用^[68]或与蔗糖混用^[69]能非常有效地保护蛋白质在冷冻和冻干条件下的稳定性。

5 生物药在储存、运输和使用过程的降解及控制

在储存、运输和使用过程中,蛋白质还会经历各种降解条件^[70],如在储存和运输时的短期温度变化,运输振荡,或运输和使用过程的光照破坏等,都可能对蛋白质质量造成较大影响。对于生物制药及疫苗,冷链运输是保证产品质量的一个关键因

素。近年来中国发生过数例疫苗安全事件,如2010年山西疫苗案及2016年山东非法疫苗案,这些案例均涉及不规范疫苗储存及运输行为,所造成的潜在用药安全性隐患引起了全社会的高度关注。因此强化在储存、运输和使用过程管理及控制,是保障生物药安全应用的一个重要环节。

6 结语

生物药是高度脆弱的分子,它们的产品质量和生产工艺息息相关。在生产过程中极易发生各种化学和物理降解,特别是生物药大分子特有的物理降解,在各种物理或机械条件下均会发生,因此不能把小分子药物的经验直接套用到生物药。生产过程中应尽量避免较极端的条件,如使用搅拌速率过高的搅拌器混匀生物药溶液,直接使用强酸或强碱来调节溶液pH,或直接往蛋白质溶液中加入固体辅料溶解等。短期内虽可能不会造成可以检测到的影响,但可能已影响生物药局部正常的细微结构,而这些结构变化在长期储存过程中会被放大,最终影响产品的质量。如有必要,可通过对原液或成品采用加速和强制降解稳定性实验来加快对不同的生产工艺或保护剂进行对比评估。在纯化和灌装过程中尤要注意这些降解产物,因为它们将会一直存在于成品中并最终用于患者,产生安全性、有效性和免疫原性等方面的问题。从某种意义上说,生物制药的生产工艺决定了其品质,这需要对这些分子的降解机制进行分析,并抑制其在整个生产过程中可能发生的降解,确保最终产品能安全、有效地应用于患者。

【参考文献】

- [1] Reichert JM. Antibodies to watch in 2017 [J]. *mAbs*, 2017, 9(2):167-181.
- [2] Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2018 [J]. *mAbs*, 2018, in press, doi: 10.1080/19420862.2018.1415671.
- [3] Carter PJ, Lazar GA. Next generation antibody drugs: pursuit of the 'high-hanging fruit' [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(3):197-223.
- [4] Beck A, Wagner-Rousset E, Ayoub D, et al. Characterization of therapeutic antibodies and related products [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(2), 715-736.
- [5] Frokjaer S, Otzen DE. Protein drug stability: a formulation challenge [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4(4):298-306.
- [6] Wang W, Singh S, Zeng DL, et al. Antibody structure, instability, and formulation [J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(1):1-26.
- [7] Manning MC, Chou DK, Murphy BM, et al. Stability of protein pharmaceuticals: an update [J]. *Pharm Res*, 2010, 27(4):

- 544-575.
- [8] Meric G, Robinson AS, Roberts CJ. Driving forces for nonnative protein aggregation and approaches to predict aggregation-prone regions [J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2017, 8: 139-159.
- [9] Schellekens H. Bioequivalence and immunogenicity of biopharmaceuticals [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1:457-462.
- [10] Bloem K, Hernández-Breijo B, Martínez-Feito A, et al. Immunogenicity of therapeutic antibodies: monitoring antidrug antibodies in a clinical context [J]. *Ther Drug Monit*, 2017, 39(4): 327-332.
- [11] Pratt KP. Marginal immunogenicity of factor VIII [J]. *Blood*, 2017, 130(23):2450-2451.
- [12] Kalden JR, Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(12):707-718.
- [13] Ishii-Watabe A, Shibata H, Nishimura K, et al. Immunogenicity of therapeutic protein products: current considerations for anti-drug antibody assay in Japan [J]. *Bioanalysis*, 2018, 10(2): 95-105.
- [14] Rosenberg A. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective [J]. *AAPS J*, 2006, 8(3):E501-E507.
- [15] Moore W, Leppert P. Role of aggregated human growth hormone (hGH) in development of antibodies to hGH [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980, 51(4):691-697.
- [16] Braun A, Kwee L, Labow MA, et al. Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(10):1472-1478.
- [17] Fathallah AM, Chiang M, Mishra A, et al. The effect of small oligomeric protein aggregates on the immunogenicity of intravenous and subcutaneous administered antibodies [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(11):3691-3702.
- [18] Boven K, Stryker S, Knight J, et al. The increased incidence of pure red cell aplasia with an Eprex formulation in uncoated rubber stopper syringes [J]. *Kidney Int*, 2005, 67:2346-2353.
- [19] Wang W. Advanced protein formulation [J]. *Protein Sci*, 2015, 24(7):1031-1039.
- [20] Franco R, Daniela G, Fabrizio M, et al. Influence of osmolarity and pH increase to achieve a reduction of monoclonal antibodies aggregates in a production process [J]. *Cytotechnology*, 1999, 29(1):11-25.
- [21] Ju HK, Hwang SJ, Jeon CJ, et al. Use of NaCl prevents aggregation of recombinant COMP-angiopoietin-1 in Chinese hamster ovary cells [J]. *J Biotechnol*, 2009, 143(2):145-150.
- [22] 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.
- [23] Mun M, Khoo S, Do Minh A, et al. Air sparging for prevention of antibody disulfide bond reduction in harvested CHO cell culture fluid [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(4):734-742.
- [24] Chaderjian WB, Chin ET, Harris RJ, et al. Effect of copper sulfate on performance of a serum-free CHO cell culture process and the level of free thiol in the recombinant antibody expressed [J]. *Biotechnol Prog*, 2005, 21(2):550-553.
- [25] Banks DD, Gadgil HS, Pipes GD, et al. Removal of cysteinyl-ation 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.
- [26] Philips J, Drumm A, Harrison P, et al. Manufacture and quality control of CAMPATH-1 antibodies for clinical trials [J]. *Cytotherapy*, 2001, 3(3):233-242.
- [27] Ejima D, Yumioka R, Tsumoto K, et al. Effective elution of antibodies by arginine and arginine derivatives in affinity column chromatography [J]. *Anal Biochem*, 2005, 345(2):250-257.
- [28] Lewis JD, Nail SL. The influence of ion exchange chromatography conditions on aggregation of equine IgG [J]. *Proc Biochem*, 1997, 32(4):279-283.
- [29] Luo H, Macapagal N, Newell K, et al. Effects of salt-induced reversible self-association on the elution behavior of a monoclonal antibody in cation exchange chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1362:186-193.
- [30] Xiao Y, Freed AS, Jones TT, et al. Protein instability during HIC: describing the effects of mobile phase conditions on instability and chromatographic retention [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 93(6):1177-1189.
- [31] Jones TT, Fernandez EJ. α -Lactalbumin tertiary structure changes on hydrophobic interaction chromatography surfaces [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2003, 259(1):27-35.
- [32] Fausnaugh JL, Kennedy LA, Regnier FE. Comparison of hydrophobic interaction and reverse phase chromatography of proteins [J]. *J Chromatogr*, 1984, 317:141-155.
- [33] Arakawa T, Kita Y, Ejima D. Stress-free chromatography: IEC and HIC [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2009, 10(4):461-463.
- [34] Smales CM, Pepper DS, James DC. Protein modifications during antiviral heat bioprocessing and subsequent storage [J]. *Biotechnol Progress*, 2001, 17(5):974-978.
- [35] Shrake A, Finlayson JS, Ross PD. Thermal-stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. I. Effects of caprylate and N-acetyltryptophanate [J]. *Vox Sang*, 1984, 47(1):7-18.
- [36] Smales CM, Pepper DS, James DC. Mechanisms of protein modification during model anti-viral heat-treatment bioprocessing of beta-lactoglobulin variant A in the presence of sucrose [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2000, 32(2):109-119.
- [37] Durschlag H, Hefferle T, Zipper P. Comparative investigations of the effects of X- and UV-irradiation on lysozyme in the absence or presence of additives [J]. *Rad Phys Chem*, 2003, 67(3/4): 479-486.
- [38] Liu L, Braun LJ, Wang W, et al. Freezing-induced perturbation of tertiary structure of a monoclonal antibody [J]. *J Pharm Sci*, 2014, 103(7):1979-1986.
- [39] Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants [J]. *J Pharm Sci*, 1996, 85(12):1325-1330.

- [40] Strambini GB, Gabellieri E. Proteins in frozen solutions: evidence of ice-induced partial unfolding [J]. *Biophys J*, 1996, 70(2): 971-976.
- [41] Lashmar UT, Vnanderburgh M, Little SJ. Bulk freeze-thaw of macromolecules-effect of cryoconcentration on their formulation and stability [J]. *BioProcess Int*, 2007, 5:44-54.
- [42] Carpenter JF, Crowe JH. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes [J]. *Cryobiology*, 1988, 25(3):244-255.
- [43] Liesebach J, Rades T, Mang L. A new method for the determination of the unfrozen matrix concentration and the maximal freeze-concentration [J]. *Thermochim Acta*, 2003, 401(2): 159-168.
- [44] Cao E, Chen Y, Cui Z, et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of protein in aqueous solutions [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 82(6):684-690.
- [45] Miller MA, Rodrigues MA, Glass MA, et al. Frozen-state storage stability of a monoclonal antibody: aggregation is impacted by freezing rate and solute distribution [J]. *J Pharm Sci*, 2013, 102(4):1194-1208.
- [46] Pikal-Cleland KA, Rodriguez-Hornedo N, Amidon GL. Protein denaturation during freezing and thawing in phosphate buffer systems: monomeric and tetrameric β -galactosidase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 384(2):398-406.
- [47] Privalov PL. Cold denaturation of proteins [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1990, 25(4):281-305.
- [48] Jayachithra K, Kumar TKS, Lu T, et al. Cold instability of aponeocarzinostatin and its stabilization by labile chromophore [J]. *Biophys J*, 2005, 88(6):4252-4261.
- [49] Antonino LC, Kautz RA, Nakano T, et al. Cold denaturation and 2H₂O stabilization of a staphylococcal nuclease mutant [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(17):7715-7718.
- [50] Koehler JA, Ulbricht M, Belfort G. Intermolecular forces between proteins and polymer films with relevance to filtration [J]. *Langmuir*, 1997, 13(15):4162-4171.
- [51] Liu L, Randolph TW, Carpenter JF. Particles shed from syringe filters and their effects on agitation-induced protein aggregation [J]. *J Pharm Sci*, 2012, 101(8):2952-2959.
- [52] Miao F, Velayudhan A, DiBella E. Theoretical analysis of excipient concentrations during the final ultrafiltration/diafiltration step of therapeutic antibody [J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(4): 964-972.
- [53] Bolton GR, Boesch AW, Basha J. Effect of protein and solution properties on the Donnan effect during the ultrafiltration of proteins [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(1):140-152.
- [54] Vis M, Peters VF, Tromp RH, et al. Donnan potentials in aqueous phase-separated polymer mixtures [J]. *Langmuir*, 2014, 30(20):5755-5762.
- [55] Simmons MJH, Jayaraman P, Fryer PJ. The effect of temperature and shear rate upon the aggregation of whey protein and its implications for milk fouling [J]. *J Food Eng*, 2006, 79(2): 517-528.
- [56] Watterson JG, Schaub MC, Waser PG. Shear-induced protein-protein interaction at the air-water interface [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 356(2):133-143.
- [57] Thomas CR, Nienow AW, Dunnill P. Action of shear on enzymes: studies with alcohol dehydrogenase [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1979, 21(12):2263-2278.
- [58] Maa YF, Hsu CC. Effect of high shear on proteins [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 51(4):458-465.
- [59] Sterpone F, Derreumaux P, Melchionna S. Molecular mechanism of protein unfolding under shear: a lattice Boltzmann molecular dynamics study [J]. *J Phys Chem B*, 2018, 122(5): 1573-1579.
- [60] Tyagi AK, Randolph TW, Dong A, et al. IgG Particle formation during filling pump operation: a case study of heterogeneous nucleation on stainless steel nanoparticles [J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98(1):94-104.
- [61] Wang H, Zheng HJ, Wang Z, et al. Formation of protein sub-visible particles during vacuum degassing of etanercept solutions [J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 66(5):151-157.
- [62] Hageman MJ. The role of moisture in protein stability [J]. *Drug Dev Industr Pharm*, 1988, 14(14):2047-2070.
- [63] Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, et al. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice [J]. *Pharm Res*, 1997, 14(8):969-975.
- [64] Davis JM, Zhang N, Payne RW, et al. Stability of lyophilized sucrose formulations of an IgG1: subvisible particle formation [J]. *Pharm Dev Technol*, 2013, 18(4):883-896.
- [65] Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, et al. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): mechanisms of stabilization in relation to stress conditions [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 114:288-295.
- [66] Fang WJ, Qi W, Kinzell J, et al. Effects of excipients on the chemical and physical stability of glucagon during freeze-drying and storage in dried formulations [J]. *Pharm Res*, 2012, 29(12):3278-3291.
- [67] Forney-Stevens KM, Bogner RH, Pikal MJ. Addition of amino acids to further stabilize lyophilized sucrose-based protein formulations: I. screening of 15 amino acids in two model proteins [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105(2):697-704.
- [68] Stärtzel P. Arginine as an excipient for protein freeze-drying: a mini review [J]. *J Pharm Sci*, 2018, 107(4):960-967.
- [69] Stärtzel P, Gieseler H, Gieseler M, et al. Freeze drying of L-arginine/sucrose-based protein formulations, part I: influence of formulation and arginine counter ion on the critical formulation temperature, product performance and protein stability [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(7):2345-2358.
- [70] Telikepalli S, Kumru OS, Kim JH, et al. Characterization of the physical stability of a lyophilized IgG1 mAb after accelerated shipping-like stress [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104(2):495-507.

(收稿日期:2017-10-12 修回日期:2017-11-10)