

生物技术药物的免疫原性产生机制与控制策略

崔兆惠, 郭玲, 沈旭东, 林毅, 翟丽丽*

华北制药集团新药研究开发有限责任公司, 抗体药物研制国家重点实验室, 抗体药物河北省工程研究中心, 石家庄 052160

摘要: 生物技术药物在肿瘤、自身免疫性疾病及其他复杂疾病的治疗中取得了日益显著的治疗效果。使用生物技术药物进行治疗时存在免疫原性风险, 导致药物疗效和治疗效果降低, 甚至产生严重的不良反应。在保持生物技术药物药代动力学特性和治疗效果的基础上, 降低或去除其免疫原性成为药物开发过程的重要环节。了解驱动生物技术药物免疫原性的复杂机制以及制定有效的策略降低免疫原性风险对于提高药物疗效和安全性至关重要。综述了生物技术药物免疫原性产生机制的研究进展, 讨论了影响免疫原性的因素, 重点阐述了在药物开发过程中降低免疫原性的策略, 期为生物技术药物的研发提供参考。

关键词: 生物技术药物; 免疫原性; 抗药物抗体; 化学修饰; 聚集

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2024.0175

中图分类号: Q939.91, R967 文献标志码: A

Immunogenicity Formation Mechanism and Control Strategy of Biopharmaceuticals

CUI Zhaohui, GUO Ling, SHEN Xudong, LIN Yi, ZHAI Lili*

Hebei Engineering Research Center of Antibody Medicine, State Key Laboratory of Antibody Research & Development, North China Pharmaceutical Group Corporation New Drug Research and Development Co., Ltd., Shijiazhuang 052160, China

Abstract: Biopharmaceuticals have achieved increasingly significant therapeutic effects in the treatment of tumors, autoimmune diseases and other complex diseases. However, there is a risk of immunogenicity when using biopharmaceuticals for treatment, which can reduce drug efficacy and affect treatment outcomes, even cause severe adverse reactions. Reducing or eliminating the immunogenicity of biopharmaceuticals on the basis of maintaining their pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy has become an important aspect of the drug development process. Understanding the complex mechanisms driving the immunogenicity of biopharmaceuticals and developing effective strategies to reduce immunogenicity risks are crucial for improving drug efficacy and safety. The article reviewed the development of mechanism of immunogenicity in biopharmaceuticals, discussed the factors that affected immunogenicity and focused on strategies used to reduce immunogenicity in drug development, in order to provide a reference for the research and development of biopharmaceuticals.

Key words: biopharmaceuticals; immunogenicity; anti-drug antibody; chemical modification; aggregation

生物技术药物包括单克隆抗体、生长因子(如促红细胞生成素)和细胞因子(如白细胞介素-2或 β -干扰素)等, 广泛用于治疗多种慢性疾病和自身免疫性疾病, 例如癌症、类风湿性关节炎、炎症性肠病和多发性硬化症等。生物技术药物区别于小

分子化学药物的一个重要特点是结构的高度复杂性。小分子化学药在临床应用中因其潜在毒性面临挑战, 而生物技术药物可能在患者体内诱导体液和细胞免疫反应, 产生抗药物抗体(anti-drug antibody, ADA)。ADA可诱发过敏反应, 改变药

收稿日期: 2024-11-08; 接受日期: 2025-02-12

基金项目: 河北省重点研发计划项目(22372404D); 石家庄市2022年生物医药研发奖补资金。

联系方式: 崔兆惠 E-mail: zhaohuicui@126.com; *通信作者 翟丽丽 E-mail: lilizhai@163.com

物药代动力学特性,抑制药物与受体的靶向结合,从而降低药物药效^[1-3]。早期的胰岛素产品仅单次或几次注射即可检测到ADA,并伴随一些致命的过敏反应。由于第一代胰岛素产品来自牛和猪,从动物中提取纯化的蛋白质不同于天然人类产物的分子结构,因此其免疫原性高。当胰岛素原、C端肽、胰高血糖素和生长激素抑制素等杂质去除后,猪来源胰岛素制剂的免疫原性显著下降,这表明生物技术药物与人类同源性的差异并不是免疫原性的唯一决定因素。目前,越来越多的单克隆抗体被开发应用于免疫系统疾病和不同类型的肿瘤治疗中^[4]。早期的治疗性单克隆抗体来源于小鼠,但由于ADA具有高生成率,其临床应用受到限制。随着重组DNA技术的进步,目前已开发出嵌合、人源化和全人源抗体。尽管免疫原性显著降低,但仍然可以观察到阿达木单抗等全人源抗体能够产生ADA^[5-6]。生物技术药物的免疫原性直接影响药物的疗效和安全性,成为许多患者继续治疗的限制因素。深入了解触发免疫原性反应的分子机制,将影响免疫原性的主要因素控制在一定范围内以确保生物技术药物的质量,有

助于提高生物技术药物的安全性^[7-10]。本文综述了诱发生物技术药物免疫原性的复杂机制,讨论了影响免疫原性的因素,重点介绍了生物技术药物开发过程中用于降低免疫原性的策略,以期为生物技术药物的研发提供参考。

1 免疫原性产生的机制

1.1 ADA产生的免疫机制

生物技术药物可能通过诱导免疫反应产生ADA,通常不会产生严重的临床反应,但在某些情况下,可能出现严重的过敏反应、降低药物疗效以及诱导自体免疫。ADA可以通过T细胞依赖(T cell-dependent, Td)和非T细胞依赖(T cell-independent, Ti)2种途径产生,如图1所示。在Td途径中,T细胞被抗原识别激活,通过主要组织相容性复合体II (major histocompatibility complex, MHC)由抗原呈递细胞(antigen-presenting cells, APCs)呈递,活化的T细胞刺激B细胞产生ADA^[11-12]。此外,Td途径产生的ADA会对外源性药物产生持久的高抗体滴度反应。

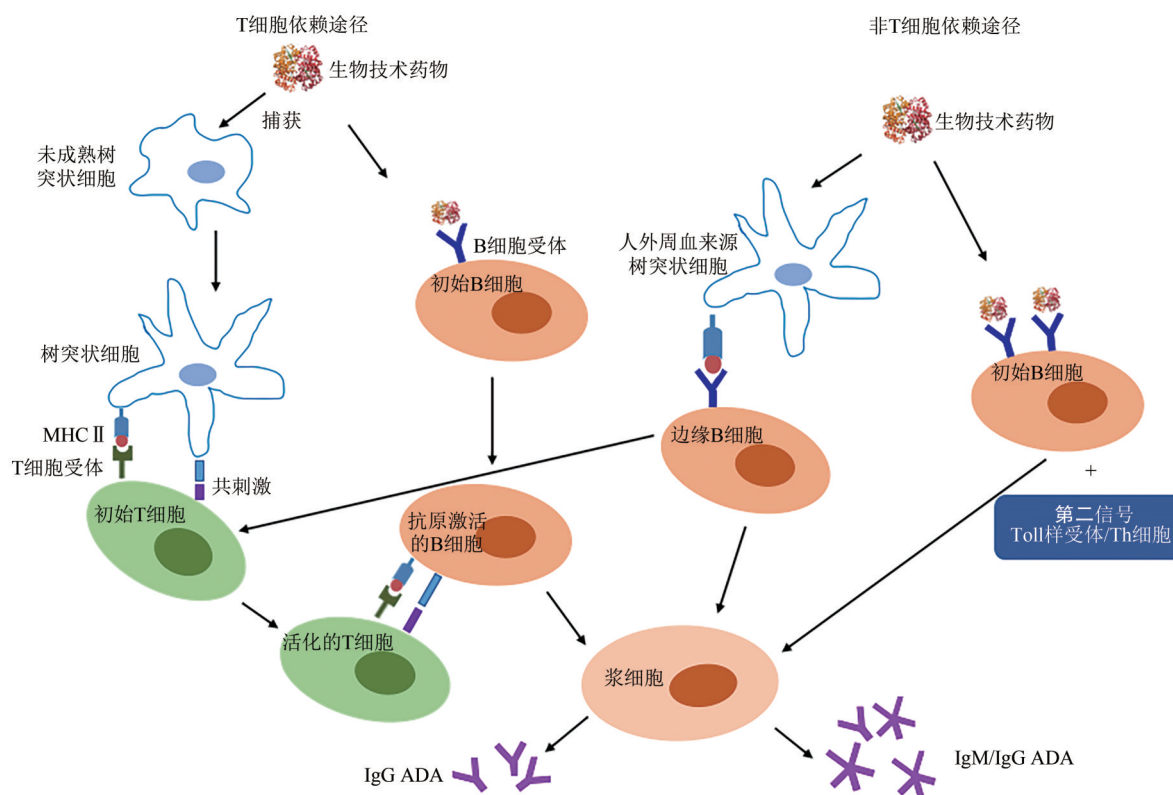


图1 生物技术药物激发的T细胞依赖性和非T细胞依赖性途径的免疫原性反应

Fig. 1 T cell-dependent and independent pathway involved in an immunogenic response of biopharmaceuticals

Ti途径产生的ADA涉及多价抗原与B细胞受体(B cell receptor,BCR)结合和诱导受体聚集。生物技术药物的聚集体出现重复的免疫表位可导致BCR聚集,引起B细胞活化并导致Ti反应。生物技术药物也可以被人外周血来源的树突状细胞(dendritic cell,DC)吞噬,并迁移到脾脏。在脾边缘区,DC向B细胞呈递药物抗原。在这一机制中由于没有T细胞的参与,因此产生的ADA是IgM亚型或低亲和力的IgG^[13-14]。来自危险信号(Toll样受体TLRs)或抗原特异性T辅助细胞(Th)的额外信号可导致亲和力成熟、类别转换和更有效的IgG应答。额外信号或危险信号可由生物技术药物中的杂质和与之相关的疾病炎症环境提供。尽管每种途径是不同的,但它们之间存在相互作用。负载抗原的边缘区B细胞(来自Ti通路)可以通过向T细胞呈递生物技术药物来发挥APC的功能,这是Td和Ti通路如何相互作用和协同的一个例子。ADA-生物药免疫复合物(由对生物药的初次免疫反应产生的ADA)的存在可以激活初始B细胞进行二次应答。由于ADA-生物药复合物的形成,提升了B细胞对生物药的摄取,针对不同于初次应答的表位诱导产生Td抗体^[15]。

1.2 抗原的加工和呈递

抗原加工和递呈过程作为免疫原性关键驱动因素尚未得到充分认识,值得深入研究。生物技术药物的抗原加工和呈递由抗原呈递细胞、巨噬细胞和B细胞完成,主要涉及抗原捕获和抗原呈递两个关键过程。

抗原加工的第一步是获取细胞外抗原,APC

通过吞噬作用和受体介导的内吞作用使抗原内化^[16]。生物技术药物的注射部位决定参与抗原捕获的APC类型。随着药物注射到皮下,未成熟的树突状细胞通过表皮吞噬及MHC II途径加工药物。抗原捕获之后进行抗原加工和多肽-MHC复合物的形成。抗原呈递的质量取决于多肽-MHC复合物,而多肽-MHC复合物的稳定性和免疫原性应答之间存在直接关系^[17]。APC通过T细胞受体识别细胞表面的MHC II类复合体,并通过T细胞表面的共刺激受体CD28与APC上的B7共刺激分子结合来激活T细胞。生物技术药物引起免疫原性的因素可诱导共刺激分子在APC上表达。药物制剂配方中辅料的降解产物可增加DC表面共刺激分子的表达^[18]。由于制剂配方中的降解产物或疾病相关炎症引起的氧自由基的存在,可作为信号上调DC表面共刺激分子的表达。

耐受性是一种防止免疫细胞对自身抗原产生反应的机制。与体内内源性物质相似的生物技术药物引起的反应可能与免疫耐受被破坏有关。生物技术药物中存在的杂质,如内毒素或宿主DNA,可作为危险信号激活细胞体内的免疫反应。外源T细胞表位与自身抗原结合的存在也可以打破对自身抗原的耐受。

2 影响免疫原性的因素

ADA的产生是由多种因素导致的(表1)^[19-23],包括生物技术药物的固有特性、药物制剂特性和患者特征。

表1 影响生物技术药物免疫原性的因素
Table 1 Factors affecting the immunogenicity of biopharmaceuticals

药物因素	患者因素
天然蛋白与治疗性蛋白的分子结构、氨基酸序列差异(人源化程度)	疾病类型(免疫介导/非免疫介导的疾病)
治疗性蛋白聚集	年龄
治疗性蛋白修饰-氧化、脱酰胺、糖基化	与其他药物同用
杂质、制剂组分、佐剂	剂量
剂型	治疗频率
生产过程	给药途径

2.1 药物因素

生物技术药物本身的属性,如蛋白质序列、外源或内源性表位的存在以及影响药物降解、抗原位点暴露和溶解度的糖基化程度,都可以导致患

者产生ADA。与中国仓鼠卵巢(chinese hamster ovary,CHO)细胞表达的产品相比,大肠杆菌表达的干扰素产品具有更高的免疫原性,这与缺乏糖基化有关。影响免疫原性的其他药物相关因素包

括配方、储存、下游加工和杂质水平。这些因素的重要性可以在不同生产基地生产的干扰素产品的抗原性差异中找到证据。改变干扰素的配方和储存已被证明可降低免疫原性^[24]。

2.2 患者因素

在患者体内,免疫系统差异、治疗的药物、疾病适应症、治疗目标以外疾病的干扰以及给药途径或方案都可能影响ADA的产生及其临床后果。生物技术药物治疗和患者的独特特征之间的相互作用会影响治疗的安全性和有效性。因此,定制生物技术药物对患者个体的治疗方案是个性化医疗的一个关键方面。由于患者的个体差异,单抗靶点的数量影响生物技术药物的免疫原性,其中一个例子是巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α , TNF α)与阿达木单抗之间的相互作用^[25]。阿达木单抗治疗前TNF α 水平较低的患者与较高者相比,治疗后产生ADA的频率更高^[26]。这种差异可能是在TNF α 含量低的患者中,存在过量的未结合阿达木单抗触发免疫反应,然而那些初始TNF α 水平较高的患者能结合更多的阿达木单抗分子,从而降低触发免疫反应和ADA产生的机率^[27]。

3 降低免疫原性的策略

3.1 设计低免疫原性生物技术药物

基于生物信息学和人工智能技术,使用相关计算机软件可优化生物技术药物的氨基酸序列,预测免疫原性。对药物进行降低免疫原性改造,其中最常用的两种是免疫表位数据库(Immune Epitope Database, IEDB)和基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)^[28-29]。IEDB用于预测蛋白质序列内潜在的免疫原性威胁,在药物开发的早期进行干预和设计^[30]。IEDB包含已知的T细胞和B细胞表位,并提供多种工具和算法,这些生物信息学工具为生物技术药物的开发提供了多方面信息,有助于预测药物的T细胞和B细胞表位^[31-32]。

为消除潜在的T细胞和B细胞表位,常用的设计具有低免疫原性风险的生物技术药物的两种方法是合理设计和定向进化。合理设计是在了解蛋白质结构、功能及与其他免疫系统分子相互作用的基础上,对蛋白类药物的序列和修饰进行精

确设计。定向进化是在实验室环境中模拟自然进化的迭代过程。该方法通过随机诱变、重组的方式产生大量的变异体,然后使用高通量筛选来鉴定具有所需特性(如免疫原性降低)的变异体。通过合理的药物分子设计,已对人促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)、人类生长激素(human growth hormone, hGH)、艾米珠单抗(emicizumab)和 β 干扰素(interferon- β , IFN- β)进行降免疫原性改造^[33]。目前,降免疫原性改造过程通常涉及使用计算机法来预测和分析潜在的表位,然后通过位点定向诱变来修饰这些表位,并测试生成变体的结合亲和力、特异性、稳定性和免疫原性^[34-35]。合理设计抗体的计算机方法已成功应用于降低重组活化凝血因子VII(rFVIIa)变体vatreptacog alfa(VA)的免疫原性。该重组蛋白旨在为具有VIII或IX因子抑制剂的血友病患者提供更高的促凝血活性^[36]。临床试验显示,VA变体导致一些患者出现ADA,造成该产品停产。为了降低rFVIIa类似物的免疫原性,开发了一种免疫原性计算机预测方法(rational immunogenicity determination, RID),可应用于减少T细胞表位而不改变保守序列的氨基酸取代,因此这些氨基酸取代可能具有重要的功能。体外免疫原性试验和凝血酶生成试验表明,重新设计的蛋白在不影响生物活性的情况下降低了T细胞反应。这种降免疫原性的改造策略为减少生物技术药物的免疫原性风险提供了一种有效的方法。

当去除T细胞或B细胞表位可能影响生物技术药物的功能时,可以使用表位屏蔽法掩盖药物的部分抗原片段。糖基化不仅可调节抗体依赖细胞介导的细胞毒作用(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)和补体依赖的细胞毒作用(complement dependent cytotoxicity, CDC),也能改变药物的免疫原性。单抗可以在Fc区(通常在天冬酰胺297位)和IgG Fab区进行n-糖基化或o-糖基化改造^[37]。有研究表明,甘露糖糖基化能增强治疗性蛋白的免疫原性,因此降低甘露糖含量可能会降低其免疫原性^[38]。聚乙二醇化可以将聚乙二醇聚合物连接到蛋白药物上,以保护抗原表位免受免疫系统的识别^[39]。与未经修饰的蛋白药物相比,聚乙二醇化的蛋白药物具有更长的半衰期、更好的水溶性和更低的免疫原性^[40]。然而,潜在的缺点包括生物活性降低、性质改变、聚乙二醇

在器官中的积累以及抗聚乙二醇抗体的产生。这些屏蔽方法可用于减轻药物和患者相关的免疫原性风险,有助于生物技术药物逃避免疫监视,提高治疗效果和延长半衰期,从而减少给药频率^[41]。然而,这些方法需要对每种生物技术药物进行详细评估,否则有可能引入新的表位或降低最终产品的功效。

3.2 控制关键质量属性

3.2.1 化学修饰 生物技术药物在发酵、纯化、过滤分装和储存运输等生产过程中容易受到各种复杂因素的影响,从而产生化学修饰。化学修饰包括脱酰胺、氧化、异构化、羟基化、糖基化和蛋白质的C/N端异质性^[42-43]。单个氨基酸残基对化学修饰的敏感性取决于邻近残基、蛋白的空间结构和溶液条件(如温度、pH和离子强度)。化学修饰可能导致蛋白类药物电荷的变化,使蛋白的结构发生变化,形成新的共价交联^[44]。

脱酰胺对几种生物技术药品免疫原性的影响已有报道^[45]。蛋白类药物在高温、高pH下加速脱酰胺,并伴有一定程度的氧化、构象改变、降解和聚集,具有严重的免疫原性风险。氧化作用作为另一种主要的化学修饰也会降低蛋白类药物构象的稳定性,并可能导致蛋白聚集。例如,人血清白蛋白被羟基自由基氧化引起结构改变和暴露疏水区域,导致免疫原性增加^[46]。此外,可通过控制生物技术药物的生产及储存条件,减轻光照、高温和高pH等环境条件对药物化学修饰的影响,保证药物在生产和储存运输过程中的稳定性。

3.2.2 聚集 生物技术药物的免疫原性通常与聚体的形成有关^[47-50]。聚体可以通过不同的机制产生,某些氨基酸序列更容易聚集,糖基化、聚乙二醇化和化学降解也会影响聚体的形成。聚体的产生通常伴随着蛋白类药物结构的变化,产生新的抗原表位或暴露现有的抗原表位,从而引起免疫反应。由注射器产生的可溶性钨污染可导致重组人促红细胞生成素的聚集,慢性肾衰竭患者使用该药后体内会产生中和抗体^[51]。因此,在生物技术药物研发过程中应尽可能早地将聚体含量最小化。选择适当的细胞表达系统、在纯化工艺中设计充分的聚体去除步骤并监测整个工艺过程中聚体的含量,选择适当的制剂配方缓冲液和容器以减少储存期间的聚集,这些都是去除聚体、降低生物技术药物免疫原性的策略^[52]。

3.2.3 宿主细胞蛋白质残留 为了解决宿主细胞蛋白质残留(host cell protein residue, HCP)导致免疫原性增加的问题,在生物技术药物生产的不同阶段探索了几种方法。一种方法是采用基于CRISPR/Cas9的基因编辑技术进行细胞工程改造,以减少或消除编码带有免疫原性的HCP基因的特定基因,如脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL),进行CHO细胞的定向改造,大量减少了此类HCP的表达^[53]。通过靶向表达有免疫原性风险HCP的特定基因,如脂蛋白脂肪酶(lipoprotein lipase, LPL),进行CHO细胞的定向改造,大量减少了此类HCP的表达。CRISPR/Cas9技术具有高靶向选择性和成本效益,可以减少对细胞生长、存活或目的产物表达不必要的HCP。其他方法侧重于下游处理和纯化步骤,例如亲和性沉淀、活性炭膜、絮凝剂和各种类型的层析树脂等材料处理,正在开发用于替代或改进现有纯化方法^[54]。

3.3 上市药物降低免疫原性采取的策略

西妥昔单抗是一种鼠-人IgG1嵌合单克隆抗体,被批准用于治疗结直肠癌和头颈部鳞状细胞癌。约3%患者在首次接触西妥昔单抗后几分钟内出现严重的超敏反应,某些地理区域可能出现更高的过敏反应率(高达33%)。大多数过敏患者在开始治疗前就存在抗西妥昔单抗的IgE抗体,这些抗体对 α -Gal表位具有特异性,且与红肉过敏反应中涉及的IgE抗体相关^[55-56]。所有人都有针对 α -Gal的IgA、IgM和IgG抗体,约占循环免疫球蛋白的1%。Qian等^[57]证明 α -Gal表位位于西妥昔单抗的Fab区。静脉注射和存在于Fab区域的 α -Gal表位使得IgE在肥大细胞上快速交联,这可能解释了西妥昔单抗的快速免疫反应。用于生产西妥昔单抗的小鼠细胞系SP2/0表达 α -1,3-半乳糖转移酶基因,该酶负责 α -Gal表位的合成。在生产治疗性单克隆抗体时,为防止末端 α -Gal表位基因序列掺入,可选择敲除小鼠细胞中的 α -1,3-半乳糖基转移酶基因或使用另一种表达系统,例如CHO细胞不产生 α -Gal表位糖型^[58-59]。人类可以合成N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac),但与其他哺乳动物不同,人类不能合成N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)。因此,人类免疫系统将Neu5Gc识别为外源物,对Neu5Gc表现出高水平的IgA、IgM和IgG抗体(高达循环免疫球蛋白^[60]的0.1%~0.2%)。将含有Neu5Gc的产品注射到已有抗体的个体中,导致免疫复合物形成,从而可能激活补体或影响药物的半衰期。事实上,Gadheri等^[61]证实,注射

抗Neu5Gc抗体后,小鼠对西妥昔单抗的清除率显著提高。在另一项研究中, Maeda等^[62]在小鼠细胞系生产的3种商业单抗药物(西妥昔单抗、吉妥珠单抗和英夫利昔单抗)中检测到Neu5Gc表位的存在,而在CHO细胞系生产的2种单抗(贝伐单抗和阿达木单抗)中则不存在Neu5Gc表位。因此,CHO细胞通常比产生Neu5Gc的细胞系更适合单克隆抗体的生产。值得注意的是,CHO细胞和人类细胞一样,能够从含有动物源性物质的细胞培养基中吸收Neu5Gc,并将糖表位代谢到分泌蛋白中。因此,制造商可通过使用不含Neu5Gc的培养基来防止其吸收,以消除最终产品中的Neu5Gc污染。在大肠杆菌中生产重组人干扰素 β (recombinant human interferon- β , rhIFN β)时,缺乏糖基化会导致rhIFN β -1b的聚集体含量高(高达60%),并引发中和抗体的患者比例高^[63]。除了使蛋白质更易溶解外,糖基化部分还能覆盖抗原表位。患者体内产生的抗重组人粒细胞刺激因子(recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, rhGM-CSF)抗体与酵母和大肠杆菌中产生的rhGM-CSF具有交叉反应性,但与CHO细胞中产生的rhGM-CSF无交叉反应性。由于抗原位点被掩盖,影响蛋白药物的治疗功能,使蛋白药物逃避免疫系统的识别。

4 展望

生物技术药物被广泛用于治疗一些危及生命和慢性消耗性疾病,给许多患者带来了良好的治疗效果。然而,生物技术药物的安全性和有效性可能因机体对药物产生免疫反应而受到严重损害,从而限制其使用^[64]。生物技术药物免疫原性的不良反应包括药物过敏反应、清除率增加、抗体与药物中和、生物功能丧失和与内源性蛋白的交叉反应等。因此,需要在生物技术药物设计开发和生产各阶段对可能产生的免疫原性进行监测和控制。这些阶段包括生物技术药物的分子设计、表达系统选择、上游培养、下游纯化和最终产品的制剂形式开发^[65]。采用计算机方法辅助进行生物技术药物的分子设计,以去除有潜在免疫原性风险的表位,有望前瞻性设计出低免疫原性的生物技术药物^[66]。聚集、化学修饰和HCP应在生物技术药物工艺开发阶段进行有效控制,避免产品相

关因素造成的免疫原性风险。药物进入临床试验阶段,应使用临床样本进行ADA检测来监测免疫原性。严格观察ADA导致的临床反应,包括对药代动力学、药效学的影响和可能引发的免疫反应。未来的研究应侧重于提高计算机辅助生物技术药物分子设计的准确性和工艺开发中降低免疫原性的有效性。由于治疗方案、患者的遗传差异和免疫状态会影响生物技术药物的免疫反应,因此整合关键的遗传数据和临床反应信息对于在患者个体水平上最小化ADA的产生至关重要。综上,促进计算机信息学、实验室生物技术和临床监测领域的协同发展将有助于这些创新策略用于提高生物技术药物开发的高效性和安全性。

参 考 文 献

- [1] SUN R, QIAN M G, ZHANG X. T and B cell epitope analysis for the immunogenicity evaluation and mitigation of antibody-based therapeutics[J/OL]. *mAbs*, 2024, 16(1): 2324836[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2324836>.
- [2] TOVEY M G, LEGRAND J, LALLEMAND C. Overcoming immunogenicity associated with the use of biopharmaceuticals[J]. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.*, 2011, 4(5): 623-631.
- [3] PEDERSEN M E, ØSTERGAARD J, GLINTBORG B, *et al.* Assessment of immunogenicity and drug activity in patient sera by flow-induced dispersion analysis[J/OL]. *Sci. Rep.*, 2022, 12: 4670[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08682-3>.
- [4] BAKER M P, REYNOLDS H M, LUMICISI B, *et al.* Immunogenicity of protein therapeutics: the key causes, consequences and challenges[J]. *Self Nonself*, 2010, 1(4): 314-322.
- [5] ROSSOTTI M A, BÉLANGER K, HENRY K A, *et al.* Immunogenicity and humanization of single-domain antibodies[J]. *FEBS J.*, 2022, 289(14): 4304-4327.
- [6] ORDÁS I, MOULD D R, FEAGAN B G, *et al.* Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms[J]. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 2012, 91(4): 635-646.
- [7] DVORSCEK A R, MCKENZIE C I, STÄHELI V C, *et al.* Conversion of vaccines from low to high immunogenicity by antibodies with epitope complementarity[J]. *Immunity*, 2024, 57(10): 2433-2452.
- [8] ALHARBI N, SKWARCZYNSKI M, TOTH I. The influence of component structural arrangement on peptide vaccine immunogenicity[J/OL]. *Biotechnol. Adv.*, 2022, 60: 108029[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108029>.
- [9] 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.
- [10] RATHORE A S, WINKLE H. Quality by design for biopharmaceuticals[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2009, 27(1): 26-34.

- [11] KARLE A C. Applying MAPPs assays to assess drug immunogenicity[J/OL]. *Front. Immunol.*, 2020, 11: 698[2025-02-27]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00698>.
- [12] WANG G, WU T, NING W, *et al.* TImmuno2: predicting MHC class II antigen immunogenicity through transfer learning[J/OL]. *Brief. Bioinform.*, 2023, 24(3): bbad116[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1093/bib/bbad116>.
- [13] NEWBY M L, ALLEN J D, CRISPIN M. Influence of glycosylation on the immunogenicity and antigenicity of viral immunogens[J/OL]. *Biotechnol. Adv.*, 2024, 70: 108283[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108283>.
- [14] MARIUZZA R A, WU D, PIERCE B G. Structural basis for T cell recognition of cancer neoantigens and implications for predicting neoepitope immunogenicity[J/OL]. *Front. Immunol.*, 2023, 14: 1303304[2025-02-27]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1303304>.
- [15] EL-MANZALAWY Y, DOBBS D, HONAVAR V. Predicting linear B-cell epitopes using string kernels[J]. *J. Mol. Recognit.*, 2008, 21(4): 243-255.
- [16] CONNER S D, SCHMID S L. Regulated portals of entry into the cell[J]. *Nature*, 2003, 422(6927): 37-44.
- [17] SUN R, QIAN M G, ZHANG X. T and B cell epitope analysis for the immunogenicity evaluation and mitigation of antibody-based therapeutics[J/OL]. *mAbs*, 2024, 16(1): 2324836[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2324836>.
- [18] MUELLER R, KARLE A, VOGT A, *et al.* Evaluation of the immuno-stimulatory potential of stopper extractables and leachables by using dendritic cells as readout[J]. *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98(10): 3548-3561.
- [19] PEDROZA-ESCOBAR D, CASTILLO-MALDONADO I, GONZÁLEZ-CORTÉS T, *et al.* Molecular bases of protein antigenicity and determinants of immunogenicity, anergy, and mitogenicity[J]. *Protein Pept. Lett.*, 2023, 30(9): 719-733.
- [20] DE GROOT A S, KHAN S, MATTEI A E, *et al.* Does human homology reduce the potential immunogenicity of non-antibody scaffolds?[J/OL]. *Front. Immunol.*, 2023, 14: 1215939 [2025-02-27]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1215939>.
- [21] CROFT N P. Peptide presentation to T cells: solving the immunogenic puzzle: systems immunology profiling of antigen presentation for prediction of CD8⁺ T cell immunogenicity[J/OL]. *Bioessays*, 2020, 42(3): e1900200[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1002/bies.201900200>.
- [22] PICHLER W J. Adverse side-effects to biological agents[J]. *Allergy*, 2006, 61(8): 912-920.
- [23] ZHOU Y, PENNY H L, KROENKE M A, *et al.* Immunogenicity assessment of bispecific antibody-based immunotherapy in oncology[J/OL]. *J. Immunother. Cancer*, 2022, 10(4): e004225 [2025-02-27]. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-004225>.
- [24] SCHELLEKENS H. Biosimilar therapeutics-what do we need to consider?[J]. *NDT Plus*, 2009, 2(1): 27-36.
- [25] VAN BEERS M M C, SAUERBORN M, GILLI F, *et al.* Oxidized and aggregated recombinant human interferon beta is immunogenic in human interferon beta transgenic mice[J]. *Pharm. Res.*, 2011, 28(10): 2393-2402.
- [26] ZHOU S, SCHÖNEICH C, SINGH S K. Biologics formulation factors affecting metal leachables from stainless steel[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2011, 12(1): 411-421.
- [27] CROMWELL M E M, HILARIO E, JACOBSON F. Protein aggregation and bioprocessing[J]. *AAPS J.*, 2006, 8(3): 572-579.
- [28] RUPERTO N, BAZSO A, RAVELLI A, *et al.* The paediatric rheumatology international trials organization (PRINTO)[J]. *Lupus*, 2007, 16(8): 670-676.
- [29] GOPAL A K, KAHL B S, FLOWERS C R, *et al.* Idelalisib is effective in patients with high-risk follicular lymphoma and early relapse after initial chemoimmunotherapy[J]. *Blood*, 2017, 129(22): 3037-3039.
- [30] VITA R, MAHAJAN S, OVERTON J A, *et al.* The immune epitope database (IEDB): 2018 update[J/OL]. *Nucleic Acids Res.*, 2019, 47(D1): 339-343.
- [31] MATTEI A E, GUTIERREZ A H, SESHADRI S, *et al.* In silico methods for immunogenicity risk assessment and human homology screening for therapeutic antibodies[J/OL]. *mAbs*, 2024, 16(1): 2333729[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2333729>.
- [32] LI W, WEI J, JIANG Q, *et al.* In silico immunogenicity assessment of therapeutic peptides[J]. *Curr. Med. Chem.*, 2024, 31(26): 4100-4110.
- [33] MAZOR R, EBERLE J A, HU X, *et al.* Recombinant immunotoxin for cancer treatment with low immunogenicity by identification and silencing of human T-cell epitopes[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111(23): 8571-8576.
- [34] HOSHITSUKI K, RATHOD S, RAMSEY M J, *et al.* Adalimumab immunogenicity is negatively correlated with anti-hinge antibody levels in patients with rheumatoid arthritis[J]. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2020, 375(3): 488-497.
- [35] ARSLAN M, KARADAĞ D, KALYONCU S. Protein engineering approaches for antibody fragments: directed evolution and rational design approaches[J]. *Turk. J. Biol.*, 2019, 43(1): 1-12.
- [36] JANKOWSKI W, MCGILL J, DANIEL LAGASSÉ H A, *et al.* Mitigation of T-cell dependent immunogenicity by reengineering factor VII a analogue[J]. *Blood Adv.*, 2019, 3(17): 2668-2678.
- [37] 杜力, 刘晓志, 魏敬双, 等. 蛋白质药物糖基化工程化改造研究进展[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(5): 448-455.
- DU L, LIU X Z, WEI J S, *et al.* Research progress of glycosylation engineering of protein drug[J]. *Curr. Biotechnol.*, 2020, 10(5): 448-455.
- [38] BOUNE S, HU P, EPSTEIN A L, *et al.* Principles of N-linked glycosylation variations of IgG-based therapeutics: pharmacokinetic and functional considerations[J/OL]. *Antibodies*, 2020, 9(2): 22[2025-02-27]. <https://doi.org/10.3390/antib9020022>.
- [39] KERNSTOCK R, SPERINDE G, FINCO D, *et al.* Clinical immunogenicity risk assessment strategy for a low risk monoclonal antibody[J/OL]. *Aaps J.*, 2020, 22(3): 60[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1208/s12248-020-00440-5>.
- [40] DOZIER J K, DISTEFANO M D. Site-specific pegylation of therapeutic proteins[J]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(10): 25831-25864.
- [41] ZINSLI L V, STIERLIN N, LOESSNER M J, *et al.* Deimmunization of protein therapeutics-recent advances in experimental

- and computational epitope prediction and deletion[J]. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 2021, 19: 315-329.
- [42] NEWBY M L, ALLEN J D, CRISPIN M. Influence of glycosylation on the immunogenicity and antigenicity of viral immunogens[J/OL]. *Biotechnol. Adv.*, 2024, 70: 108283[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108283>.
- [43] MANNING M C, CHOU D K, MURPHY B M, *et al.* Stability of protein pharmaceuticals: an update[J]. *Pharm. Res.*, 2010, 27(4): 544-575.
- [44] TOROSANTUCCI R, MOZZICONACCI O, SHAROV V, *et al.* Chemical modifications in aggregates of recombinant human insulin induced by metal-catalyzed oxidation: covalent cross-linking *via* Michael addition to tyrosine oxidation products[J]. *Pharm. Res.*, 2012, 29(8): 2276-2293.
- [45] ASMANI A Z A, ZAINUDDIN A F F, AHMAD AZMI MURAD N, *et al.* Immunogenicity of monoclonal antibody: causes, consequences, and control strategies[J/OL]. *Pathol. Res. Pract.*, 2024, 263: 155627[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2024.155627>.
- [46] RASHEED Z, ALI R. Reactive oxygen species damaged human serum albumin in patients with type 1 diabetes mellitus: Biochemical and immunological studies[J]. *Life Sci.*, 2006, 79(24): 2320-2328.
- [47] NABHAN M, PALLARDY M, TURBICA I. Immunogenicity of bioproducts: cellular models to evaluate the impact of therapeutic antibody aggregates[J/OL]. *Front. Immunol.*, 2020, 11: 725[2025-02-27]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00725>.
- [48] HERMELING S, CROMMELIN D J A, SCHELLEKENS H, *et al.* Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins[J]. *Pharm. Res.*, 2004, 21(6): 897-903.
- [49] ROSENBERG A S. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective[J]. *AAPS J.*, 2006, 8(3): 501-507.
- [50] SAUERBORN M, BRINKS V, JISKOOT W, *et al.* Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics[J]. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, 31(2): 53-59.
- [51] SEIDL A, HAINZL O, RICHTER M, *et al.* Tungsten-induced denaturation and aggregation of epoetin alfa during primary packaging as a cause of immunogenicity[J]. *Pharm. Res.*, 2012, 29(6): 1454-1467.
- [52] WALSH G. Biopharmaceutical benchmarks 2010[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28(9): 917-924.
- [53] COST G J, FREYVERT Y, VAFIADIS A, *et al.* BAK and BAX deletion using zinc-finger nucleases yields apoptosis-resistant CHO cells[J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, 105(2): 330-340.
- [54] TUAMEH A, HARDING S E, DARTON N J. Methods for addressing host cell protein impurities in biopharmaceutical product development[J/OL]. *Biotechnol. J.*, 2023, 18(3): e2200115[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1002/biot.202200115>.
- [55] CHUNG C H, MIRAKHUR B, CHAN E, *et al.* Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose- α -1, 3-galactose[J]. *N. Engl. J. Med.*, 2008, 358(11): 1109-1117.
- [56] SALEH H, EMBRY S, NAULI A, *et al.* Anaphylactic reactions to oligosaccharides in red meat: a syndrome in evolution[J/OL]. *Clin. Mol. Allergy*, 2012, 10(1): 5[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1186/1476-7961-10-5>.
- [57] QIAN J, LIU T, YANG L, *et al.* Structural characterization of N-linked oligosaccharides on monoclonal antibody cetuximab by the combination of orthogonal matrix-assisted laser desorption/ionization hybrid quadrupole-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and sequential enzymatic digestion[J]. *Anal. Biochem.*, 2007, 364(1): 8-18.
- [58] JEFFERIS R. Recombinant antibody therapeutics: the impact of glycosylation on mechanisms of action[J]. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2009, 30(7): 356-362.
- [59] BOSQUES C J, COLLINS B E, MEADOR J W, *et al.* Chinese *Hamster* ovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28(11): 1153-1156.
- [60] PADLER-KARAVANI V, VARKI A. Potential impact of the non-human sialic acid N-glycolylneuraminic acid on transplant rejection risk[J]. *Xenotransplantation*, 2011, 18(1): 1-5.
- [61] GHADERI D, TAYLOR R E, PADLER-KARAVANI V, *et al.* Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins[J]. *Nat. Biotechnol.*, 2010, 28(8): 863-867.
- [62] MAEDA E, KITA S, KINOSHITA M, *et al.* Analysis of nonhuman N-glycans as the minor constituents in recombinant monoclonal antibody pharmaceuticals[J]. *Anal. Chem.*, 2012, 84(5): 2373-2379.
- [63] VAN BEERS M M C, JISKOOT W, SCHELLEKENS H. On the role of aggregates in the immunogenicity of recombinant human interferon beta in patients with multiple sclerosis[J]. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2010, 30(10): 767-775.
- [64] YEASMIN M, MOLLA M M A, ABDULLAH AL MASUD H M, *et al.* Safety and immunogenicity of zika virus vaccine: a systematic review of clinical trials[J/OL]. *Rev. Med. Virol.*, 2023, 33(1): e2385[2025-02-27]. <https://doi.org/10.1002/rmv.2385>.
- [65] LI L, YAN X, XIA M, *et al.* Nanoparticle/nanocarrier formulation as an antigen: the immunogenicity and antigenicity of itself[J]. *Mol. Pharm.*, 2022, 19(1): 148-159.
- [66] MARTINA C E, CROWE J E, MEILER J. Glycan masking in vaccine design: targets, immunogens and applications[J/OL]. *Front. Immunol.*, 2023, 14: 1126034[2025-02-27]. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1126034>.