

· 治疗制剂 ·

聚山梨酯对单克隆抗体药物稳定性的影响

朱圣婴^{1,2}, 曹嘉炜^{1,2}, 徐进^{1,2,3}, 陈晨辉^{1,2}, 郭清城⁴, 李军³,
张大鹏^{1,2,3}, 钱卫珠^{1,2,3}, 侯盛^{1,2,3}, 郭怀祖^{1,2,3}

1. 上海张江生物技术有限公司 抗体药物与靶向治疗国家重点实验室, 上海 201203;

2. 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, 上海 201203;

3. 聊城大学药学院, 山东 聊城 252059; 4. 泰州迈博太科药业有限公司, 江苏 泰州 225316

摘要: **目的** 评估不同种类聚山梨酯(polysorbate, PS)对不同种类单克隆抗体(简称单抗)药物稳定性的影响。**方法** 以单抗 A(mAbA, IgG1 前抗体药物)、单抗 B(mAbB, IgG1 单抗)和单抗 C(mAbC, IgG1 单抗, Fc N297A 突变)3 种单抗药物作为模型蛋白, 分别在其各自的制剂处方中添加不同种类及含量的 PS, 并进行影响因素研究, 通过考察蛋白聚集体、不溶性微粒等质量属性的变化, 综合评估 PS 对抗体药物稳定性的影响。**结果** PS20 和 PS80 对于抑制 3 种单抗中聚集体及电荷异质体生成的作用差异均无统计学意义($P > 0.05$), 而 mAbB 中加入 PS80, mAbC 中加入 PS20 分别能起到更显著地抑制不溶性微粒增加的效果($P < 0.05$); PS20 含量的高低对于 mAbC 中电荷异质体及不溶性微粒的检测指标影响显著($P < 0.05$)。**结论** 不同类型的单抗对于不同种类、不同含量 PS 的敏感度不同, 因此在进行单抗制剂处方设计时, 需选择适合的 PS 种类及含量, 以进一步提高单抗制剂的稳定性。

关键词: 聚山梨酯; 单克隆抗体; 稳定性; 聚集体; 不溶性微粒

中图分类号: Q816 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)02-0172-06

Effects of polysorbates on stability of monoclonal antibody drugs

ZHU Sheng-ying^{*}, CAO Jia-wei, XU Jin, CHEN Chen-hui, GUO Qing-cheng, LI Jun,
ZHANG Da-peng, QIAN Wei-zhu, HOU Sheng, GUO Huai-zu

^{*}Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., State Key Laboratory of Antibody
Medicine and Targeted Therapy, Shanghai 201203, China

Corresponding author: GUO Huai-zu, E-mail: guohuaizu@163.com

Abstract: Objective To evaluate the effects of various polysorbates (PS) on the stability of different types of monoclonal antibody (mAb) drugs. **Methods** Three types of monoclonal antibodies mAbA (IgG1 proantibody drug), mAbB (IgG1 mAb) and mAbC (IgG1 mAb with Fc N297A mutation) were used as model proteins, and different kinds or contents of PS were added into the mAb formulations respectively to investigate the influencing factors. The effects of PS on the stability of mAb drugs were evaluated comprehensively by detecting the changes of quality attributes, such as protein aggregates and insoluble particles. **Results** PS20 and PS80 showed no significant difference in inhibiting the formation of aggregates and charge variants in the three mAbs ($P > 0.05$), while the addition of PS80 in mAbB and PS20 in mAbC significantly inhibited the increase of insoluble particles respectively ($P < 0.05$); The content of PS20 showed a significant effect on the detection indexes of charge variants and insoluble particles in mAbC ($P < 0.05$). **Conclusion** Different types of mAbs have different sensitivities to various kinds and contents of PS. Therefore, when designing the formulation of mAbs, it is necessary to select appropriate kinds and contents of PS to further improve the stability of mAb drugs.

Keywords: Polysorbate (PS); Monoclonal antibody (mAb); Stability; Aggregates; Insoluble particle

基金项目: 上海市科技创新行动计划科技支撑项目生物医药专题(19431907500); 上海技术带头人项目(18XD1422300); 上海启明星项目(19QB1400700); 山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1802).

通信作者: 郭怀祖, E-mail: guohuaizu@163.com

单克隆抗体(简称单抗)药物以其特异性高、疗效确切、半衰期长等特点,在恶性肿瘤以及自身免疫疾病治疗中占有越来越重要的地位^[1]。但单抗的稳定性较差,在储存或使用过程中易发生聚集^[2],因此需在其制剂处方中加入赋形剂、表面活性剂等保护剂以抑制其聚集体的产生^[3]。目前已上市的山梨糖醇类单抗药物中使用较多的表面活性剂是聚山梨酯(polysorbate, PS)20和PS80,其主要区别在于脂肪酸侧链的结构、长度及饱和度不同导致的其与蛋白亲和力的不同^[4-5]。一般认为PS20的稳定性更好,抑制聚集体的效果更柔和^[6],PS80的增溶性更强^[7],因此,针对不同的单抗药物,其保护效果可能呈现一定的差异性。此外,PS本身在高温或光照等恶劣条件下易被氧化形成某些过氧化物^[8-9],而这些过氧化物又会氧化单抗的某些氨基酸残基导致其稳定性下降^[10],因此,需对PS的添加量进行合理设计。针对于PS影响单抗稳定性的研究已成为热点,特别是其对于单抗制剂中不溶性微粒的形成机制研究^[11-12],但PS种类间的对比研究仍较少,不同种类PS对于单抗稳定性影响的差异仍不明确,因此,有必要针对性地进行相关研究,明确不同种类、不同含量PS对单抗稳定性影响的差异。

本研究以多种不同类型的单抗作为模型蛋白,分别在其制剂处方基础上添加不同种类或含量的PS,并进行各种影响因素研究,通过检测各影响因素条件下蛋白聚集体、电荷异质体和不可溶性微粒等质量属性的变化,评估不同种类、不同含量的PS对于单抗药物稳定性的影响差异,从而为PS在单抗药物制剂处方中的研究应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 单抗 单抗A(mAbA, IgG1 前抗体药物)、单抗B(mAbB, IgG1 单抗)和单抗C(mAbC, IgG1 单抗, Fc N297A 突变)均由上海张江生物技术有限公司研制。

1.2 主要试剂及仪器 磷酸二氢钠购自默克化工技术(上海)有限公司;磷酸氢二钠购自成都华邑药用辅料制造有限责任公司;氯化钠购自江苏省勤奋药业有限公司;CX-1 pH Gradient Buffer A 和 CX-1 pH

Gradient Buffer B 购自美国 Thermo Fisher 公司;PS20 和 PS80 购自南京威尔药业集团股份有限公司;30 KD 超滤膜包和 0.2 μm 针式滤器购自美国 Millipore 公司;MS3002S / 01 型电子天平和 220-K-CN 型 pH 计购自美国梅特勒托利多公司;PALL FS010K10 型台式超滤系统购自美国 Pall 公司;THZ-C-1 型全温振荡器购自苏州培英实验设备有限公司;ICH 110 L 恒温培养箱和 ICH 750 L 恒温培养箱购自德国美墨尔特公司;Waters ACQUITY UPLC 高效液相色谱仪和 Waters SEC 200Å 色谱柱(1.7 μm, 4.6 mm × 150 mm)购自美国 Waters 公司;Thermo MABPac SCX-10(10 μm, 4 mm × 150 mm)购自美国 Thermo Fisher 公司;GWF-8JA 型微粒分析仪购自天津天河分析仪器有限公司。

1.3 PS 种类对单抗稳定性影响的检测 使用 30 KD 超滤膜包分别将 mAbA、mAbB 及 mAbC 置换至各自特定的制剂处方中,并按表 1 添加不同种类及指定浓度的 PS 以完成不同处方条件的配制,最后使用 0.2 μm 滤器对各处方条件下的样品进行过滤后分装至离心管中,并进行高温及振荡等影响因素试验,实施方式及检测方法见表 2。每个条件每个取样点的样品均设 3 个复孔,所有检测数据均取其平均值后绘制柱状图。

1.4 PS 含量对单抗稳定性影响的检测 使用 30 KD 超滤膜包将 mAbC 置换至特定的制剂处方中,加入 PS20 使其终浓度分别为 0.025、0.05 及 0.5 g / L,以完成 3 种处方条件的配制,最后使用 0.2 μm 滤器对各处方条件下的样品过滤后分装至离心管中进行高温、光照及振荡等影响因素试验,实施方式及检测方法见表 2。每个条件每个取样点的样品均设 3 个复孔,所有检测数据均取其平均值后绘制柱状图。

表 1 mAbA、mAbB 及 mAbC 的各处方条件

Tab. 1 Formulations of mAbA, mAbB and mAbC

单抗	组别	PS80(g / L)	PS20(g / L)
mAbA	PS80	1	0
	PS20	0	1
mAbB	PS80	0.6	0
	PS20	0	0.6
mAbC	PS80	0.05	0
	PS20	0	0.05

表 2 各影响因素试验及检测方法

Tab. 2 Test and detection methods of various influencing factors

影响因素试验	条件参数	检测方法
高温	40 °C, 60% RH, 0, 20 d	SEC-HPLC, IEX-HPLC
光照	(4 500 ± 500) lx, 2 ~ 8 °C, 0, 20 d	SEC-HPLC, IEX-HPLC
振荡	2 ~ 8 °C, 250 r / min, 0, 20 d	SEC-HPLC, IEX-HPLC, 不溶性微粒

注:RH 为相对湿度;lx 为光照强度单位“勒克斯”。

1.5 指标检测

1.5.1 尺寸排阻色谱法(SEC-HPLC)纯度分析 色谱柱: Waters SEC 200Å column (1.7 μm, 4.6 mm × 150 mm); 流动相: 200 mmol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0; 流速: 0.2 mL/min; 上样量: 50 μg; 柱温: 25 °C; 样品池温度: 5 °C; 检测波长: 280 nm。使用 Waters ACQUITY UPLC 高效液相色谱仪对试验结果进行数据处理, 用面积归一化法计算纯度。

1.5.2 离子交换色谱法(IEX-HPLC)纯度分析 色谱柱: Thermo MABPac SCX-10 (10 μm, 4 mm × 150 mm); mAbA 和 mAbB 所用流动相 A: 125 mmol/L 磷酸二氢钠, 流动相 B: 125 mmol/L 磷酸氢二钠, 流动相 C: 1 mol/L 氯化钠, 流动相 D: 超纯水; mAbC 所用流动相 A: CX-1 pH Gradient Buffer A, pH 5.8, 流动相 B: CX-1 pH Gradient Buffer B, pH 10.2; 流速: 0.5 mL/min; 上样量: 50 μg; 检测波长: 280 nm。使用 Waters ACQUITY UPLC 高效液相色谱仪对试验结果进行数据处理, 用面积归一化法计算纯度。

1.5.3 不溶性微粒检测 取合并后总体积不少于 25 mL 的供试品, 置于检测容器中, 静置 20 min 后检测。直接将检测容器置于微粒分析仪的取样器上, 开启搅拌, 使溶液混匀, 由仪器直接抽取适量溶液。测定 4 次, 每次抽取量不少于 5 mL。第 1 次数据不计, 取后续测定结果的平均值, 打印原始数据。

1.6 统计学分析 采用 JMP13.2.0 软件进行统计学分析, 实验数据用均数 ± 标准差表示。两组之间比较采用 *t* 检验, 多组之间比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PS 种类对抗体稳定性的影响

2.1.1 SEC-HPLC mAbA 在经历高温及振荡后, 其聚集体含量呈显著上升趋势, 稳定性较差, 高温条件下 PS80 和 PS20 组的聚集体含量分别为 0.82% 和 0.81%, 振荡条件下聚集体含量分别为 0.51% 和 0.50%, 差异均无统计学意义 (t 分别为 1.512 和 0.522, P 分别为 0.207 和 0.631)。相比较而言, mAbB 和 mAbC 呈现出较优的稳定性, 其聚集体含量均无太大改变, 且 mAbB 在高温条件下 PS80 及 PS20 组的聚集体含量分别为 0.49% 和 0.52%, 振荡条件下的聚集体含量分别为 0.48% 和 0.49%, 差异均无统计学意义 (t 分别为 -1.765 和 0.632, P 分别为 0.167 和 0.567)。mAbC 在高温条件下 PS80 及 PS20 组的聚集体含量分别为 0.83% 和 0.87%, 振荡条件下的聚集体含量

分别为 0.89% 和 0.91%, 差异均无统计学意义 (t 分别为 -1.037 和 -1.809, P 分别为 0.407 和 0.150)。见图 1。

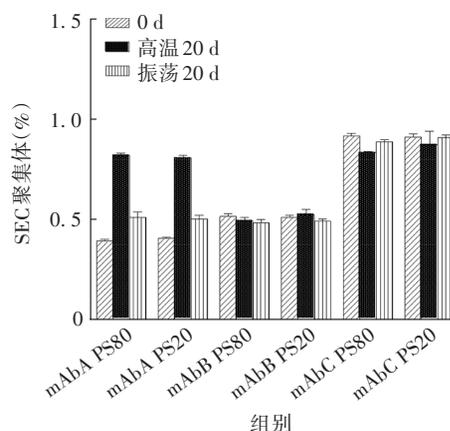


图 1 不同影响因素试验下各条件组 SEC 聚集体的变化趋势图

Fig. 1 Change trend diagram of SEC aggregates in groups with various conditions in test under different influencing factors

2.1.2 IEX-HPLC 相较于振荡条件, 3 种单抗对于高温条件的影响均较为敏感, 3 者在经历高温后, 其 IEX 主峰含量均呈不同程度的递减趋势 (主峰大部分转化为酸性变异体), 而在经振荡后, 其主峰含量均无显著变化。mAbA 在高温条件下 PS80 及 PS20 组的主峰含量分别为 12.7% 和 12.6%, 振荡条件下的主峰含量分别为 21.9% 和 21.7%, 差异均无统计学意义 (t 分别为 0.265 和 1.095, P 分别为 0.808 和 0.344)。mAbB 在高温条件下 PS80 及 PS20 组的主峰含量分别为 58.5% 和 58.3%, 振荡条件下的主峰含量分别为 73.3% 和 73.1%, 差异均无统计学意义 (t 分别为 1.581 和 0.318, P 分别为 0.200 和 0.767)。mAbC 在高温条件下 PS80 及 PS20 组的主峰含量分别为 62.6% 和 62.7%, 振荡条件下的主峰含量分别为 74.0% 和 74.1%, 差异均无统计学意义 (t 分别为 -1.000 和 -1.225, P 分别为 0.387 和 0.288)。见图 2。

2.1.3 不溶性微粒 针对于 mAbA, PS80 及 PS20 处理的样品在振荡后其直径 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 6.9 和 6.3 个/mL, 直径 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 1.1 和 1.4 个/mL, 两者差异均无统计学意义 ($\geq 10 \mu\text{m}$: $t = 0.593$, $P = 0.587$, $\geq 25 \mu\text{m}$: $t = -0.368$, $P = 0.733$); 针对于 mAbB, PS80 及 PS20 处理的样品在振荡后其直径 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 7.8 和 11.3 个/mL, 差异有统计学意义 ($t = -3.137$, $P = 0.046$), 直径 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微

粒个数分别为 2.4 和 3.6 个 / mL, 差异无统计学意义 ($t = -1.108, P = 0.331$), 即 PS80 对于抑制 mAbB 中直径 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒增加的效果更为显著; 针对于 mAbC, PS80 及 PS20 处理的样品在振荡后其直径 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 13.7 和 7.9 个 / mL, 直径 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 3.3 和 1.1 个 / mL, 两者差异均有统计学意义 ($\geq 10 \mu\text{m}: t = 4.669, P = 0.037, \geq 25 \mu\text{m}: t = 6.128, P = 0.022$), 即 PS20 对于抑制 mAbC 中不溶性微粒增加的效果更为显著。见图 3。上述结果也表明, 不同种类的 PS 对于抑制不同类型单抗不溶性微粒增加的效果具有一定差异性。

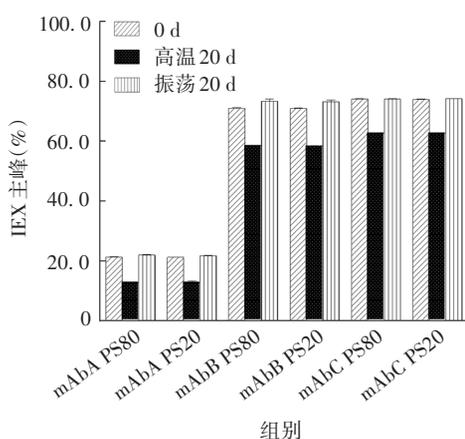


图 2 不同影响因素试验下各条件组 IEX 主峰的变化趋势图

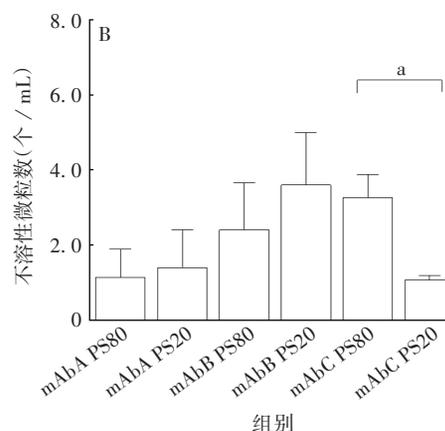
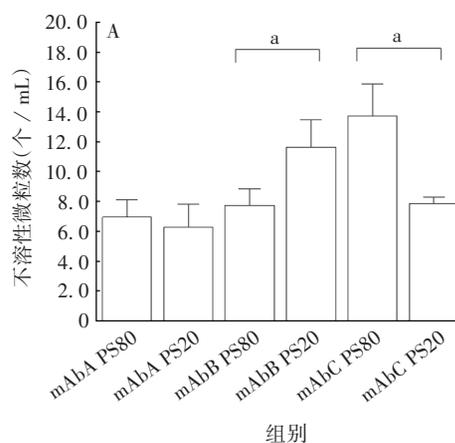
Fig. 2 Change trend diagram of main peak of IEX in groups with various conditions in test under different influencing factors

2.2 PS 含量对单抗稳定性的影响

2.2.1 SEC-HPLC 0.025、0.05 及 0.5 g / L PS20 浓度下的 mAbC 在经历高温、光照及振荡后, 其聚集体含量均呈上升趋势, 高温后生成的聚集体含量分别为 0.77%、0.76% 和 0.80%, 三者差异无统计学意义 ($F = 1.444, P = 0.308$); 光照后生成的聚集体含量分别为 0.79%、0.76% 和 0.77%, 三者差异无统计学意义 ($F = 0.536, P = 0.611$); 振荡后生成的聚集体含量均为 0.90%, 三者差异无统计学意义 ($F = 0.071, P = 0.932$)。见图 4。表明 PS20 浓度在 0.025 ~ 0.5 g / L 范围内对于抑制 mAbC 聚集体生成的效果趋于一致。

2.2.2 IEX-HPLC 0.025、0.05 及 0.5 g / L PS20 浓度下的 mAbC 在经历振荡后, 其 IEX 主峰均无显著变化; 而在经历高温及光照后, 3 种 PS20 浓度下的样品其主峰含量均呈递减趋势 (主峰大部分转化为酸性

变体)。高温后生成的主峰含量分别为 60.7%、62.7% 和 62.4%, 即 0.025 g / L PS20 浓度下的 mAbC 与 0.05 及 0.5 g / L PS20 组之间差异有统计学意义 (t 分别为 15.491 和 13.168, P 分别为 0.000 和 0.001), 0.025 g / L PS20 组其主峰含量相对较低。光照后生成的主峰含量分别为 53.7%、55.4% 和 53.7%, 三者差异无统计学意义 ($F = 3.757, P = 0.088$); 振荡后生成的主峰含量分别为 74.2%、74.0% 和 74.1%, 三者差异无统计学意义 ($F = 0.867, P = 0.467$)。见图 5。表明 PS20 浓度在 0.025 ~ 0.5 g / L 范围内对于 mAbC 中电荷异质体的影响基本一致, 但较低的 PS20 浓度也可能会影响该单抗主峰的含量。



注: a 表示 $P < 0.05$ 。

图 3 振荡试验下各条件组 $\geq 10 \mu\text{m}$ (A) 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ (B) 不溶性微粒个数比较

Fig. 3 Comparison of number of insoluble particles $\geq 10 \mu\text{m}$ (A) and $\geq 25 \mu\text{m}$ (B) in groups with various conditions after shaking

2.2.3 不溶性微粒 0.025、0.05 及 0.5 g / L PS20 浓

度下的 mAbC 在经历振荡后,其直径 $\geq 10 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 225.5、7.9 和 17.2 个 / mL, 0.025 g / L PS20 浓度与其他 2 个浓度之间差异有统计学意义 (t 分别为 -36.235 和 -32.727, P 分别为 0.001 和 0.000); 直径 $\geq 25 \mu\text{m}$ 的不溶性微粒个数分别为 13.7、1.1 和 7.8 个 / mL, 3 种浓度两两之间差异均有统计学意义 (t 分别为 -30.660、-4.556 和 5.502, P 分别为 0.001、0.031 和 0.031)。见图 6。mAbC 在 0.025 g / L PS20 浓度下,其不溶性微粒的生成数量最多;在 PS20 浓度为 0.05 g / L 时,其不溶性微粒的生成数量最少。表明 0.025 g / L PS20 对于抑制不溶性微粒增加的效果有限,而随着 PS20 浓度上升,其抑制效果逐渐增强,当浓度达 0.5 g / L 时,其作用趋于饱和。

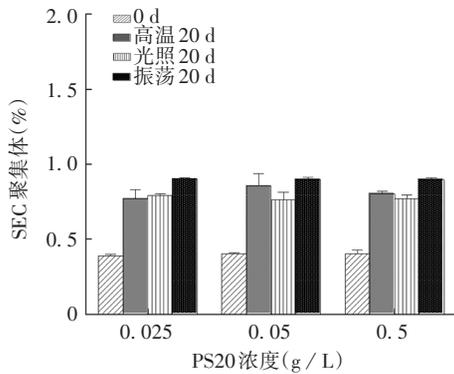
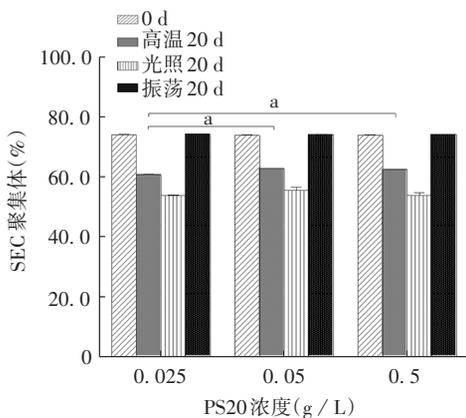


图 4 不同 PS20 浓度下 mAbC 的 SEC 聚集体变化趋势图

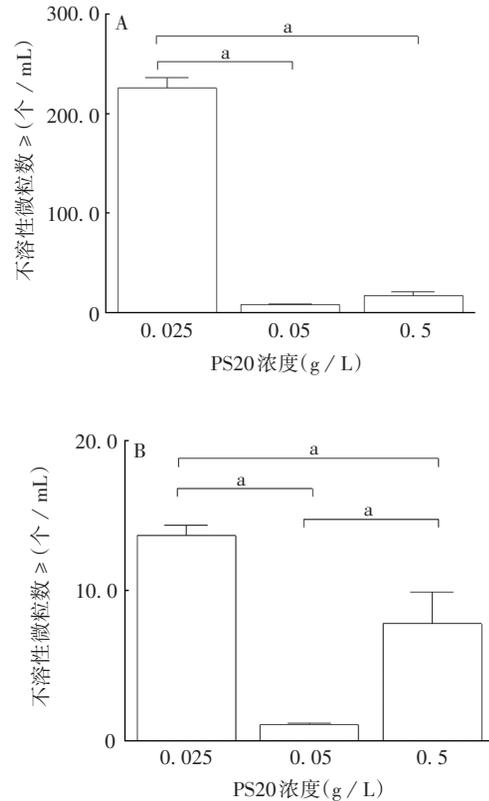
Fig. 4 Change trend diagram of aggregates of SEC of mAbC under different concentrations of PS20



注: a 表示 $P < 0.05$ 。

图 5 不同 PS20 浓度下 mAbC 的 IEX 主峰变化趋势图

Fig. 5 Change trend diagram of main peak of IEX of mAbC under different concentrations of PS20



注: a 表示 $P < 0.05$ 。

图 6 不同 PS20 浓度下 mAbC 中 $\geq 10 \mu\text{m}$ (A) 和 $\geq 25 \mu\text{m}$ (B) 不溶性微粒个数比较

Fig. 6 Comparison of number of insoluble particles $\geq 10 \mu\text{m}$ (A) and $\geq 25 \mu\text{m}$ (B) of mAbC under different concentrations of PS20

3 讨论

为探究 PS 种类及含量对于不同类型单抗类药物稳定性影响的差异,本研究以对于单抗类药物具有一定代表性的几种不同类型的抗体作为模型蛋白,并在每种单抗制剂处方基础上加入不同种类或不同含量的 PS 以进行相关质量参数的比较。PS 种类的研究结果显示, mAbA 相较于其他 2 种单抗,对于外界影响因素的作用更为敏感, PS80 或 PS20 的加入并不能很好地改善其纯度大幅降低的情况,且两种 PS 在抑制其聚集体及不溶性微粒形成的效果方面相似,抑制聚集体形成的程度也有限,因此,为进一步提高 mAbA 的稳定性,可能还需对制剂处方中的其他辅料进行筛选优化。针对于 mAbB 及 mAbC,制剂处方中添加不同种类的 PS 对于抑制单抗聚集体形成及维持抗体电荷异质体方面起到了一定的作用,且二者所起的作用无显著性差异,而在不溶性微粒的抑制效果方面, mAbB 在添加 PS80 的处方中其

不溶性微粒形成数目更少,相反 mAbC 更适合添加 PS20。上述研究结果也表明,针对于不同类型的单抗,PS 的保护效果具有一定的相似性,但在不溶性微粒指标上呈现一定的差异,因此,在设计单抗药物的制剂处方时,可基于这些共性和差异,对 PS 的种类进行筛选评估,从而挑选出最适合于该单抗的 PS 种类。

PS 含量研究结果显示,当 PS20 浓度在 0.025 ~ 0.5 g/L 范围内时,mAbC 在聚集体含量上的变化趋于一致,即 PS20 浓度在一个较宽的对抑制聚集体增加呈相似的效用。但对于 mAbC 的其他特性,如电荷变异体的指标方面,PS20 浓度过低将导致电荷变异体中主峰的含量下降。此外,过低的 PS20 浓度还将无法有效抑制制剂中不溶性微粒数目的增加,而随着 PS20 浓度上升,其抑制作用也将逐步增强并最终达到饱和。该研究结果也表明,PS 含量的多少将直接影响其保护单抗的能力,过低浓度的 PS 其保护作用有限,而高浓度的 PS 又无法进一步提升其保护性能,且会增加 PS 降解后引入相关杂质而造成蛋白免疫原性增强及稳定性降低的风险,因此,单抗的制剂处方设计中同样需关注 PS 的添加量。

PS 对于单抗类药物稳定性的影响,涉及到不同的层面及深度^[13-15],本研究仅针对其种类及含量进行了相关的考察和评估,旨在说明不同类型的单抗其对于不同种类、不同含量 PS 的敏感度各不相同,因此在设计单抗的制剂处方时需对 PS 种类及含量进行全面的筛选和比较。而随着 PS 在单抗药物制剂中的应用越来越广泛,如何正确合理地选择 PS 仍是未来单抗药物制剂处方开发的重要课题^[16],对于其如何影响单抗药物稳定性的机理也需进行更深入的研究。

参考文献

- [1] WANG L, YOU L N, PI T, *et al.* Analysis on monoclonal antibody anti-tumor drugs approved listing by FDA from 2011 to 2017 [J]. *Drugs & Clinic*, 2018, 33 (10): 2758-2762. (in Chinese)
王丽,游丽娜,皮婷,等. 2011-2017 年 FDA 批准上市的单克隆抗体抗肿瘤药物的解析[J]. *现代药物与临床*, 2018, 33 (10): 2758-2762.
- [2] QIU X, LUO J H. Roles of the components of product formulation of monoclonal antibodies and the points to consider for drug evaluation [J]. *Chin J New Drugs*, 2019, 28 (16): 1947-1953. (in Chinese)
邱晓,罗建辉. 重组单克隆抗体药物制剂处方的作用及相关审评要点[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28 (16): 1947-1953.
- [3] WANG W, OHTAKE S. Science and art of protein formulation development [J]. *Int J Pharmaceutics*, 2019, 568: 118505.
- [4] MARTOS A, KOCH W, JISKOOT W, *et al.* Trends on analytical characterization of polysorbates and their degradation products in biopharmaceutical formulations [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2017, 106 (7): 1722-1735.
- [5] BROVČ E V, MRAVLJAK J, ŠINK R, *et al.* Degradation of polysorbates 20 and 80 catalysed by histidine chloride buffer [J]. *European J Pharmaceutics Biopharmaceutics*, 2020, 154: 236-245.
- [6] SHIRE S J. Monoclonal antibodies meeting the challenges in manufacturing, formulation, delivery and stability of final drug product [M]. UK: Woodhead Publishing, 2015: 110-111.
- [7] KOTHEKAR S C, WAREA M, WAGHMARE J T, *et al.* Comparative analysis of the properties of Tween-20, Tween-60, Tween-80, Arlacel-60, and Arlacel-80 [J]. *J Dispersion Sci Technol*, 2007, 28 (3): 477-484.
- [8] KERWIN B A. Polysorbate 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutic: structure and degradation pathways [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2008, 97 (8): 2924-2935.
- [9] SCHMIDT A, KOULOV A, HUWYLER J, *et al.* Stabilizing polysorbate 20 and 80 against oxidative degradation [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2020, 109 (6): 1924-1932.
- [10] YARBROUGH M, HODGE T, MENARD D, *et al.* Edetate disodium as a polysorbate degradation and monoclonal antibody oxidation stabilizer [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2019, 108: 1631-1635.
- [11] DOSHI N, FISH R, PADILLA K, *et al.* Evaluation of super refined™ polysorbate 20 with respect to polysorbate degradation, particle formation and protein stability [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2020, 109: 2986-2995.
- [12] ROY I, PATEL A, KUMAR V, *et al.* Polysorbate degradation and particle formation in a high concentration mAb: Formulation strategies to minimize effect of enzymatic polysorbate degradation [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2021, 110 (9): 3313-3323.
- [13] SINGH S M, BANDI S, JONES D N M, *et al.* Effect of polysorbate 20 and polysorbate 80 on the higher order structure of a monoclonal antibody and its Fab and Fc fragments probed using 2D NMR [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2017, 106 (12): 3486-3498.
- [14] NOWAK C, CHEUNG J K, DELLATORE S M, *et al.* Forced degradation of recombinant monoclonal antibodies: A practical guide [J]. *mAbs*, 2017, 9 (8): 1217-1230.
- [15] ZHOU C, QI W, LEWIS E N, *et al.* Reduced subvisible particle formation in lyophilized intravenous immunoglobulin formulations containing polysorbate 20 [J]. *J Pharmaceutical Sci*, 2016, 105 (8): 2302-2309.
- [16] BROVČ E V, MRAVLJAK J, ŠINK R, *et al.* Rational design to biologics development: The polysorbates point of view [J]. *Int J Pharmaceutics*, 2020, 581: 119285.