

· 特约稿 ·

# 生物技术药物脱酰胺化检测方法概述\*

李恒<sup>1</sup>, 何雁南<sup>1</sup>, 马吉胜<sup>2</sup>, 刘姗姗<sup>3</sup>, 周朝晖<sup>3</sup>

(1. 武汉药品医疗器械检验所, 武汉 430075; 2. 温州医科大学药学院, 温州 325035; 3. 东北大学化学与生物化学系, 巴奈特化学与生物分析研究所, 美国波士顿 02115)

**摘要** 生物技术药物近年来飞速发展, 其质量控制也越来越受到关注。脱酰胺化反应是生物技术药物质量控制中不可忽视的一方面, 特别是脱酰胺化产生的异天冬氨酸(isoAsp)。该文描述天冬酰胺(Asn)残基的脱酰胺化, 以及脱酰胺化对生物技术药物的影响。对国内外脱酰胺化的检测方法进行汇总, 包括处理方法和仪器分析方法。其中对 isoAsp 位点的鉴定和含量测定进行较为详细地介绍。开展脱酰胺化的研究对我国生物技术药物的质量控制具有积极的意义。

**关键词** 生物技术药物; 脱酰胺化; 异天冬氨酸; 质量控制; 检测方法

中图分类号 R977 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2019)02-0147-06

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2019.02.002

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



## Overview of Determination Methods for Deamidation Reaction of Biotech Drugs

LI Heng<sup>1</sup>, HE Yannan<sup>1</sup>, MA Jisheng<sup>2</sup>, LIU Shanshan<sup>3</sup>, ZHOU Zhaohui<sup>3</sup> (1. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan 430075, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 3. Department of Chemistry and Chemical Biology, Barnett Institute of Chemical and Biological Analysis, Northeastern University, Boston, MA 02115, USA)

**ABSTRACT** Quality control of biotech drugs has attracted increasing attentions in recent years. Deamidation reaction is one of the major concerns in quality control of biotech drugs, due to the generation of isoaspartic acid(isoAsp). This paper describes the deamidation of asparagine(Asn) residues and its effects on the biological drugs. The detection methods currently used in China and overseas for this reaction, including pretreatment protocols and instrumental analysis were described. The identification and determination of isoaspartyl sites were also described in detail, along with the positive impact on the development of biotech drugs in China by the studies on deamidation reactions.

**KEY WORDS** Biotech drug; Deamidation; Isoaspartic acid; Quality control; Determination method

近年来,我国生物医药行业迅速蓬勃发展。据艾美仕(Intercontinental Marketing Services, IMS)预测,到2020年,我国生物医药市场将成为仅次于美国的全球第二大生物医药市场,其中抗体药物和蛋白药物等生物技术药物未来可产生3000亿~5000亿元市场。据2016年不完全统计,我国已批准上市的生物技术药有44种<sup>[1]</sup>,并且获批品种数量还在逐年增加。随着《中华人民共和国药典》2015年版的实施,生物技术药物

的质量控制将会大幅提高,质量标准逐步与国际接轨,药品质量将达到国际水平。

生物技术药物不同于传统的小分子药物,生产、储存及运输条件等因素的改变都会引起其蛋白的异构、变性,从而引起难以预测的临床药物不良反应。脱酰胺化(deamidation)是常见的蛋白翻译后修饰形式,普遍存在蛋白、多肽类药物中。异天冬氨酸(isoaspartic acid, isoAsp)是脱酰胺化的特异性降解产物,其存在量能反映药物脱酰胺化的程度。因此,国外生物药品生产企业在向美国食品药品监督管理局(FDA)、欧盟药品管理局(EMA)申报药品资料时都会提供该申报药品脱酰胺化的相关检测数据。饶春明等<sup>[2]</sup>对2015年版《中华人民共和国药典》生物技术药质量控制相关内容进行切实详尽的阐述,并以人用重组DNA蛋白制品为例,其中指出氨基酸序列测定时应考虑各种可能的翻译后修饰(如脱酰胺化、氧化、异构化等)<sup>[3]</sup>。韦薇等<sup>[4]</sup>将脱酰胺化列入重组单克隆抗体产品相关物

收稿日期 2018-05-06 修回日期 2018-08-08

**基金项目** \*武汉市第五批“黄鹤英才计划”(2017);湖北省食品药品监督管理局科研项目(201801013)

**作者简介** 李恒(1981-),男,湖北武汉人,主管药师,硕士,研究方向:药品质量分析。ORCID: 0000-0002-4917-6643。电话:027-65395458, E-mail: lihengleo@foxmail.com。

**通信作者** 周朝晖(1968-),男,终身正教授,研究员,博士后,研究方向:生物大分子药物关键技术和蛋白质修饰的化学与分析。电话:001-617-373-4818, E-mail: z. zhou@northeastern.edu。

质或杂质研究范围。这些生物技术药物发生脱酰胺化的可能性非常高,其结果有待研究与分析。

随着生物技术药物的发展,脱酰胺化研究报道也越来越多<sup>[5-6]</sup>。目前为止《中华人民共和国药典》及法规都尚未对生物技术药物中脱酰胺化作出指导方法或建立明确的标准,也没有对其产生的 isoAsp 进行必要的定性定量检测。因此笔者对脱酰胺化的检测方法在国内外研究的进展综述如下。

## 1 脱酰胺化及其对生物技术药物的影响

### 1.1 脱酰胺化定义

脱酰胺化是指多肽或蛋白中天冬酰胺 (asparagine, Asn) 残基自发的非酶催化的脱酰胺反应。Asn 脱去其侧链上的氨基,形成五元环的琥珀酰亚胺中间体,进而水解形成天冬氨酸 (aspartic acid, Asp) 和 isoAsp。谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 残基也能发生脱酰胺化,但发生较少且转化速率较 Asn 慢得多,产生量也很低<sup>[7-9]</sup>,这里主要讨论 Asn 脱酰胺化。

### 1.2 影响脱酰胺化因素

脱酰胺化反应的发生是个极其复杂的过程,isoAsp 的产生速度取决于多种因素,包括蛋白质多肽的原始序列、构象、pH 值和温度等。在没有固定空间结构的肽中,位于 Asn 或 Asp 的 C 端残基起主要作用;作为最灵活和酸性(主链酰胺)的 Asn-甘氨酸 (glycine, Gly) (NG) 在生理条件下表现出最高的脱酰胺速率(半衰期约 1 d);Asn-丝氨酸 (serine, Ser) (NS) 和 Asn-组氨酸 (histidine, His) (NH),在酸催化条件下,除 NG 外脱酰胺速率比大多数其他序列要快得多;由于脯氨酸 (proline, Pro) 中含有仲胺,因此 Asn-Pro (NP) 并没有观察到脱酰胺反应。总而言之,蛋白质多肽中含 NG 结构很可能发生,含 NS 结构可能发生,而含 NP 大多不发生脱酰胺化。在生理条件下,Asp 异构化速率约为 Asn 的 1/40<sup>[10]</sup>。而琥珀酰亚胺中间体通常以 3:1 的比例水解成 isoAsp 和 Asp<sup>[11-12]</sup>。生物信息学分析和实验研究均表明,蛋白质中 Asn (~4%) 和 Asp (~5%) 生成 isoAsp 概率均较高,而 isoAsp 是普遍存在且发挥着不同作用。

### 1.3 脱酰胺化对生物技术药物的影响

isoAsp 是普遍存在的,它会改变蛋白质的结构和功能<sup>[13-14]</sup>。许多生物技术药物在生产、储存等过程中都有可能发生非酶催化的脱酰胺化反应,这将对其结构与稳定性产生影响<sup>[15]</sup>,从而造成药物本身活性的降低甚至完全丧失,如重组人干细胞因子<sup>[16]</sup>、重组人免疫球蛋白抗体 E<sup>[17]</sup>、重组人生长激素<sup>[18]</sup>等。不仅如此,科学家们在多个领域的研究中发现脱酰胺化及可能的重要影响,包括对神经生物学,细胞粘附,癌症和免疫原性的影响<sup>[19-20]</sup>。

### 1.4 脱酰胺化研究的难点

isoAsp 的形成可以说是最常见的蛋白质翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 之一,并且它是最小的 PTM。首先,鉴定含有 isoAsp 的蛋白质已经非常困难,而且还需在蛋白质中将其精确定位;其次,isoAsp 和 Asp 是相同质量的异构体,并不能通过质谱法直接将二者进行区分;最后,isoAsp 的产生是个动态变化的过程,建立准确定量的检测方法十分困难。因此寻找准确合适的方法将其区分并测定,是许多实验研究人员努力的方向。

## 2 脱酰胺化的检测方法

### 2.1 处理方法

少量多肽药物不需酶切,如重组人胰岛素、重组人生长激素等,加入适当浓度的盐酸或缓冲液,在室温放置 24 h,采用高效液相色谱 (HPLC) 法可以直接有效地分离脱胺组分或产物。《中华人民共和国药典》2015 年版已收入上述两个品种,并对其对应的脱胺组分有相应的检查要求<sup>[21]</sup>。徐军等<sup>[5]</sup>对《中华人民共和国药典》重组人胰岛素注射液中有物质检查方法进行优化,并用质谱 (mass spectrometry, MS) 鉴定 B3 和 B3iso 脱氨人胰岛素。

生物技术药物相对分子质量大,通常需使用胰蛋白酶等内切蛋白酶进行消化水解成多肽片段(必要时进行富集),然后在一定的温度下,将肽段在醋酸铵或碳酸氢铵缓冲液中进行孵化,最后利用酶法[异天冬氨酸甲基转移酶 (protein L-isoaspartyl methyltransferase, PIMT)、天冬氨酸肽链内切酶 Asp-N (endoprotease Asp-N)]、同位素标记(<sup>18</sup>O)法等进行进一步处理,进而采用不同分析仪器对 isoAsp 进行鉴定或含量测定。

①PIMT。该方法是最常见最有效的用于蛋白药物中 isoAsp 定性定量检测手段之一<sup>[15,22]</sup>,通常采用 ISOQUANT<sup>®</sup> Isoaspartate Kit 试剂盒进行测定。其原理是利用 PIMT 特异性,通过催化 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, AdoMet, SAM) 上甲基转移到 isoAsp 的  $\alpha$ -羧基位置上,生成琥珀酰亚胺中间体,随后在甲基化过程中自发分解并释放甲醇;而 SAM 失去-CH<sub>3</sub> 生成 S-腺苷高半胱氨酸 (S-adenosyl-L-homocysteine, SAH)。采用 HPLC 测定生成的 SAH 含量,从而间接对 isoAsp 定量。该方法以 isoAsp-DSIP 作为对照品,isoAsp 在 5~250 pmol · L<sup>-1</sup> 浓度的范围内,其含量与 SAH 峰面积之间有良好的重复性和线性关系;蛋白或多肽浓度范围应控制在 7.5~37.5 pmol · L<sup>-1</sup>。毕华等<sup>[6]</sup>利用该方法对重组人血管内皮生长抑制剂中 isoAsp 的含量进行测定,表明生物技术药物的质量越来越受到我国监管部门的重视,脱

酰胺化的检测将会在未来几年内逐步开展。该方法不足在于:它只能全面定量 Asn 和 Asp 所有位点上的 isoAsp 残基,而不能确证每个单独位点的信息;不能用于检测 Gln 的脱酰胺化;也不能检测位于肽 N-末端 isoAsp 残基。

ALFARO 等<sup>[23]</sup>应用 PIMT 选择性地将 isoAsp 生成其甲酯,再将不稳定甲酯在水溶液中加入强亲核试剂,如肼(hydrazine)形成酰肼(hydrazide),采用基质辅助激光解吸电离质谱(matrix assisted laser desorption ionization-mass spectrometry, MALDI-MS)可以检测出比原物质相对分子质量大 14 的酰肼产物,从而有效地确定脱酰胺化位点。此外,稳定的酰肼产物还可以用醛树脂进行富集或者加入具有荧光基团的丹磺酰氯进行选择修饰生成含磺酰基团的产物(sulfonyl hydrazide),再通过含紫外(ultraviolet, UV)检测器(检测波长为 280 nm)或荧光检测器的 HPLC 进行定量分析。肽酰肼类物质具有很高选择性和显著亲和力,富集效果好,此方法的出现使检测复杂的系统 isoAsp 成为可能,实现了对 isoAsp 的有效定位与定量检测。

②Asp-N 可以选择性水解 Asp 而不影响 isoAsp。NI 等<sup>[24]</sup>利用 Asp-N 这一特性,提高 isoAsp 的检测峰度,通过电子捕获/转移质谱法(electron capture dissociation/electron transfer dissociation-MS, ECD/ETD-MS)对 isoAsp 进行精确的检测和定性定量分析。该方法的缺点是:在样品前处理过程中,此酶 Asp-N 活性条件下的 pH 容易引起样品的脱酰胺化的发生,而造成一定假阳性的结果。

③蛋白内切酶(endoprotease Glu-C)。在蛋白质脱酰胺化的分析中,常用 pH 值 8.0 的酶解反应条件,而在此条件下样品容易发生新的脱酰胺化,所测得的脱酰胺水平远高于样品中的实际值<sup>[25]</sup>。为了避免和减少样品前处理过程中发生的这些假阳性现象,LIU 等<sup>[26]</sup>发现,在 pH 值 4.5 条件下, Glu-C 同样可以有效酶解样品,且样品在酶解过程中几乎不发生新的脱酰胺化,从而使测得的脱酰胺水平更接近样品中的真实值。这一发现降低检测大分子蛋白药物中 isoAsp 假阳性现象,能够真实有效地分析样品中 isoAsp 的情况,进一步完善了脱酰胺化的检测方法。

④同位素标记(<sup>18</sup>O)。蛋白质在脱酰胺生成 Asp 与 isoAsp 的过程中不可避免与水(H<sub>2</sub>O)进行反应,因此研究者利用<sup>18</sup>O 对其进行定位检测,并且取得很好的成果<sup>[27]</sup>。LIU 等<sup>[28]</sup>则通过酸碱法在 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 中直接制备含有<sup>18</sup>O 标记的 Asp 和 isoAsp 的标准多肽,进而再结合 HPLC-MS,对脱酰胺化的蛋白进行定量分析。此方法的

优点:可以对蛋白中各种可能存在的脱酰胺化位点进行分析,但该方法为加速破坏过程,意在提供标准化样本,并不能准确反映该蛋白真实的脱酰胺状况。LIU 等<sup>[29]</sup>将 isoAsp 用 PIMT 特异性水解成相应的甲酯,在 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 中水解重新生成<sup>18</sup>O 标记的 isoAsp,使 isoAsp 分子相对分子质量增加 2,从而使其非常清晰地标准质谱上区分出来,实现 isoAsp 的定量定位点检测。

## 2.2 仪器方法

2.2.1 HPLC 法 HPLC 法是蛋白质分离最常用最有效的分析方法,在脱酰胺化中主要用于相应脱氨组分、isoAsp 的定量测定等。

2.2.2 电泳法 蛋白质脱酰胺后会引入负电荷,使其保留时间增加,因此电泳法也被用作脱酰胺化的检测<sup>[30]</sup>。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)是早期采用的检测方法之一<sup>[31]</sup>。随着电泳技术的发展,新的电泳技术也在逐步应用。等电聚焦电泳(isoelectric focusing electrophoresis, IEF)是依据蛋白质分子等电点(isoelectric point, IP)的不同来作分离,其解析度非常好,因此在蛋白质脱酰胺化中也有应用<sup>[32-33]</sup>。上述两种电泳法得到的电泳图可以较直观地反映脱酰胺组分。毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)或高效毛细管电泳(high performance capillary electrophoresis, HPCE)是凝胶电泳技术的发展, HPLC 分析的补充。与普通 SDS-PAGE 比较, CE 具有分辨率高、分离效率快等优点;与 HPLC 比较, CE 分离机制不同,可应用于 HPLC 不易分离的样品。但在某些程度上,其方法复杂,结果重复性差。结合了质谱的 CE 可以对样品进行更全面的分析,可对蛋白质复合物及翻译后修饰产物进行分析。

《中华人民共和国药典》2015 年版三部收录电泳法(通则 0541),其主要用于蛋白质鉴别、相对分子质量及 IP 检测。张莹<sup>[31]</sup>对重组人胰岛素中脱酰胺胰岛素检测方法(PAGE、HPLC、CE)进行介绍。LEWIS 等<sup>[34]</sup>和 SKOTTNE 等<sup>[35]</sup>分别采用 SDS-PAGE 对重组人生长激素不同的脱酰胺产物进行分离。NIELSEN 等<sup>[36]</sup>采用 CE 对生物合成人胰岛素和人生长激素不同脱酰胺产物进行分离,并定量测定。

2.2.3 离子交换色谱法(ion exchange chromatography, IEC) 20 世纪 90 年代初期, IEC 被用于蛋白质脱酰胺的分析<sup>[37]</sup>,但 Asp 与 isoAsp 两者不易分离使其在脱酰胺研究上存在局限性,随着 IEC 与 HPLC 的结合,有了进一步的发展。ZHANG 等<sup>[33]</sup>将单克隆抗体中的多肽片段与 PIMT 进行酶促反应,通过强阳离子交换

(strong cation exchange, SCX)-HPLC 分离各型脱酰胺产物,用 HPLC-UV 测定其 isoAsp 总量。VLASAK 等<sup>[38]</sup>通过离子交换(cation exchange, CEX)-HPLC 分离、结合质谱,鉴定重组人源化单克隆 IgG1 抗体(humanized IgG1 monoclonal antibody, MAb)的轻链互补决定区 1 (complementarity determining region 1, CDR1)中 Asn33 脱酰胺化,用 ISOQUANT Kit 检测其含量。

**2.2.4 质谱法** 质谱法是目前最广泛应用到该领域的准确定位的检测方法。① ECD/ ETD。Asp 与 isoAsp 相对分子质量相同,研究者通过采用 ETD/ECD-MS,发现二者会各自产生一对独特的报告离子: isoAsp(C+57 和 Z-57), Asp(Z-44 和(M + nH)<sup>(n-1)+</sup> - 60),从而区分二者。但是有时报告离子的丰度比较低而不易检测<sup>[39-40]</sup>。② LC-MS。发生脱酰胺反应后,Asn 生成 Asp 和 isoAsp,相对分子质量增加 1000,相对分子质量所发生的变化可利用 MS 精确检测。根据多肽序列标签法结合 MS/MS 确定发生脱酰胺化的氨基酸,从而达到对样品定性的目的。LC-MS 在蛋白质脱酰胺的研究中应用日益广泛。HUANG 等<sup>[41]</sup>利用 LC-MS/MS 分析 MAb 在体内发生的脱酰胺反应,发现重链 CDR2 区的 Asn55 发生了脱酰胺,极大地降低其折叠活性,建立体内快速、灵敏、微量检测蛋白的方法。

③ MALDI-MS。MALDI 所形成的离子多为带单电荷的准分子离子,故质谱图中的离子与多肽和蛋白的相对分子质量存在一一对应关系,可直接准确地测定蛋白质和多肽的相对分子质量,是准确测定生物大分子质量的首选方法。LIU 等<sup>[26]</sup>则通过酸碱法在 H<sub>2</sub><sup>18</sup>O 中直接制备含有<sup>18</sup>O 标记的 Asp 和 isoAsp 的标准多肽,进而再结合 LC/MS,对脱酰胺化的蛋白进行定量分析。该方法优点是能直接对混合物进样分析,且用量体积较少,对样品溶液的纯度要求不高,分析速度快,但其重复性差和稳定性方面存在不足,较少用于定量分析。

**2.2.5 联合应用** 由于 isoAsp 检测的复杂性,为了更好地确认发生脱酰胺化的位点,并且能有效地将 Asp 与 isoAsp 分离,多种检测技术联合应用被人们广泛采用。ZHANG 等<sup>[42]</sup>在对重组人白细胞介素 11 进行脱酰胺化研究时,采用 SDS-PAGE、HPLC 结合胰蛋白酶肽图、CE 结合 Asp-N 肽图以及 LC/MS 四种仪器方法进行分析,对发生脱酰胺化的位点进行准确定位,最后利用 PIMT 采用 SCX-HPLC 检测方法对 isoAsp 的总量进行定量测定。

综上所述,在生物技术药物脱酰胺化检测中,每种方法都有其特点(表 1),因此通常采用几种方法联合应用以达到对 isoAsp 精确定位,准确定量的目的。

表 1 不同方法在脱酰胺化检测中的特点  
Tab.1 Characteristics of various determination methods for deamidation

方法	特点	优点	不足
处理方法			
酶法			
PIMT 法	能特异性地与 isoAsp 结合。①其中 ISOQUANT Kit 是测定 isoAsp 最常见最有效定量检测方法;②在与 PIMT 反应后的产物中,加入强亲核试剂,如胍形成酰胍。	①测定 isoAsp 的总量;②isoAsp 定量、定位点,高选择性、富集效果好,能解决复杂系统,结合 UV-vis。或荧光进行快检。	①无法定位;②胍类试剂有毒
Asp-N 法	选择性水解 Asp 而不影响 isoAsp。	isoAsp 定位、定量分析。	
Glu-C 法	在低 pH 值条件下具有较好的酶解活性,但不利于脱酰胺化的发生。	—	降低 isoAsp 假阳性,保证准确定量。
同位素标记( <sup>18</sup> O)	与 H <sub>2</sub> <sup>18</sup> O 反应,脱酰胺后生成含 <sup>18</sup> O 的产物。	isoAsp 定位、定量分析。	无明显不足
仪器方法			
HPLC 法	最常用的定性定量检测手段。	定量首选;不需酶解直接测定肽链较短的多肽;isoAsp 的总量。	不能定位。
电泳法	利用所带电荷的差异及分子大小的不同所产生的不同迁移率将蛋白质分离。	PAGE 操作简单、速度快;PAGE、IEF 定性直观;CE 分离较好。	不易分离、不能定量。

续表 1 不同方法在脱酰胺化检测中的特点

Tab.1 Characteristics of various determination methods for deamidation

方法	特点	优点	不足
仪器方法			
IEC 法	早期采用。	结合 HPLC 用于定位定量。	不易分离。
MS 法			
ECD/ETD-MS 法	获得不同的片段 C+57 和 Z-57。	定位。	不易分离。
LC-MS 法	发生脱酰胺反应后相对分子质量增加 1000。	定位首选,可定量分析。	无明显不足
MALDI-MS 法	准确测定不经过破坏完整的生物大分子质量。	定位,分析速度快。	不能定量。

### 3 前景与展望

目前,我国生物技术药品中涉及脱酰胺产物的检测项目较少,且未对生物技术药品中的 isoAsp 含量进行检测作任何要求,相关定性定量检测方法几乎处于空白。开展建立高效、准确测定生物技术药物中脱酰胺产物,特别是 isoAsp 的含量方法,使生物技术药物质量标准与国际接轨,可以对生产及市场流通的生物技术药物的质量起到监管的作用,从而更好地保障广大人民的生命健康和用药安全。脱酰胺化检测技术不断发展,如何将这些检测方法更加合理地应用到生物技术药物的实际检测中去,建立高效、准确的质量标准是值得思考的课题。

#### 参考文献

- [1] 饶春明.我国重组药物质量控制技术体系的建立和应用研究[J].中国药学杂志,2016,51(13):1057-1066.
- [2] 饶春明,王军志.2015 年版《中华人民共和国药典》生物技术药质量控制相关内容介绍[J].中国药学杂志,2015,50(20):1776-1781.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(三部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:37-40.
- [4] 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):906-911.
- [5] 徐军,吴萌,龚庆伟,等.重组人胰岛素注射液中 B3 和 B3iso 脱氨人胰岛素的分析与鉴定[J].分析测试学报,2015,34(10):1173-1178.
- [6] 毕华,韩春梅,丁有学,等.重组人血管内皮生长因子抑制剂中异天门冬氨酸含量检测[J].药物分析杂志,2015,35(5):879-883.
- [7] ROBINSON N E,ROBINSON A B. Prediction of primary structure deamidation rates of asparaginyl and glutaminyl peptides through steric and catalytic effects[J].J Pept Res, 2004,63(5):437-448.
- [8] JOSHI A B,KIRSCH L E.The relative rates of glutamine and asparagine deamidation in glucagon fragment 22-29

under acidic conditions [J].J Pharm Sci, 2002, 91(11): 2331-2345.

- [9] BISCHOFF R,KOLBE H V.Deamidation of asparagine and glutamine residues in proteins and peptides: structural determinants and analytical methodology[J].J Chromatogr B Biomed Appl, 1994, 662(2):261-278.
- [10] CLARKE S.Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins[J].Int J Pept Protein Res, 1987, 30(6):808-821.
- [11] LIU D T.Deamidation: a source of microheterogeneity in pharmaceutical proteins [J]. Trends Biotechnol, 1992, 10(10):364-369.
- [12] REISSNER K J,ASWAD D W.Deamidation and isoaspartate formation in proteins: unwanted alterations or surreptitious signals? [J].Cell Mol Life Sci, 2003, 60(7): 1281-1295.
- [13] NOGUCHI S,SATOW Y,UCHIDA T, et al.Crystal structure of Ustilago sphaerogena ribonuclease U2 at 1.8 Å resolution [J].Biochemistry, 1995, 34(47)15583-15591.
- [14] NOGUCHI S,MIYAWAKI K,SATOW Y. Succinimide and isoaspartate residues in the crystal structures of hen egg-white lysozyme complexed with tri-N-acetylchitotriose [J].J Mol Biol, 1998, 278(1):231-238.
- [15] ASWAD D W,PARANANDI M V,SCHUTER B T.Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis[J].J Pharm Biomed Anal, 2000, 21(6): 1129-1136.
- [16] HSU Y R,CHANG W C,MENDIAZ E A, et al. Selective deamidation of recombinant human stem cell factor during in vitro aging: isolation and characterization of the aspartyl and isoaspartyl homodimers and heterodimers[J].Biochemistry, 1998, 37(8):2251-2262.
- [17] CACIA J,KECK R,PRESTA L G, et al.Isomerization of an aspartic acid residue in the complementarity-determining regions of a recombinant antibody to human IgE: identification and effect on binding affinity [J].

- Biochemistry, 1996, 35(6):1897-1903.
- [18] JOHNSON B A, SHIROKAWA J M, HANCOCK W S, et al. Formation of isoaspartate at two distinct sites during *in vitro* aging of human growth hormone[J]. J Biol Chem, 1989, 264(24):14262-14271.
- [19] MAMULA M J, GEE R J, ELLIOTT J I, et al. Isoaspartyl post-translational modification triggers autoimmune responses to self-proteins[J]. J Biol Chem, 1999, 274(32):22321-22327.
- [20] KIM E, LOWENSON J D, MACLAREN D C, et al. Deficiency of a protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth, and fatal seizures in mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(12):6132-6137.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:787-791.
- [22] ASWAD D W. Deamidation and isoaspartate formation in peptides and proteins[M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994.
- [23] ALFARO J F, GILLIES L A, SUN H G, et al. Chemo-enzymatic detection of protein isoaspartate using protein isoaspartate methyltransferase and hydrazine trapping[J]. Anal Chem, 2008, 80(10):3882-3889.
- [24] NI W Q, DAI S J, KARGER B L, ZHOU Z S. Analysis of isoaspartic acid by selective proteolysis with Asp-N and electron transfer dissociation mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2010, 82(17):7485-7491.
- [25] KROKHIN O V, ANTONOVICI M, ENS W, et al. Deamidation of -Asn-Gly- sequences during sample preparation for proteomics: consequences for MALDI and HPLC-MALDI analysis[J]. Anal Chem, 2006, 78(18):6645-6650.
- [26] LIU S, MOULTON K R, AUCLAIR J R, et al. Mildly acidic conditions eliminate deamidation artifact during proteolysis: digestion with endoprotease Glu-C at pH 4.5[J]. Amino Acids, 2016, 48(4):1059-1067.
- [27] TERASHIMA I, KOGA A, NAGAI H. Identification of deamidation and isomerization sites on pharmaceutical recombinant antibody using H<sub>2</sub><sup>18</sup>O[J]. Anal Biochem, 2007, 368(1):49-60.
- [28] WANG S H, KALTASHOV I A. An <sup>18</sup>O-labeling assisted LC/MS method for assignment of aspartyl/isoaspartyl products from Asn deamidation and Asp isomerization in proteins[J]. Anal Chem, 2013, 85(13):6446-6452.
- [29] LIU M, CHEETHAM J, CAUCHON N, et al. Protein isoaspartate methyltransferase-mediated <sup>18</sup>O-labeling of isoaspartic acid for mass spectrometry analysis[J]. Anal Chem, 2012, 84(2):1056-1062.
- [30] GENNARO L A, SALAL-SOLANO O. Characterization of deamidated peptide variants by micro-preparative capillary electrophoresis and mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(20):4499-4503.
- [31] 张莹. 重组人胰岛素中的脱酰胺胰岛素的检验[J]. 天津药学, 2001, 13(5):14-15.
- [32] HSU Y R, CHANG W C, MENDIAZ E A, et al. Selective deamidation of recombinant human stem cell factor during *in vitro* aging: isolation and characterization of the aspartyl and isoaspartyl homodimers and heterodimers[J]. Biochemistry, 1998, 37(8):2251-2262.
- [33] ZHANG W, CZUPRYN J M. Analysis of isoaspartate in a recombinant monoclonal antibody and its charge isoforms[J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 30(5):1479-1490.
- [34] LEWIS U J, SINGH R N, BONEWALD L F, et al. Altered proteolytic cleavage of human growth hormone as a result of deamidation[J]. J Biol Chem, 1981, 256(22):11645-11650.
- [35] SKOTTNER A, FORSMAN A, SKOOG B, et al. Biological characterization of charge isomers of human growth hormone[J]. Acta Endocrinol (Copenh), 1988, 118(1):14-21.
- [36] NIELSEN R G, SITTAMPALAM G S, RICKARD E C. Capillary zone electrophoresis of insulin and growth hormone[J]. Anal Biochem, 1989, 177(1):20-26.
- [37] CACIA J, QUAN C P, VASSER M, et al. Protein sorting by high-performance liquid chromatography. I. Biomimetic interaction chromatography of recombinant human deoxyribonuclease I on polyionic stationary phases[J]. J Chromatogr, 1993, 634(2):229-239.
- [38] VLASAK J, BUSSAT M C, WANG S, et al. Identification and characterization of asparagine deamidation in the light chain CDR1 of a humanized IgG1 antibody[J]. Anal Biochem, 2009, 392(2):145-154.
- [39] O'CONNOR P B, COURNOYER J J, PITTEI S J, et al. Differentiation of aspartic and isoaspartic acids using electron transfer dissociation[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2006, 17(1):15-19.
- [40] COURNOYER J J, LIN C, BOWMAN M J, et al. Quantitating the relative abundance of isoaspartyl residues in deamidated proteins by electron capture dissociation[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2007, 18(1):48-56.
- [41] HUANG L H, LU J, WROBLEWSKI V J, et al. *In vivo* deamidation characterization of monoclonal Antibody by LC/MS/MS[J]. Anal Chem, 2005, 77(5):1432-1439.
- [42] ZHANG W, CZUPRYN J M, BOYLE P T JR, et al. Characterization of asparagine deamidation and aspartate isomerization in recombinant human interleukin-11[J]. Pharm Res, 2002, 19(8):1223-1231.