

## Focusing Review

## 抗体医薬品の糖鎖解析について

八木有紀<sup>1</sup>・鈴木茂生<sup>2</sup>

## Characterization of Oligosaccharides in Therapeutic Antibodies

Yuki Yagi<sup>1</sup>, Shigeo Suzuki<sup>2</sup><sup>1</sup>Bio Process Research and Development Laboratories, Kyowa Hakko Kirin

100-1 Hagiwara, Takasaki, Gunma 370-0013, Japan

<sup>2</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University

3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 577-8502, Japan

**Abstract**

Oligosaccharides in therapeutic antibodies play pivotal roles including pharmacological effects such as antibody-dependent cellular and complement-dependent cytotoxicity, pharmacokinetics and safety. Acquisition of the total information on the glycans including the contents of component monosaccharides, oligosaccharide structure, oligosaccharide pattern, and glycan-linked sites and their occupancy about therapeutic antibody is essential for the development of new drug. This review presents a short overview about the trends glycosylation analysis, and describes about the quality control in the development and manufacturing process of therapeutic antibodies.

**Keywords:** Oligosaccharide, Therapeutic antibody, Characterization, Quality control

**1. はじめに**

抗体はY字型をした免疫グロブリンという糖タンパク質分子であり (Figure 1)、特定の分子を抗原として認識して結合する。生体内において抗体は細菌、ウイルス、その他微生物等の感染や増殖を防ぐ役割を果たしている。抗体医薬品は、特定の抗原への結合や、それに続く免疫機構を介した異物の除去という抗体の性質を利用した、いわゆるバイオ医薬品である。抗体医薬品は2012年末までに国内で23品目が承認されており[1]、国内海外を問わず製薬各社のパイプラインには多くの抗体医薬品候補が並んでいる。

抗体 (IgG) には重鎖のFc部分のAsn残基 (297残基目)

にN-結合型糖鎖を有しており、この糖鎖は抗体分子としての活性や動態、安全性等に寄与することが報告されている[2,3]。また、Asn<sup>297</sup>以外のアミノ酸残基にN-結合型糖鎖やO-結合型糖鎖が結合する場合もある[4-7]。

Asn<sup>297</sup>のN-結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 残基に付加しているFuc残基 (コアフコース) を除去すると抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性が増強される[8,9]。また、同N-結合型糖鎖のバイセクティング GlcNAc 残基の付加量を増加させることにより、ADCC活性が増強されることが報告されている[10,11]。一方、ADCC活性と並ぶエフェクター活性である補体依存性障害 (CDC)

<sup>1</sup>協和発酵キリン株式会社バイオ生産技術研究所  
〒370-0013 群馬県高崎市萩原町100-1

**Tel:** 027-353-7452

**Fax:** 027-352-4977

**E-mail:** yuuki.yagi@kyowa-kirin.co.jp

<sup>2</sup>近畿大学薬学部

〒577-8502 大阪府東大阪市小若江3-4-1

活性については、Fc 部分に結合する糖鎖の非還元末端部分のガラクトース (Gal) 残基の付加が影響するとされており、Gal 残基の数が多いほど補体第一成分 (C1q) への結合が増し、結果として CDC 活性が増強される[12] (Figure 2)。

動態については、ハイマンノース型の N-結合型糖鎖を有する抗体は、血中のマクロファージ等の表面に存在するマンノースレセプターに結合することで血中からのクリアランスが速くなるとの報告[13]がある一方、クリアランスには影響しないとの報告[14]もあり、クリアランスへの影響は抗体毎に異なる可能性がある。また、相補性決定領域 (CDR) に結合した糖鎖はクリアランスに影響を与えたとの報告がある[15]。

抗体の糖鎖に免疫原性を有する糖残基が付加することも知られており、マウスミエローマ細胞 (SP2/0 細胞や NS0 細胞等) で産生される抗体医薬品に N-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) や Gal $\alpha$ 1-3Gal 等の非ヒト型の糖残基が付加する場合がある[16,17]。非ヒト型の糖残基は生体内で免疫反応を引き起こす可能性があり、特段の注意が必要である。実際に、SP2/0 細胞で製造された抗悪性腫瘍剤である Cetuximab は、Fab 部分に結合している N-結合型糖鎖の一部に Gal $\alpha$ 1-

3Gal を有しており、これが一部の患者でアナフィラキシー様症状を引き起こすことが報告された[18]。抗体医薬品の合理的な開発の推進と審査の効率化を図ることを目的に平成24年に厚生労働省より発出された「抗体医薬品の品質評価のためのガイダンス」[19]においては、

- ①宿主細胞の選択にあたっては抗体の非ヒト型糖鎖の付加に関する知見を考慮することが必要な場合もある、
- ②非ヒト型糖鎖を持つ糖鎖が結合している場合は、その割合を明らかにするとともに、安全性への影響を考慮するべき、
- ③Gal $\alpha$ 1-3Gal を持つことが明らかな場合には、製造における含量の恒常性が十分に担保されない限り、その存在量の規格設定が必要である、

と数か所にわたって記載されており、非ヒト型糖鎖による免疫原性を重要視した内容となっている。

以上示したように、抗体医薬品の糖鎖は活性や動態、安全性に大きく関係するため、詳細な構造解析が必要である。また、宿主細胞種や培養条件が糖鎖プロファイルや免疫原性を有する糖鎖の発現に影響することもあるため[20-22]、抗体医薬品の開発初期から糖鎖構造について留意する必要がある。

## 2. 糖鎖解析について

抗体医薬品の糖鎖に関する特性解析としては、①糖含量、②糖鎖構造、③糖鎖パターン、④糖鎖結合位置、等の情報が求められている[23]。以降は抗体医薬品の N-結合型糖鎖の特性解析について解説する。

### 2.1. 糖含量

糖含量は抗体に結合する全糖鎖を単糖レベルに分解し、各単糖につき定量を行う。酸やグリコシダーゼを使用して、各単糖を遊離し、非標識もしくは蛍光物質等で標識したものについて測定を行う。各糖の分離は液体クロマトグラフィー (HPLC)、キャピラリー電気泳動 (CE)、ガスクロマトグラフィー等が適用可能であると考えられる[24-29]。抗体医薬

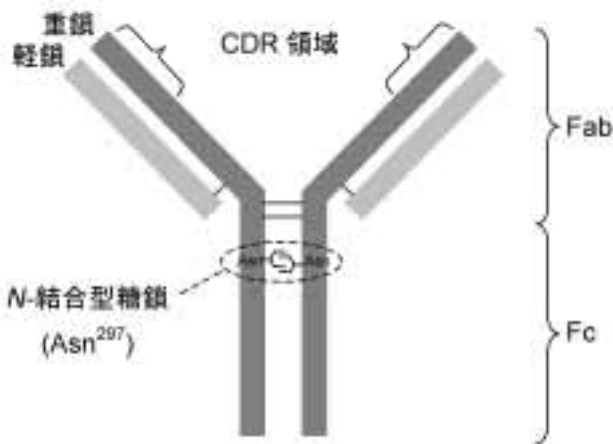


Figure 1. 抗体の構造

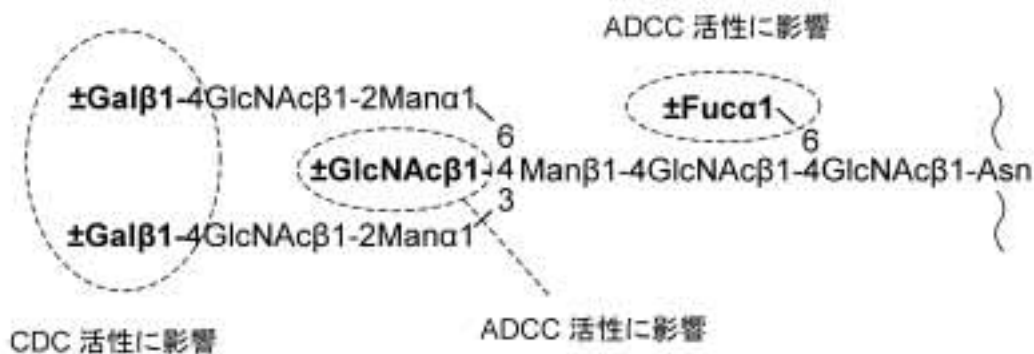


Figure 2. 抗体の N-結合型糖鎖構造と活性への関与

品では、*N*-アセチルガラクトサミンが含まれていないことを示すことで、*O*-結合型糖鎖が結合していないことを証明しているケースが多い[30]。

2.2. 糖鎖構造

糖鎖構造については、*N*-グリコシダーゼ F (PNGase F) やヒドラジン等を用いて遊離させた糖鎖を直接または還元末端を標識し、HPLC で分離し、各ピーク成分を質量分析装置 (MS) 等を用いて構造解析する。別の手段としては、リシルエンドペプチダーゼ (Lys-C) 等のプロテアーゼで糖ペプチド断片としたものを MS 等で解析するのが一般的であると考えられる。HPLC での分離は逆相、順相、イオン交換及び親水性相互作用クロマトグラフィー等が適していると思われるが[31-36]、逆相 HPLC はシアル酸等を結合する酸性糖鎖のピーク形状がブロードとなる上、G1 と G1'等の異性体の分離が困難、もしくは不十分である。順相 HPLC は G1 と Man5、G2 と Man6 のピークが重なる、イオン交換 HPLC はカラムからの溶出液が塩を含むので直接 MS へ接続ができない。したがって、それぞれの分離法の特徴を見極め、目的に合わせて適切な分離モードを選択もしくは複数の分離モードを組み合わせる必要がある。MS による各糖鎖の構造同定については、MS 測定では Man 残基と Gal 残基の識別や結合位置及び結合様式の設定が不可能である (Table 1 に示した各組の糖鎖は質量が同一となるため識別が不可能) ことから、必要に応じてガラクトシダーゼやマンノシダーゼ、フコシダーゼ等の特異的酵素による消化を組み合わせた同定を実施するべきである。また、Fc 領域の Asn<sup>297</sup>以外のアミノ酸に糖鎖が結合する場合もあるが、その場合は Fc 領域の糖鎖とは構造が大きく異なり、複雑な糖鎖が結合する可能性もある [37]。また Asn<sup>297</sup>に Neu5Gc や Galα1-3Gal 等の免疫原性を有する糖残基が結合している場合は免疫反応を誘発する可能性は高くないようであるが、Asn<sup>297</sup>以外に結合した糖鎖は免疫反応を誘発する可能性がある [38,39]。従って Asn<sup>297</sup>以外に糖鎖が結合した抗体を開発するときには、糖鎖構造の解析及び管理がきわめて重要になる。

免疫原性を有する糖鎖構造は上記の詳細な構造解析を通して明らかになるが、開発初期の段階で細胞種の選択や培養条

件の至適化を行う際に、併せてこれらの糖鎖情報を収集する必要がある。筆者らは、アフィニティーキャピラリー電気泳動を用いて、これらを簡便に検出できる方法を開発した [40]。抗体医薬品に PNGaseF を作用させて糖鎖を遊離させ、還元末端を 8-amino-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid (APTS) で標識したものを、あらかじめ抗 Neu5Gc 抗体又は α ガラクトシダーゼを注入したキャピラリー管に注入し電圧を印加して分離を行うと、Neu5Gc 又は Galα1-3Gal を有する糖鎖のピークのみが選択的に消失することから、これらの免疫原性を有する糖鎖の存在が簡単に確認できる。マウスミエローマ細胞である NS0 細胞で製造された Palivizumab では Neu5Gc、Galα1-3Gal 共に検出されたが、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で製造された Rituximab ではいずれの糖鎖も検出されなかった。Figure 3 に、Palivizumab 中の Galα1-3Gal を有する糖鎖 (x、y 及び z) を α ガラクトシダーゼを用いて検出した結果を示す。

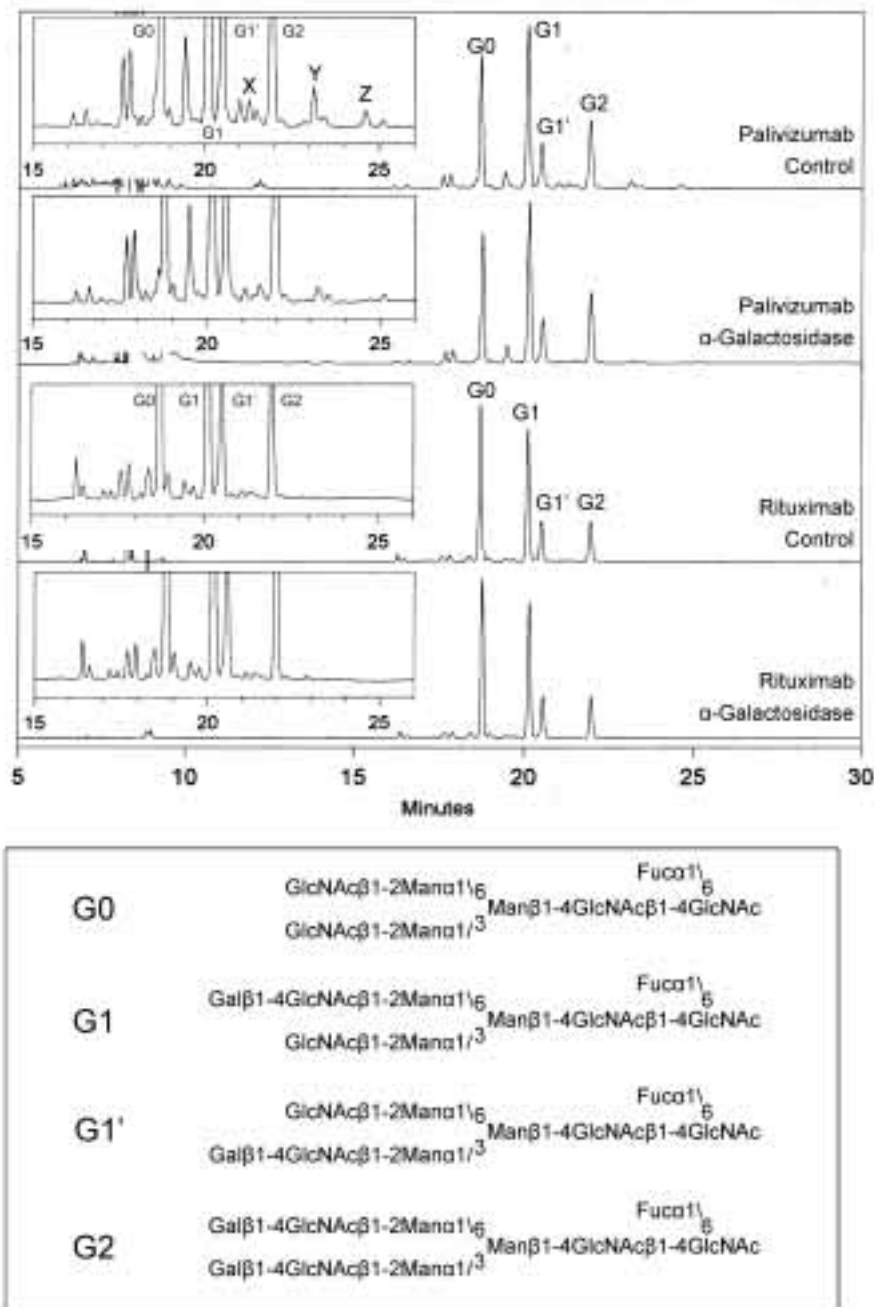
一方、糖鎖の有無や構造が活性と相関せず、糖鎖プロファイル分析法について規格試験としての設定を避けたい場合は、上記の構造解析に加え、糖鎖除去前後や糖鎖ヘテロ体組成比率の異なるロットでの活性比較や毒性評価等、有効性及び安全性との相関が無いこと及びロット間の糖鎖プロファイルの恒常性を評価しておく必要がある。

2.3. 糖鎖パターン

製造ロットごとの各ピーク割合 (糖鎖パターン) を明らかにして、その恒常性を評価する目的で HPLC、CE 及び MS が主に使用されている。また、糖鎖パターンを規格試験として設定する場合は、パターンの同等性や各ピークの割合について、非臨床試験や臨床試験での投与実績及び製造プロセスにおいての実績値や分析での振幅等に基づいて判定基準を設ける必要がある。前述の通り、非還元末端の β-結合 Gal 残基、バイセクティング GlcNAc やコア Fuc は薬理活性に、Neu5Gc や Galα1-3Gal の存在は免疫原性に関与することから、各医薬品の特性に応じて、これらの割合をきちんと管理することを考える必要がある。また、Asn<sup>297</sup>以外のアミノ酸に糖鎖が結合している場合には、糖鎖結合部位ごとに糖鎖パターンを評価する必要がある。結合部位ごとの糖鎖パターン

Table 1. 抗体医薬品で発現する可能性のある同一質量の *N*-結合型糖鎖の例

$\begin{matrix} \text{Man}\alpha 1\backslash_6 & \pm \text{Fuc}\alpha 1\backslash_6 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1/3 & \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{matrix}$	=	$\begin{matrix} \text{Man}\alpha 1-6/3\text{Man}\alpha 1\backslash_6 & \pm \text{Fuc}\alpha 1\backslash_6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1/3 & \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{matrix}$
$\begin{matrix} \text{Man}\alpha 1-6/3\text{Man}\alpha 1\backslash_6 & \pm \text{Fuc}\alpha 1\backslash_6 \\ \text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1/3 & \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{matrix}$	=	$\begin{matrix} \text{Man}\alpha 1\backslash_6 & \pm \text{Fuc}\alpha 1\backslash_6 \\ \text{Man}\alpha 1/3 & \text{Man}\alpha 1\backslash_6 \\ \text{GlcNAc}\beta 1-2\text{Man}\alpha 1/3 & \text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc} \end{matrix}$



**Figure 3.** アフィニティーキャピラリー電気泳動を用いた抗体医薬品中の Galα1-3Gal の検出。Palivizumab のピーク X、Y、Z (最上段) が α-Galactosidase を導入した結果 (2 段目)、消失した。

評価は、プロテアーゼ消化後のペプチドマップから明らかにする。すなわち、HPLC で各糖ペプチド断片を分離し、直接 MS によるパターン評価や、各糖ペプチドのフラクションを回収した後に前述の方法で糖鎖パターンの評価を行う。

#### 2.4. 糖鎖結合位置

糖鎖結合位置については、cDNA 配列やアミノ酸配列上の Asn-X-Ser/Thr 配列からの推定ではなく、直接的な糖鎖結合アミノ酸の同定が必要である。プロテアーゼ消化により抗体

をペプチド断片とした後、糖鎖が結合した断片につき、タンデム質量分析 (MS/MS) やプロテインシーケンサによる糖鎖結合位置の同定を行う。MS/MS を用いて糖鎖結合位置を決定するには、Endo-H 等のグリコシダーゼにより、還元末端側の GlcNAc を 1 残基残したペプチド断片を調製し、ETD (電子移動解離) や ECD (電子捕獲解離) 等のフラグメント化法を用いて GlcNAc が結合したアミノ酸を決定する方法や、<sup>18</sup>O 標識水存在下での N-グリコシダーゼ消化により、糖鎖が結合していたアミノ酸残基に<sup>18</sup>O を導入して、それを

検出する方法などがある[41]。なお、Asn<sup>297</sup>以外に糖鎖が結合している場合、Asn-X-Ser/Thr 配列ではない部分にN-結合型糖鎖が結合した抗体も確認されていることから[4,5]、糖鎖結合位置の同定は慎重に行う必要がある。

糖鎖構造の解析に加えて、糖鎖の結合率も調査する必要がある。Asn<sup>297</sup>の糖鎖が欠損すると活性の低下・消失や熱安定性の低下、重合体の増加などを引き起こす例があり[42-49]、また、Asn<sup>297</sup>以外の糖鎖についても活性や動態に関わる場合もある[15,50]。糖鎖の結合率の評価にはSDS-PAGEやキャピラリー SDS ゲル電気泳動(CE-SDS)が用いられている。

### 3. まとめ

抗体医薬品の糖鎖はエリスロポエチン等の糖鎖と比較すると、単純なように見えるが、様々な形で有効性及び安全性に直接関与しているため、医薬品の生産細胞、培養方法、作用機序、投与方法、投与量等様々なファクターを考慮した上で、特性解析を実施する必要がある。この特性解析には糖含量、糖鎖構造、糖鎖パターン、糖鎖結合位置、糖鎖結合率等の情報を含める必要がある。

糖鎖構造の結合位置・結合様式の同定については、データの取得に長い時間を要する。現在、MS/MSフラグメントとデータベースの照合による同定法等が開発されているが、そのデータベースは広く認知されておらず、また科学的な妥当性の説明が困難であるため、現時点では医薬品の申請に採用するのは難しいのではないかと考えられる。しかし、将来的にはMS/MSフラグメント解析により、結合位置・結合様式の正確な情報が簡便かつ短時間に得られるような技術及び情報が確立されることを期待したい。

### 文献

- [1] 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部 HP:  
[http://www.nih.go.jp/dbcb/approved\\_biologics.html](http://www.nih.go.jp/dbcb/approved_biologics.html)
- [2] Eon-Duval, A.; Broly, H.; Gleixner, R. *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 608-622.
- [3] Sanglier-Cianféron, S. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 715-736.
- [4] Wallace, A.; Yan, B.; Reddy, P.; Treuheit, M. J.; Bolland, A. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 32493-32506.
- [5] Valliere-Douglass, J. F.; Eakin, C. M.; Wallace, A.; Ketchum, R. R.; Wang, W.; Treuheit, M. J.; Bolland, A. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16012-16022.
- [6] Valliere-Douglass, J. F.; Brady, L. J.; Farnsworth, C.; Pace, D.; Bolland, A.; Wallace, A.; Wang, W.; Treuheit, M. J.; Yan, B. *Glycobiology* **2009**, *19*, 144-152.
- [7] Tanaka, M.; Koga, A.; Kobe, A.; Sekimori, Y.; Aso, Y.; Terada, K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *83*, 123-130.
- [8] Weikert, S. H.; Presta, L. G. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26733-26740.
- [9] Satoh, M.; Iida, S.; Shitara, K. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2006**, *6*, 1161-1173.
- [10] Davies, J.; Jiang, L.; Pan, L. Z.; LaBarre, M. J.; Anderson, D.; Reff, M. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 288-294.
- [11] Ferrara, C.; Brünker, P.; Suter, T.; Moser, S.; Püntener, U.; Umaña, P. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *93*, 851-861.
- [12] Hodoniczky, J.; Zheng, Y. Z.; James, D. C. *Biotechnol. Prog.* **2005**, *21*, 1644-1652.
- [13] Wright, A.; Sato, Y.; Okada, T.; Chang, K.; Endo, T.; Morrison, S. *Glycobiology* **2000**, *10*, 1347-1355.
- [14] Millward, T. A.; Heitzmann, M.; Bill, K.; Längle, U.; Schumacher, P.; Forrer, K. *Biologicals* **2008**, *36*, 41-47.
- [15] Coloma, M. J.; Trinh, R. K.; Martinez, A. R.; Morrison, S. L. *J. Immunol.* **1999**, *162*, 2162-2170.
- [16] Sheeley, D. M.; Merrill, B. M.; Taylor, L. C. *Anal. Biochem.* **1997**, *247*, 102-110.
- [17] Yoo, E. M.; Chintalacheruvu, K. R.; Penichet, M. L.; Morrison, S. L. *J. Immunol. Methods* **2002**, *261*, 1-20.
- [18] Chung, C. H.; Mirakhor, B.; Chan, E.; Le, Q. T.; Berlin, J.; Morse, M.; Murphy, B. A.; Satinover, S. M.; Hosen, J.; Mauro, D.; Slebos, R. J.; Zhou, Q.; Gold, D.; Hatley, T.; Hicklin, D. J.; Platts-Mills, T. A. *N. Engl. J. Med.* **2008**, *358*, 1109-1117.
- [19] 薬食審1214第1号厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知。抗体医薬品の品質評価のためのガイダンスについて(平成24年12月14日)。
- [20] Jenkins, N.; Parekh, R. B.; James, D. C. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 975-981.
- [21] Butler, M. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *68*, 283-291.
- [22] Borys, M. C.; Dalal, N. G.; Abu-Absi, N. R.; Khattak, S. F.; Jing, Y.; Xing, Z.; Li, Z. *J. Bioeng.* **2010**, *105*, 1048-1057.
- [23] 医薬審発第571号厚生労働省医薬局審査管理課長通知。生物薬品(バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品)の規格及び試験方法の設定について(平成13年5月1日)。
- [24] Harazono, A.; Kobayashi, T.; Kawasaki, N.; Itoh, S.; Tada, M.; Hashii, N.; Ishii, A.; Arato, T.; Yanagihara, S.; Yagi, Y.; Koga, A.; Tsuda, Y.; Kimura, M.; Sakita, M.; Kitamura, S.; Yamaguchi, H.; Mimura, H.; Murata, Y.; Hamazume, Y.; Sato, T.; Natsuka, S.; Kakehi, K.; Kinoshita, M.; Watanabe, S.; Yamaguchi, T. *Biologicals* **2011**, *39*, 171-180.
- [25] Anuumula, K. R. *Anal. Biochem.* **1994**, *220*, 275-283.
- [26] Hara, S.; Takemori, Y.; Yamaguchi, M.; Nakamura, M.; Ohkura, Y. *Anal. Biochem.* **1987**, *164*, 138-145.
- [27] Chen, FT.; Evangelista, R. A. *Anal. Biochem.* **1995**, *230*, 273-280.
- [28] Guttman, A. *J. Chromatogr. A* **1997**, *763*, 271-277.
- [29] Jansen, G.; Muskiet, F. A.; Schierbeek, H.; Berger, R.; van der Slik, W. *Clin. Chim. Acta.* **1986**, *157*, 277-293.

- [30] 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 HP 医療用医薬品の承認審査情報.  
[http://www.info.pmda.go.jp/info/syouinin\\_index.html](http://www.info.pmda.go.jp/info/syouinin_index.html)
- [31] Uçaktürk, E. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 341–350.
- [32] Chen, X.; Flynn, G. C. *Anal. Biochem.* **2007**, *370*, 147–161.
- [33] Prater, B. D.; Connelly, H. M.; Qin, Q.; Cockrill, S. L. *Anal. Biochem.* **2009**, *385*, 69–79.
- [34] Sinha, S.; Pipes, G.; Topp, E. M.; Bondarenko, P. V.; Treuheit, M. J.; Gadgil, H. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1643–1654.
- [35] Grey, C.; Edebrink, P.; Krook, M.; Jacobsson, S. P. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1827–1832.
- [36] Rupprechter, A.; Lindner, W.; Premstaller, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 905–914.
- [37] Janin-Bussat, M. C.; Tonini, L.; Huillet, C.; Colas, O.; Klinguer-Hamour, C.; Corvaia, N.; Beck, A. *Methods Mol. Biol.* **2013**, *988*, 93–113.
- [38] Dalziel, M.; McFarlane, I.; Axford, J. S. *Glycoconj. J.* **1999**, *16*, 801–807.
- [39] Lammerts van Bueren, J. J.; Rispens, T.; Verploegen, S.; van der Palen-Merkus, T.; Stapel, S.; Workman, L. J.; James, H.; van Berkel, P. H.; van de Winkel, J. G.; Platts-Mills, T. A.; Parren, P. W. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 574–576.
- [40] Yagi, Y.; Kakehi, K.; Hayakawa, T.; Ohyama, Y.; Suzuki, S. *Anal. Biochem.* **2012**, *431*, 120–126.
- [41] Pasing, Y.; Sickmann, A.; Lewandrowski, U. *Biol. Chem.* **2012**, *393*, 249–258.
- [42] Tao, M. H.; Morrison, S. L. *J. Immunol.* **1989**, *143*, 2595–2601.
- [43] Jefferis, R. *Trends Pharmacol. Sci.* **2009**, *30*, 356–362.
- [44] Lund, J.; Takahashi, N.; Pound, J. D.; Goodall, M.; Jefferis, R. *J. Immunol.* **1996**, *157*, 4963–4969.
- [45] Mimura, Y.; Church, S.; Ghirlando, R.; Ashton, P. R.; Dong, S.; Goodall, M.; Lund, J.; Jefferis, R. *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 697–706.
- [46] Liu, H.; Bulseco, G. G.; Sun, J. *Immunol. Lett.* **2006**, *106*, 144–153.
- [47] Hristodorov, D.; Fischer, R.; Joerissen, H.; Müller-Tiemann, B.; Apeler, H.; Linden, L. *Mol. Biotechnol.* **2013**, *53*, 326–335.
- [48] Kayser, V.; Chennamsetty, N.; Voynov, V.; Forrer, K.; Helk, B.; Trout, B. *L. Biotechnol. J.* **2011**, *6*, 38–44.
- [49] Zheng, K.; Bantog, C.; Bayer, R. *MAbs.* **2011**, *3*, 568–76.
- [50] Wright, A.; Tao, M.H.; Kabat, E. A.; Morrison, S. L. *EMBO J.* **1991**, *10*, 2717–2723.