重组蛋白表征

基础导论

The Measure of Confidence

Agilent Technologies

目录

1 重组蛋白介绍

过去，大多数药物都是化学合成的小分子。如今，随着越来越多的小分子药物专利过期以及来自非专利仿制药物的强大竞争，再加上生物药物的靶向治疗优势日益凸显，生物药物逐渐占据了重要的市场份额，并显现出巨大的增长潜力。生物药物可以是 RNA（如 microRNA）、寡聚核苷酸、多肽或者疫苗，他们基本上都是重组蛋白。凭借细胞特异的作用方式和相对低的化合物特异毒性，这类药物取得了巨大的成功。蛋白治疗药物的发现和开发正在快速增长，不久将会赶上甚至超过化学药物。例如，已有 30 多种单克隆抗体被批准用于疾病治疗，而且每个大型制药公司都已经制定了重大的蛋白药物研发项目。

重组蛋白治疗药物的生产

小分子药物一般通过化学合成得到，而且其结构非常清楚，但是治疗用蛋白质药物的生产和表征都很困难。这些蛋白质可以从各种来源中分离得到，如人体、动物或者微生物，但是大多数情况下是通过生物技术手段，采用重组 DNA 技术进行生产。通常目标重组蛋白通过细胞培养（真核细胞或细菌）得到，这些细胞能以非常高的密度生长并产生大量预期的生物药物。随后必须对细胞基质进行提纯以获得产品，这远比小分子药物的纯化过程复杂得多。最后，和小分子药物类似，需要将提纯的蛋白质制成稳定的剂型以适合最终应用。

从药物发现到药物开发

重组蛋白药物的开发首先需要确立相关的疾病通路，以用于先导候选药物的识别。重组蛋白通过重组 DNA (rDNA) 得到，这些重组 DNA 由至少两个自然界中不常见的 DNA 序列组成。随后对这些 rDNA 文库和所生成的蛋白质进行筛选，寻找适合上述疾病通路的阻断剂、替代治疗剂或其他抗病剂。

一种用于重组蛋白筛选的技术是噬菌体展示。将包含 rDNA 的噬菌体和分离的或固定化的疾病通路蛋白质靶标一起导入微孔板中，然后对噬菌体产生和分泌的重组蛋白与靶标蛋白之间的相互作用进行测定。一旦候选重组蛋白被选定，即将其对应的 rDNA 片段插入质粒，在原核或真核细胞中进行克隆。随后对克隆细胞进行小规模发酵，并建立适当的纯化方案进行重组蛋白提纯，以进行基于离体和在体模型的药物安全性和有效性测试。多种方法和特殊技术可用于这些重组蛋白先导物的鉴定、分离和表征。当一种重组蛋白完成鉴定、验证过程并被选择用于药物开发之后，即可按照法规要求进行生产。

蛋白治疗药物的表征

重组蛋白药物开发阶段的重点是生物实体的生产和纯化。必须建立具有成本效益的规模化细胞培养或发酵流程以及生物药物的纯化工艺。在重组蛋白生产中，产品的最终结构很大程度上取决于在发酵中发生的翻译后修饰以及生产工艺相关的其他修饰。必须对这些修饰进行鉴别和控制。对于杂质，尤其是那些可能诱导发热反应或免疫反应的化合物必须进行鉴定、表征并尽可能减少其在最终产品中的含量。为了减少氧化和水解等化学变化导致的药物降解，延长药效持续时间，合适的剂型设计也非常重要。因此，准确并且可重复的表征方法对于支持和指导药物生产以及制剂决策不可或缺。

执行关键的 QA/QC 程序

药品生产者必须对生产工艺和最终产品进行严格监测以保证产品的一致性、质量和纯度。因此需要可靠、严格和准确的方法进行质量确认和质量控制，确保产品符合预定的指标，以及确保最终产品的安全性和有效性。必须对生物制品的性质、杂质、含量（如蛋白质含量）和稳定性进行测试。为了获得 FDA 和 EMA 的批准，整个质量控制流程都需要满足 GMP 法规要求，而且还需要面对经常性的合规检查。

应对重组蛋白药物表征的挑战

生物制品需要实现良好表征 (well-characterized) 以确保其安全性和有效性。FDA 生物制品评价和研究中心 (CNER) 1996 年提出这一概念，并随着生物药物分子多样性表征技术的不断发展进行了多次完善。对于蛋白质药物，良好表征意味着高度明确的天然分子异质性、杂质谱和有效性。由于蛋白质的性质很复杂，因此没有一个分析平台或应用能满足所有上述测试需要。

生物制品一般是由紧密相关的不同分子量和不同电荷的异构体组成的不均一混合物。它们从活细胞中得到且往往包含多种与产品和工艺相关的杂质。此外，重组蛋白还常常出现复杂的翻译后修饰，具有部分依赖二硫键的高度特异的三维结构，并且可能发生聚集、吸附和截短。因此，全面的化学、物理和构像表征对于了解重组蛋白药物的异质性、杂质谱和有效性是非常必要的。准确的氨基酸序列、分子量、价态变化、糖基化、聚集水平以及氧化水平都是蛋白质药物表征的关键要素。

以下内容就重组蛋白药物完整表征的几种分析类型，详细介绍了最新的分析方法和仪器平台。

2 生物过程监控

蛋白质药物的开发和生产中，有效的过程监控技术是必不可少的。由于需要更好地了解生物生产过程，以及改善对产生重组蛋白的微生物的给料及其它相关参数的控制，所以需要快速有效的监测技术。生产过程也必须可靠、标准化、可转移并且不受人为因素影响，这进一步地推动了有效监测技术的需求。旨在缩短产品面市时间和确保最高效的生物生产工艺而进行的工艺开发提速也是一个强大的推动力。最后，遵守 FDA 和 EMA 关于过程分析技术 (PAT) 的指南也需要准确而可靠的监测技术。发酵、提取和纯化工艺达到合适的效率，对产品的成功至关重要。

蛋白 A 色谱法常规用于单克隆抗体生产中免疫球蛋白 G (IgG) 抗体的亲和纯化。分析型蛋白 A 柱也用于制备分析样品和进行滴度测定，即测定生物反应器中目标蛋白质的浓度。配备 AssayMAP Protein A 纯化柱的安捷伦 Bravo 蛋白质纯化系统是一个优秀的自动化系统，可用于快速测定抗体的滴度，以及制备少量抗体用于其它的分析型表征技术，如糖基化、电荷异构体分析和基于分子量的分离。全部捕集流程都在一个可重复使用的微型色谱柱中完成 (图 1)。96 孔板形式的蛋白 A 滤芯可以实现高通量分析。AssayMap 纯化柱还可以装填其它种类的树脂，如 Protein G、Protein L、离子交换、反相和链霉亲和素树脂，用于抗体和其它重组蛋白的快速筛选。AssayMap 微孔板也可以装填上述介质，以用于不同的筛选目的。例如，离子交换板可用于在各种不同的 pH 值和盐浓度下筛选合适的结合条件。

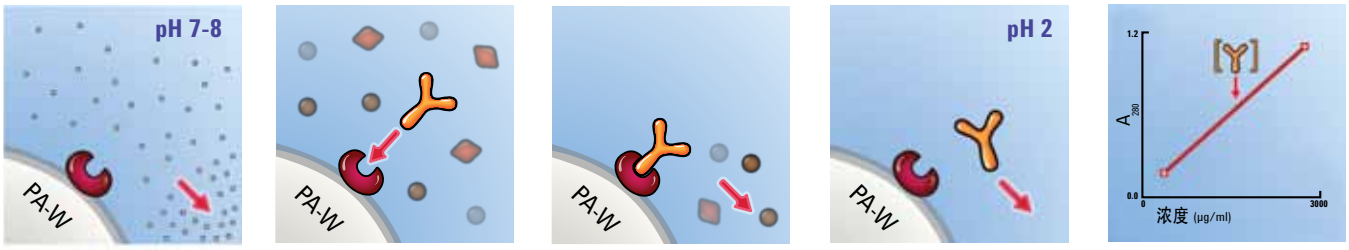


图 1. 配置 AssayMAP Protein A 纯化柱的安捷伦 Bravo 蛋白质纯化系统的完整捕集流程，结果用于蛋白质的滴度分析。Protein A 在中性 pH 下捕集单克隆抗体，然后使用酸性缓冲液在低 pH 下将单克隆抗体洗脱出来。生成的校正曲线用于准确测量生物反应器中产生的单克隆抗体的浓度

能够利用微流芯片进行快速蛋白质分析的安捷伦 2100 生物分析仪是很有用的过程监测工具。与免疫沉淀法结合，它能对粗提大肠杆菌裂解物中的蛋白质进行高灵敏度、高选择性的定量分析。例如，该方法已被用于精提细胞裂解物中 β- 半乳糖苷酶的定量分析，得到了跨越几个数量级的高重现性结果。安捷伦 2100 生化分析仪还可用于对蛋白质纯度和杂质去除进行确认。

免疫球蛋白 M (IgM) 单克隆抗体的生产需要准确、快速和简单的分析方法以测定细胞培养上清液中的目标蛋白浓度，记录过程中多个色谱步骤不同流分内 IgM 和蛋白质污染物的分布。安捷伦 Bio Monolith QA 色谱柱（一种强阴离子交换柱）可以被用于 IgM 纯化过程的监测和细胞培养上清液中 IgM 的定量分析（图 2）。

重组蛋白药物的生产过程中可能需要监测的一个参数是蛋白质聚乙二醇化（即蛋白质分子与聚乙二醇，或 PEG 连接）的程度。蛋白质的聚乙二醇化通过增强药物溶解度，减少用药频率和毒性，提高药物稳定性，改善了许多药物的安全性和有效性。聚乙二醇化程度可以利用体积排阻色谱 (SEC) HPLC 通过测定分子量的增加进行监测。因为蛋白质表面电荷会随着聚乙烯二醇链的位置不同而变化，所以离子交换色谱 (IEC) HPLC 也能被用于聚乙二醇化蛋白的分离。还可以用电泳分析的方法测定聚乙二醇化的程度，安捷伦 2100 生化分析仪可以执行自动的芯片级 SDS-PAGE 分析，简化了样品制备，缩短了分析时间，能够在 30 分钟内获得结果（图 3）。

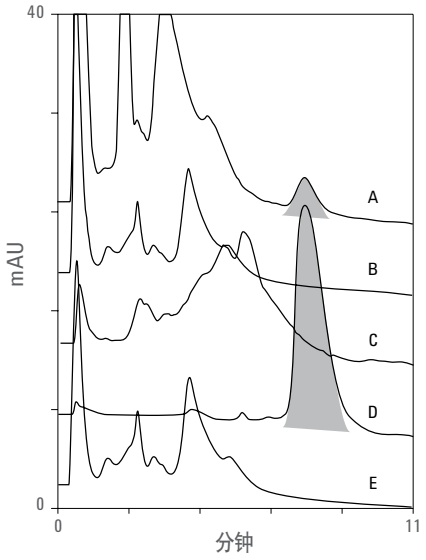


图 2. 羟基磷灰石色谱上得到的一系列流分（A 至 E），分别用安捷伦 Bio-Monolith QA 分析柱进行收集和分析，以确认合适的纯度和柱再生效果。A. 细胞培养上清液；B. 样品自流出组分；C. 洗脱前淋洗；D.IgM 洗脱峰；E. 洗脱后的净化再生

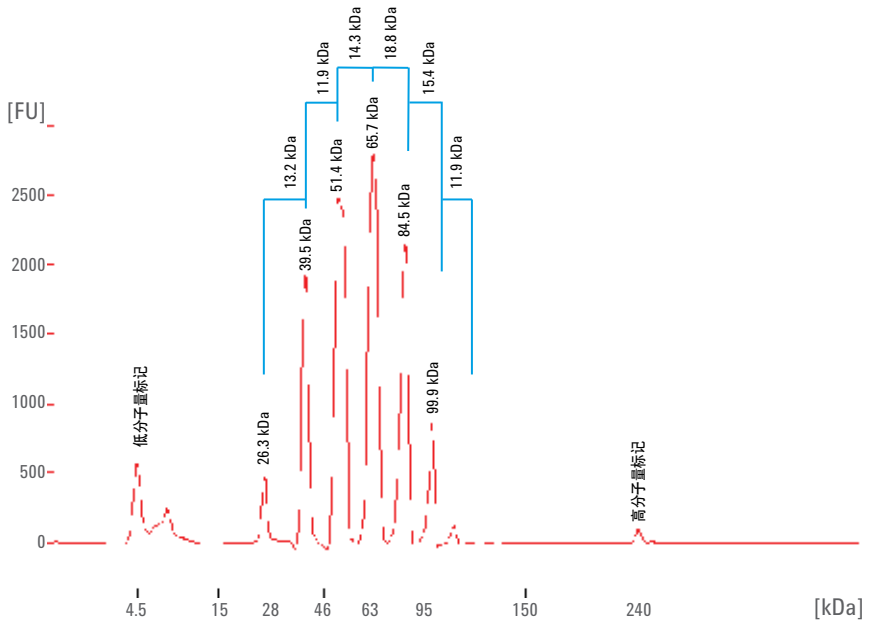


图 3. 使用安捷伦 2100 生化分析仪和 Protein 230 试剂盒分析重组蛋白药物的聚乙二醇化异构体。未结合聚乙二醇链的蛋白质分子量是 26.3 kDA。由于每个聚乙二醇链约增加分子量 5kDa，因此可以看出含有三个 (39.5 kDa)、五个 (51.4 kDa) 和更多聚乙二醇链的蛋白质 - 聚乙二醇分子都能够被很好地分离。需要进一步的质谱分析以明确测定每种异构体中聚乙二醇的数量

生物过程分析技术总结

技术	技术描述	优势	不足
单克隆抗体滴度测定、样品捕集、制备：Protein A-LC/UV	利用蛋白 A 进行 IgG（单克隆抗体）的亲和 HPLC 分离，分离基于从低 pH 到高 pH 的梯度进行	在线分离和检测	离线时通常需要手动建立校正曲线
		能将液相色谱与生物反应器相连实现实时在线分析	液相色谱柱昂贵不能一次性使用
			低通量，每次液相色谱运行只能分析一个样品
单克隆抗体滴度测定、样品捕集，制备：微型色谱 Cartridge Protein A，用于滴度测定的读谱器	BRAVO 液体处理系统，AssayMap 微量色谱头，AssayMap 微量色谱 Protein A 纯化柱，可从培养液或其它介质中分离单克隆抗体，分离基于从低到高的 pH 梯度，通过读谱仪进行滴度测定，其它分析采用液相、液质联用、毛细管电泳等技术	计算滴度的同时制备样品用于表征分析	目前无法连接反应器进行实时在线分析
		96 孔板测定，高通量	对于滴度板，需要另外的读谱仪
		多用途枪头，可一次性使用，成本远低于 Protein A 液相色谱柱	
		自动建立校正曲线和完成分离	
过程监测色谱：分析型离子色谱	配备离子交换柱（强和弱阳离子，或阴离子交换填料）的 HPLC 系统，基于柱填料与蛋白质上总的净电荷之间的相互作用，通过提高盐浓度或 pH 梯度，或二者的结合进行洗脱	能够实现蛋白质电荷异构体的色谱分离，各种阳离子和阴离子交换树脂提供多样的选择性	梯度洗脱时间一般比较长，缓冲液的消耗较大
		与所用过程介质相似的色谱流动相组成，易于测定分离效率和回收率	比毛细管等电聚集分离分离度差
		可以进行流分切割，将收集分离的电荷异构体进行进一步的分析（脱盐处理和缓冲液置换之后，可进行质谱分析）	与质谱不兼容
过程监测色谱：分析型体积排阻色谱	配备体积排阻色谱柱的 HPLC 系统，基于蛋白质分子大小和通过填料孔径的速率实现分离，紫外检测	能够根据组分的大小实现聚集体和杂质的高效分离	分离窗口的限制，在同一分析中分离大分子量的聚集体和小分子杂质相对较困难
		比 SDS-PAGE 的分析时间短	由于很难与质谱联用，所以无法提供质谱信息
		方法简单，通常用于过程监测以测定聚集体的纯度和去除杂质	
		能够收集流分进行进一步分析	
聚乙二醇化过程监测：芯片（生化分析仪）蛋白质电泳分析	2100 生化分析仪，高灵敏度 Protein 250 或 230 试剂盒（包括芯片、荧光标记缓冲液，以及所有的相关试剂），电泳分离，荧光检测	能够基于分子大小区分同种蛋白质的单聚乙二醇化和多聚乙二醇化分子	目前无法连接反应器进行实时在线分析
		分离度高	不能进行样品收集用于后续分析
		可得到定量结果	
		分析时间比 SDS-PAGE 短	

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-7203EN	使用安捷伦 Bravo 自动化系统和 AssayMAP1 蛋白 A 纯化柱进行高通量人 IgG 蛋白纯化
5989-9733CHCN	用安捷伦 Bio-Monolith Protein A HPLC 色谱柱快速测定人多克隆 IgG
5990-6153EN	采用 Agilent 2100 生物分析仪对蛋白质纯化过程进行监测
5989-9674CHCN	用 Agilent Bio-Monolith QA 柱快速测定细胞培养液中的 IgM 并监测纯化过程

完整蛋白质的鉴定、纯度和杂质分析

3

尽管蛋白质生物制品总体来说是相对稳定的分子，但是在生产、制剂和储存过程中，还是会发生一些化学修饰和降解反应。许多蛋白质在纯化过程中可能发生水解断裂，而断裂形成的片段污染物可能会导致患者免疫反应的不良后果。由于存在化学修饰和降解反应，因此需要可靠而且灵敏的方法来评价研发和生产过程中蛋白质的纯度和结构完整性。

完整蛋白质、完整亚基或结构域的精确质量测定对于蛋白质序列组成的快速确认和翻译后修饰、降解和样品处理引起的分子变异的鉴定非常有帮助。电泳、色谱和质谱 (MS) 技术是完整蛋白质及其降解物分子量测定的最常用技术。其中一种最常用的分析是体积排阻色谱 (SEC)，它用于测定蛋白质是否为单体结构，并且在生产和制剂过程中是否始终保持这一结构。

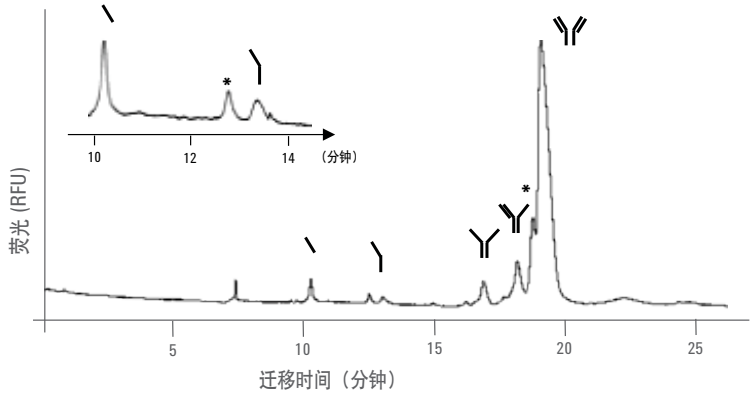
SDS 电泳可用于精确测定蛋白质的分子量和纯度，全自动芯片系统能够监测研发和生产的整个过程。安捷伦 2100 生化分析仪设计用于自动分离和定量测定广泛的蛋白质。大分子糖基化蛋白由于含有很大的糖基，很难用电泳方法进行分离。然而如果去除糖基，则可得到更好的分离和更准确的分子量测定。此外，很多不同种类的结构，包括糖基化、去糖基化和各种异构体都可以用安捷伦 2100 生物分析仪进行很好的分离和检测。

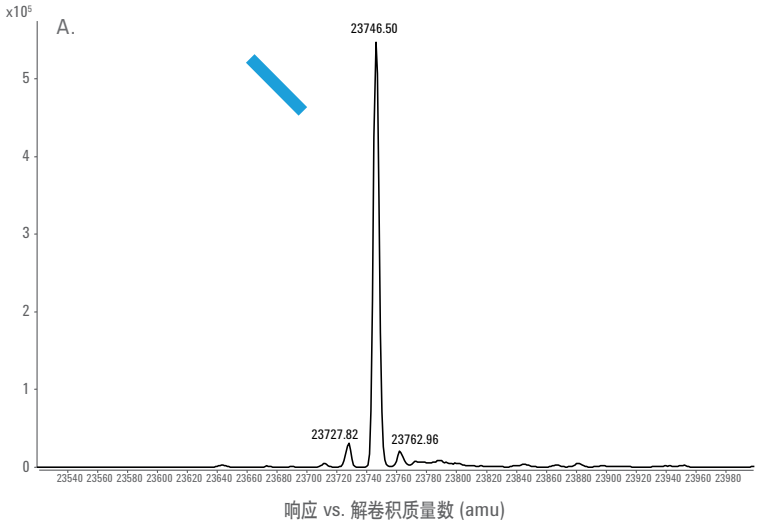
蛋白质生物制剂分子量测定的首选方法是毛细管电泳 (CE)。根据检测器的不同可有多种方法，从 CE/UV 或 CE/LIF（激光诱导荧光检测），到兼具激光诱导荧光检测和质谱检测的联用方案 CE/LIF/MS。由于毛细管电泳主要是根据质量数、电荷和分子的形状进行分离的，因此它对于抗体的一级结构和糖基化状态的分析是一个很有效的工具。同时与 LIF 检测器和飞行时间质谱 (TOF) 联用进行单克隆抗体样品中微量成分的分析和检测可以获得前所未有的灵敏度（图 1）。

液相色谱与飞行时间质谱 (TOF) 或四极杆飞行时间质谱 (QTOF) 联用也能为蛋白治疗药物提供高度准确的质量信息，其准确度超过了电泳方法。分析时间一般小于一小时，可以获得蛋白质和任何降解或修饰杂质的重要信息。例如，电喷雾 (ESI) LC/QTOF 质谱在 9 分钟内即可完成单克隆抗体的分析，质量准确度优于 25 ppm，而且还可以获得样品中各种抗体相关杂质的信息。

很多具有治疗作用的蛋白质，包括单克隆抗体都是通过二硫键组成的蛋白质复合体。这些复合体可通过还原分解成亚单位，再通过 HPLC/MS 进行分析。虽然完整单克隆抗体分析能够提供很多关于纯度和糖基化水平的信息，但分析二硫键的还原产生的轻、重链亚单位可以得到更多的信息。可以检测重链中糖基化的水平和类型，以及不需要的修饰，如非酶促和非特异的糖基化（图 2）。

图 1. 使用 CE/LIF 和 1 mg/mL 天然荧光染料（激发波长 266 nm；发射波长 >290 nm）分离部分还原的 IgG。天然的糖基化抗体复合物与重链缺少糖基化的复合物得到了分离 (*)。插图为 10-14 分钟区域的放大图，包含轻链、没有 N- 糖基化 (*) 的重链和有糖基化的重链





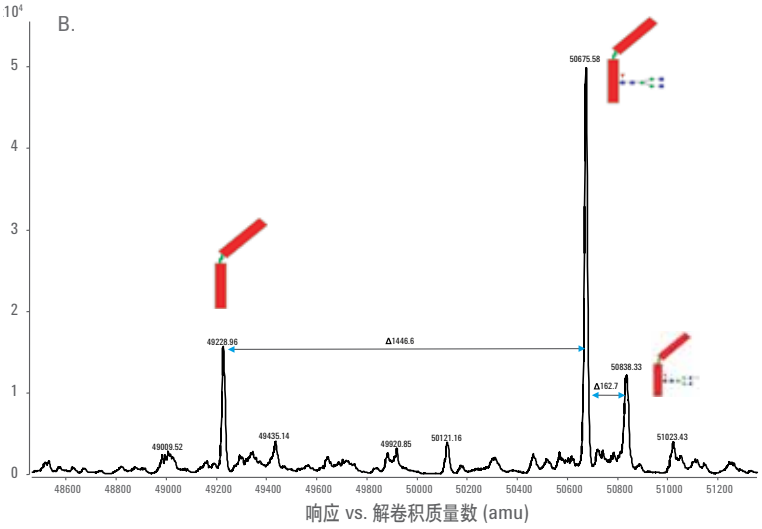


图 2. 使用安捷伦 1260 Infinity 液相色谱 - 芯片 / 精确质量 QTOF 质谱和 ZORBAX 300SB-C8 (300) 富集和分析柱对还原的单克隆抗体进行分析。
A) 单克隆抗体轻链的解卷积谱图（蓝条）
B) 单克隆抗体重链的解卷积谱图（红条，带不同糖基）

完整蛋白质的鉴定、纯度和杂质分析技术汇总

技术	技术描述	优势	不足
SDS 电泳	电泳槽，丙烯酰胺凝胶，缓冲盐和试剂，考马斯亮蓝或银染（蛋白质将根据各自的电荷和大小进行分离，小的蛋白质或单体在前，随后是二聚体和高聚体）	可以在迁移条带中肉眼判别蛋白质、聚集体和杂质	对于类似分子大小但不同修饰和结构的完整蛋白质和杂质的分辨力低
		可以切割条带收集样品用于进一步分析	不能定量
分析型体积排阻色谱	液相色谱系统，体积排阻色谱柱，根据蛋白质分子大小和通过多孔填料的速率进行分离，紫外检测	基于分子大小对聚集体和杂质进行高分辨分离	分离窗口的限制，在同一分析中分离大分子量的聚集体和小分子杂质相对较困难
		分析时间比 SDS-PAGE 短	由于很难与质谱联用，因此无法提供质谱信息
		是一种监测聚集体和去除杂质的简单方法	
		可以收集流分进行进一步的分析	
芯片（生化分析仪）蛋白质电泳分析	2100 生化分析仪，高灵敏度的 Protein 250 试剂盒（包括芯片、荧光标记缓冲液和所有相关试剂），电泳分离，荧光检测	定量结果	目前无法连接反应器实现实时在线分析
		高分辨分离	不能进行流分收集用于进一步分析
		可以分离低分子量杂质、完整蛋白质和可能的聚集体	
		分析时间比 SDS-PAGE 短	
毛细管电泳 / 紫外 (CE/UV)	毛细管电泳系统 (7100 CE)，采用区带电泳分离模式，毛细管和缓冲液，基于分子大小进行完整蛋白质和杂质的分离，紫外检测	与反相液相色谱互补的分离技术	不能提供质谱信息，需要进一步的分子结构确认以判断杂质是否来自目标蛋白质
		在某些情况下，分离度比液相色谱高	不能进行样品收集用于进一步分析
毛细管电泳 / 激光诱导荧光检测 (CE/LIF)	毛细管电泳系统 (7100 CE)，采用区带电泳分离模式，毛细管，APTS 标记和缓冲液，基于分子大小进行完整蛋白质和杂质的分离，激光诱导荧光检测 APTS 标记的蛋白质和杂质，基于阶梯标准品进行鉴定	与反相液相色谱互补的分离技术	不能提供质谱信息，需要进一步的分子结构确认以判断杂质是否来自目标蛋白质
		在某些情况下，分离度比液相色谱高	不能进行样品收集用于进一步分析
		荧光标记和激光诱导荧光检测提高了选择性	完整蛋白质和杂质可能不完全被标记

技术	技术描述	优势	不足
毛细管电泳 / 激光诱导荧光 / 质谱 (CE/LIF/MS)	毛细管电泳系统 (7100 CE)，采用区带电泳分离模式，毛细管，APTS 标记和缓冲液，基于分子大小进行完整蛋白质和杂质的分离，激光诱导荧光检测 APTS 标记的蛋白质和杂质，质谱检测，根据阶梯标准品和分子量数据库鉴定完整蛋白质、异构体和杂质	与反相液相色谱互补的分离技术	不能提供质谱信息，需要进一步的分子结构确认以判断杂质是否来自目标蛋白质
		在某些情况下，分离度比液相色谱高	不能进行样品收集用于进一步分析
		荧光和质谱的联用提高了分析结果的特异性	完整蛋白质和杂质可能不完全被标记
			质谱信号可能受到游离的 APTS 标记物的抑制
反相液相色谱 - 紫外检测 (RP-LC/UV)	HPLC 系统，采用 C8 或更小碳链的反相液相色谱柱，通过不断增加的有机相梯度利用疏水性差异达到组分分离，紫外检测（一般用于监测二硫键形态 / 转变以及蛋白质降解）	色谱柱选择范围广，可分离各种变异体和杂质（如 C18、C8、C4、C3、二苯基柱、亲水柱）	没有质谱信息，进一步的分析则需要收集流分
		可以收集流分进行质谱分析	
		分析方法可靠，常常用于 QA/QC 分析	
反相液相色谱 / 四极杆飞行时间质谱(电喷雾源) RP-LC/QTOF MS (ESI)	HPLC 系统，采用 C8 或更小碳链的反相液相色谱柱，通过不断增加的有机相梯度利用疏水性差异达到组分分离，质谱检测	色谱柱选择范围广，可分离各种变异体和杂质（如 C18、C8、C4、C3、二苯基柱、亲水柱）	一般不用于 QA/QC，液质的操作和数据分析需要有经验的专业人员
		可以收集流分进行质谱分析	
		可以提供完整蛋白质、可能的变异体、杂质和非目标蛋白质衍生杂质的质量信息，可能的变异和引入杂质的（可以对这些组分进行收集、酶解和肽图分析）	

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-3445EN	使用安捷伦 HPLC-Chip 精确质量 LC/MS 技术进行单克隆抗体的基本表征
5989-7406EN	采用精确质量 LC/TOF-MS 进行完整蛋白质的分子量确认
5989-0332EN	采用 Agilent 2100 生物分析仪进行糖蛋白分离
5989-8940EN	Agilent 2100 生物分析仪进行高灵敏度 Protein 250 分析的性能特性
5989-6840EN	采用 HPLC 和 LC/MS 比较不同 ZORBAX StableBond 300 Å 液相色谱柱的性能，优化抗体分离的选择性

糖基化分析

4

糖蛋白可以参与免疫防御、细胞生长以及细胞与细胞间的粘附，而帮助介导这些功能的糖链具有无数种复杂的结构，因此需要有效的分析技术进行解析。目前存在的蛋白质类药物中 90% 以上是糖蛋白。例如，许多不同形式的重组免疫球蛋白（如单克隆抗体）被用于多种危险疾病的治疗，如转移性乳腺癌和非霍奇金淋巴瘤。这些糖蛋白药物中含有复杂的寡糖基团，它们的存在与否和分布类型能显著影响生物药物的疗效、药代动力学特性，免疫原性，折叠方式以及稳定性。例如，已经知道某些糖基结构可以导致药物分子聚集从而降低药物的疗效。反过来，糖基化的程度和类型与用于抗体生产的表达系统和细胞培养条件密切相关。因此，在整个发酵、纯化和制剂过程中，需要监测蛋白生物制剂中包含的 N 连接糖基化结构的类型和相对数量，以确保药物产品的一致和稳定。

多种方法可以用于糖蛋白及其糖基的表征。例如，液相色谱 / 四极杆飞行时间质谱仪 (LC/QTOF MS) 可以检测完整蛋白质上糖基单元的数量，从而区分药物分子的活性形式和非活性形式（图 1）。此外，利用胰蛋白酶消解并通过 LC/QTOF MS 分离并鉴定消解后的糖蛋白，可以解析出初始糖蛋白的糖基化位点。通过将测得的肽的质量数与根据理论消解模型推测的质量数进行比较，可以判断蛋白质的糖基化是否正确。毛细管电泳 / 四极杆 - 飞行时间质谱仪（CE/QTOF）也能用于此类分析，它的分离效率更好，分析时间更短，样品和溶剂的消耗更少。

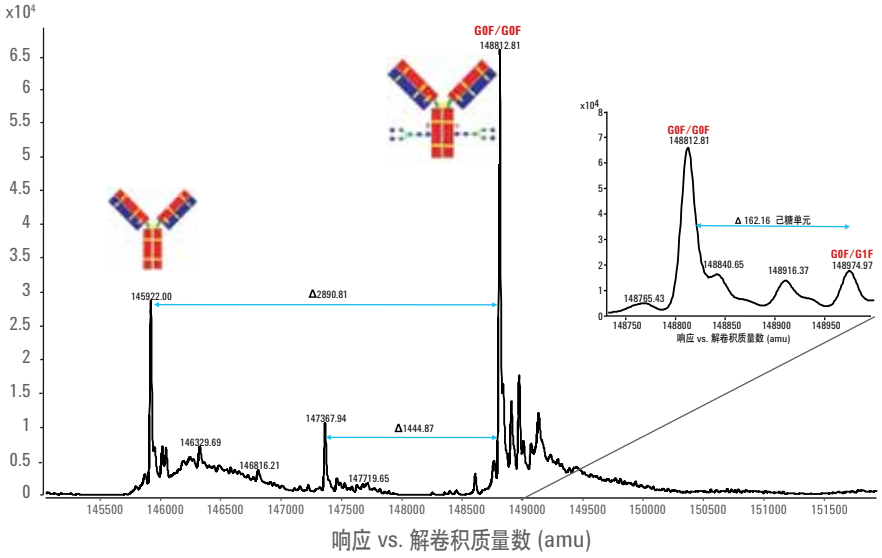


图 1. 完整蛋白质的 Q-TOF MS 解卷积质谱图，插图是单克隆抗体上少量的 G1F 形式（G0F 增加己糖单元）的放大图。数据是用安捷伦 1260 Infinity HPLC-Chip/MS 系统联用 6520 精确质量 Q-TOF LC/MS 平台得到的，色谱柱是 75 µm X 43 mm ZORBAX 300SB-C8

蛋白质上糖链的分析一般是通过酶解去糖基化和水解进行的（图 2）。N- 糖苷酶 F (PNGase F)，一种酰化酶，被用于糖蛋白中天冬酰胺连接 (N-linked) 的寡糖链的剪切。一般将剪切的糖链衍生化、标记，然后进行荧光检测。然后可采用毛细管电泳 / 激光诱导荧光（LIF）或质谱检测鉴定和定量分析氨基芘三磺酸 (APTS) 标记的糖链。或采用液相色谱 / 荧光检测 (HPLC/FLD) 分离和鉴定 2- 氨基苯甲酰 (2-AB) 标记的糖链。液相色谱 / 荧光检测法经常使用亲水作用 (HILIC) 色谱柱或其它的固定相分离糖链。这些技术不能提供质量信息，不能分离所有的异构体，对于低浓度的糖基缺乏足够的灵敏度，而且由于酶解和标记过程漫长，一般需要两天的时间才完成样品分析。

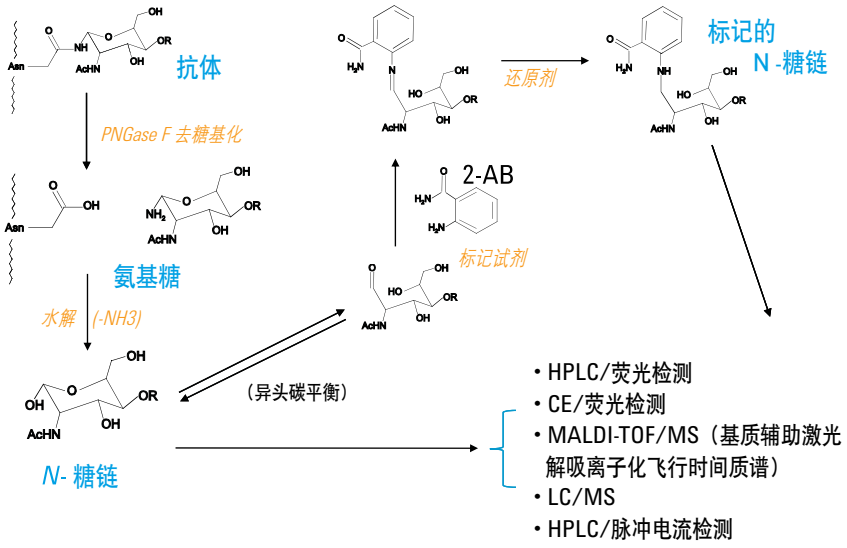


图 2. 糖链表征的分析流程

还有一些技术可检测非标记的糖。传统采用高效阴离子交换色谱 / 脉冲电流检测 (HPAEC-PAD) 分离和检测非标记的糖，分离基于羟基与固定相的相互作用。HPAEC-PAD 也用于检测唾液酸的含量，以确保产品的安全性和批次之间的重现性。尽管这一方法不会受到标记不完全带来的影响，但它所得到的指纹图信息仍然需要标准品来进行糖链鉴定。气相色谱 (GC) 也是一种用于单糖组成分析的常用方法，它具有高可靠性和高分离度的优势。

还可以用反相液相色谱 / 质谱和基质辅助激光解吸 / 离子化 - 飞行时间质谱 (MALDI-TOF/MS) 分析非标记糖链，以获得糖链的质量信息。但是这些技术仍然不能分离所有可能的异构体。

安捷伦开发了一种独特的，基于芯片的液质解决方案，能够在 10-30 分钟内获得 N- 糖链 (N-Glycan) 的信息，整个分析是自动化的，而传统方法需要的两天时间才能完成分析。mAb-Glyco 芯片试剂盒使用在线 PNGase F 反应器进行去糖基化，用石墨化碳富集柱进行糖链的浓缩，然后用石墨化碳分析柱进行分离。多孔石墨化碳能分离所有可能的糖链结构，包括普遍存在的异构体 (图 3)。所有的步骤都在与安捷伦质谱系统连接的一个纳流液相芯片上完成。分析人员只需将单克隆抗体样品稀释、离心并放入自动进样器。剩下的分析步骤在芯片上自动完成。随后使用 MassHunter 软件和提供的糖链数据库进行糖链结构、含量和比例的鉴定分析。需要安捷伦的毛细管泵、纳流泵、芯片接口附件和安捷伦的质谱系统。该芯片能够分离和定量所有常见的 N- 糖链 (N-Glycan)，卓越的重现性使其能成为有用的过程分析技术 (PAT)，以确保蛋白治疗药物中糖基组成的批间重现性 (图 4)。安捷伦还提供不含酶解反应器的多孔石墨化碳芯片，可以对离线去糖基化的样品进行分析。

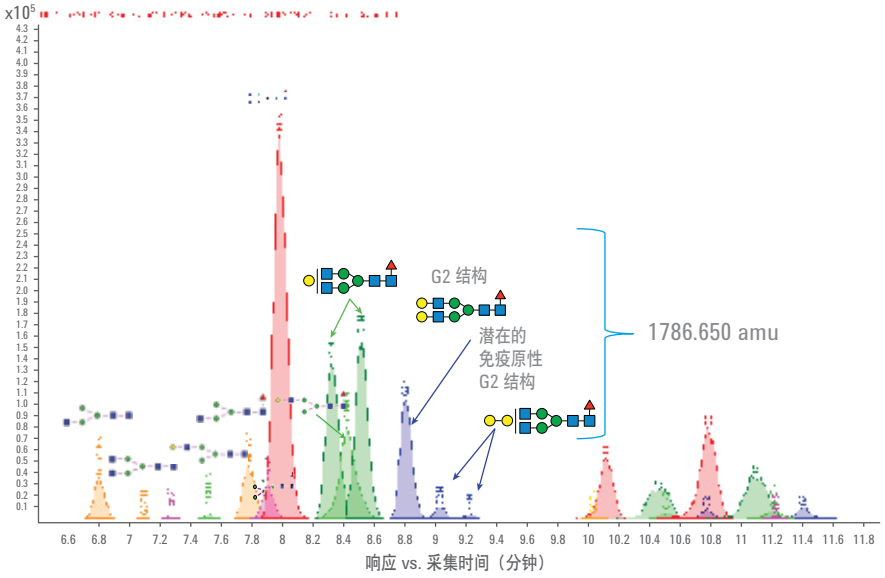
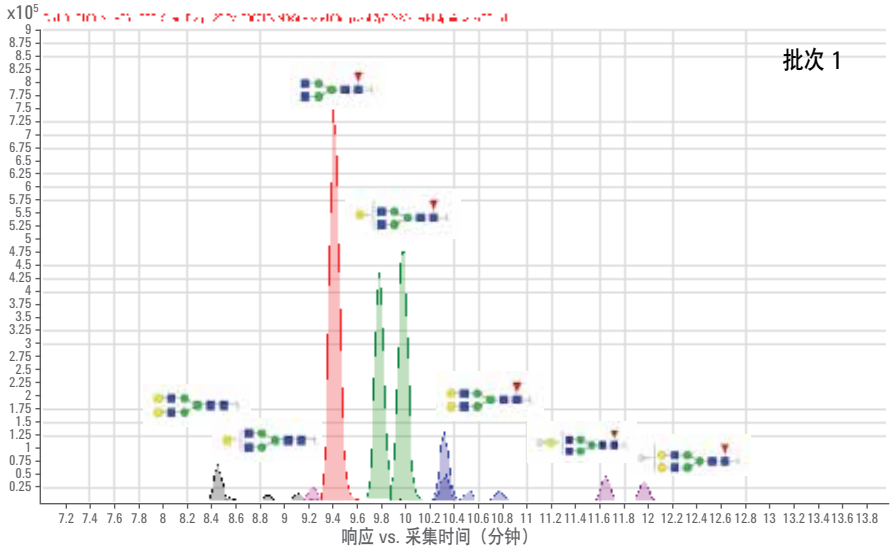


图 3. 使用 mAb-Glyco 芯片分离包括异构体的单克隆抗体的糖链。三个 G2 峰出现在 8.7 至 9.3 分钟之间，显示为蓝色。第一个 G2 峰代表普通的 G2 结构，每个臂上含有一个半乳糖，较小的两个 G2 峰是 α 连接的半乳糖结构，具有潜在的免疫原性

当需要了解糖链的三维结构以全面了解蛋白质药物的性质时，就要用到核磁共振 (NMR) 来解析糖蛋白和糖链的重要结构特征。二维核磁共振利用两种天然活性原子核 (^{13}C 和 ^{1}H) 信号，能够给出明确的蛋白质结构排列和糖链空间构像信息。核磁共振 (NMR) 对于不寻常的或者以前未发现的糖链（如细菌糖缀合物中的糖链）的结构解析来说是必不可少的手段，氢谱 (^{1}H NMR) 已经成为游离糖链结构解析的有力工具。



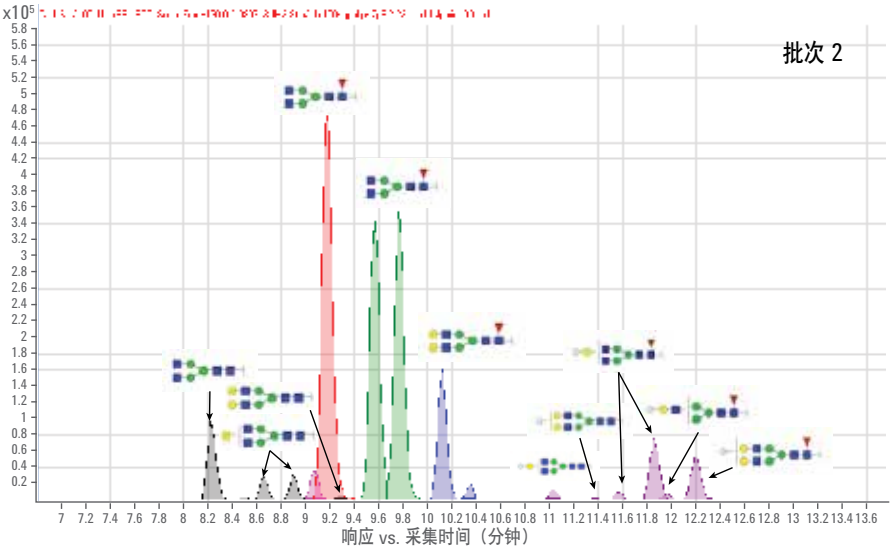


图 4. 两个生产批次的单克隆抗体的糖谱比较，采用 mAb-Glyco 芯片进行分析。批次 2 的样品含有更高比例和更多类型的唾液酸化糖链

糖链分析技术汇总

解决方案	技术描述	优势	不足
毛细管电泳（毛细管区带电泳）/ 激光诱导荧光检测（CE(CZE)/LIF）	PNGase F 剪切掉 N- 糖链，经氨基芘三磺酸 (APTS) 荧光标记，离子态分离（毛细管区带电泳，CZE），激光诱导荧光激发和检测，基于阶梯标准品进行鉴定	分离度高，能够区分大多数的位置异构体	酶解和标记步骤很耗时
			需要聚糖阶梯标准品进行鉴别
			潜在的标记效率问题
			没有质量信息，依赖阶梯标准品
毛细管电泳（毛细管区带电泳）/ 质谱（CE(CZE)/MS）	PNGase F 剪切掉 N- 糖链，经氨基芘三磺酸 (APTS) 荧光标记，离子态分离（毛细管区带电泳，CZE），质谱检测，基于阶梯标准品和分子量数据库进行鉴定	分离度高，能够区分大多数的位置异构体	酶解和标记步骤很耗时
		提供糖基的精确质量信息	潜在的标记效率问题
亲水作用液相色谱 / 荧光检测（HILIC-LC/FLD）	PNGase F 剪切掉 N- 糖链，经 2- 氨基苯甲酰 (2-AB) 荧光标记，采用递减的有机相梯度利用疏水性差异进行分离 (HILIC)，荧光标记检测，用保留时间数据库进行鉴定	分离度高，能够分析大多数的位置异构体	酶解和标记步骤很耗时
		可以收集流分作进一步的分析	潜在的标记效率问题
			没有质量信息，依赖阶梯标准品
高效阴离子交换色谱 / 脉冲电流检测 (HPAEC-PAD)	PNGase F 剪切掉 N- 糖链，不需要荧光标记，采用递增的盐浓度利用电荷态与阴离子交换填料之间的相互作用进行分离，脉冲电流检测（化学转换和电极相互作用），利用保留时间数据库进行鉴定	非标记分析，消除了由于标记反应效率带来的潜在问题	酶解步骤很耗时
		由于无需标记，所以分析速度很快	可能存在糖链组分的共流出
		常常用于批次样品的"指纹图"分析，而不用于定量或鉴定	分离度和灵敏度不如毛细管电泳和液质技术
气相色谱或气质联用	游离的单糖组成分析（未与蛋白质结合），与蛋白质分离，紫外或质谱检测，利用保留时间和分子量数据库进行鉴定	检测单糖之前分离去除蛋白质，干扰少	不能分析寡糖链
		常用于细胞培养液中单糖的检测并确保在纯化过程中去除	分离度和灵敏度不如毛细管电泳和液质技术
基质辅助激光解吸 / 飞行时间质谱 (MALDI-TOF/MS)	PNGase F 剪切掉 N- 糖链，将游离的糖链点到含离子化基质的 MALDI 板上，基质辅助激光解吸离子化，TOF/QTOF 质谱检测，利用分子量数据库进行鉴定	无需耗时的标记步骤	酶解步骤很耗时
		提供糖基结构的精确质量信息，用于准确的质量鉴定	基质可能引起离子抑制，从而影响灵敏度，导致低浓度的糖链无法被检测到

解决方案	技术描述	优势	不足
多孔石墨化碳 (PGC) 芯片 - 液相色谱 / 飞行时间质谱或四极杆飞行时间质谱	PNGase F 剪切掉 N- 糖链，在多孔石墨化碳富集柱上浓缩，在多孔石墨化碳的纳流分析柱上分离，最后用电喷雾 - 飞行时间质谱或四极杆飞行时间质谱仪分析，用保留时间和分子量数据库进行鉴定	无需耗时的标记步骤	酶解步骤很耗时
		提供糖基的精确质量信息	去糖基化的蛋白质被固定在多孔石墨化碳柱上，因此无法分析
		高分离度和针对寡糖链独特的选择性为糖基以及更多种异构体提供了最佳的分离结果	
单克隆抗体糖基化芯片 - 液相色谱 / 飞行时间质谱或四极杆飞行时间质谱仪 (MAb Glyco Chip-LC TOF/QTOF MS)	在线 PNGase F 反应器剪切掉 N- 糖链，在多孔石墨化碳富集柱上浓缩，在多孔石墨化碳的纳流分析柱上分离，最后用电喷雾 - 飞行时间质谱或四极杆飞行时间质谱仪分析，用保留时间和分子量数据库进行鉴定	可实现在线的酶解剪切糖基，将反应时间从以前的几个小时甚至过夜降低至几分钟	去糖基化的蛋白质被固定在多孔石墨化碳柱上，因此无法分析
		无需耗时的标记步骤	
		提供糖基的精确质量信息，用于准确的质量鉴定	
		高分离度和针对寡糖链独特的选择性为糖基以及更多种异构体的检测提供了最佳的分离结果	
二维核磁共振 (2D) NMR	能够为蛋白质基础研究或结构确认提供糖基结构的三维信息，需要高场磁体和探头进行大分子蛋白质的分析	提供明确的蛋白质结构信息和糖链空间构像信息	一般需要核磁专家进行分析
		能够分析不常见的或以前未发现的糖基	全蛋白质的结构分析较为困难，通常是特定蛋白质区域或位点分析 (如单克隆抗体的 fab 或 Fc 区域)

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-6924EN	采用安捷伦 mAb-Glyco Chip 试剂盒进行单克隆抗体 N 糖链的快速、全自动化表征
5990-5190EN	采用微流控 HPLC-Chip 和安捷伦精确质量 Q-TOF LC/MS 进行单克隆抗体的糖蛋白和糖基化分析
5990-7138EN	采用毛细管电泳和 Q-TOF 质谱仪进行抗体的糖蛋白分析
5990-5155EN	波士顿大学医学院成功案例 —— 定制 HPLC-Chip 实现了新的糖链表达研究

肽图分析

5

肽图分析是蛋白质鉴定，特别是重组蛋白鉴定的最常用的方法。它通过酶解（一般使用胰蛋白酶）将蛋白质打碎形成肽段，然后以可重现的方式进行肽段的分离和鉴定。肽图分析是一种非常有用的方法，已成为生物技术领域中最有价值的工具之一，它能检测和监控单个氨基酸改变、氧化、去酰胺化，以及其它降解形式。它还能直接检测常见的单克隆抗体修饰变异，如 N 端环化，C 端赖氨酸处理，N-糖基化，以及内含子表达等非预期的变异。

肽图是蛋白质及其酶解产物的指纹图谱，它能提供待测蛋白质的全面信息。肽图分析包含四个主要步骤，蛋白质的分离和纯化；肽键的选择性酶切；多肽的色谱分离；多肽的分析和鉴定。对测试样品与参考标准品或对照样品进行同步的酶解和分析。肽图应该包括足够数量的肽段以进行有效的分析；它不仅要提供蛋白质鉴定所需的必要信息，还应尽可能地涵盖完整的蛋白质序列。

利用反相液相色谱 / 质谱进行酶解肽段混合物的分离检测已经成为鉴定重组蛋白的首选方法和产品出厂的必行检测。蛋白质生物制剂的稳定性也是表征的一个重要方面，需要在通常的储存条件下进行长时间的监测，研究保质期内产品可能发生的变化如氧化、还原、糖基化和截短等。

因为常规的液相色谱与质谱很容易联用而且能得到很好的二级质谱用于蛋白质鉴定，所以很多多肽的分析都是在电喷雾 (ESI) 液质联用系统上完成的。Q-TOF 具有高分辨率和高质量精度的优点，能提供更多的结构信息，尤其是对于较大的肽段。分析级和毛细管级的液相色谱系统和色谱柱常常被用于肽图分析。在样品量有限的情况下以及对于单克隆抗体的亚单位或更小的重组蛋白的分析，安捷伦基于微流控芯片的 LC/QTOF 质谱系统能快速提供高度准确的肽图，而且样品量消耗极少。这对于微量杂质或组分的分析是非常有价值的。

蛋白质及其可能的修饰变异体可以从肽图数据中得到鉴定，方法是先用分子特征提取软件确定每个肽段的真实质量数，然后确定其结构。软件还可以根据已知的蛋白质序列生成一个理论的酶解肽段列表。将实验数据与理论肽段进行比较可以确认蛋白质。肽图可能包含超过 60 个独立肽段及其衍生物的峰，因此需要强大的

分离方法。表面多孔的反相颗粒技术采用合适的填料孔径，可以极大提高了分离效率和速度，能实现单克隆抗体中轻链和重链 100% 的序列覆盖率，同时相比传统填料分析时间缩短了一半 (图 1)。全多孔反相色谱颗粒还能生成高覆盖率的肽图，通常使用小粒径的长柱子及超高压液相色谱，如安捷伦 1290 超高压液相色谱系统。

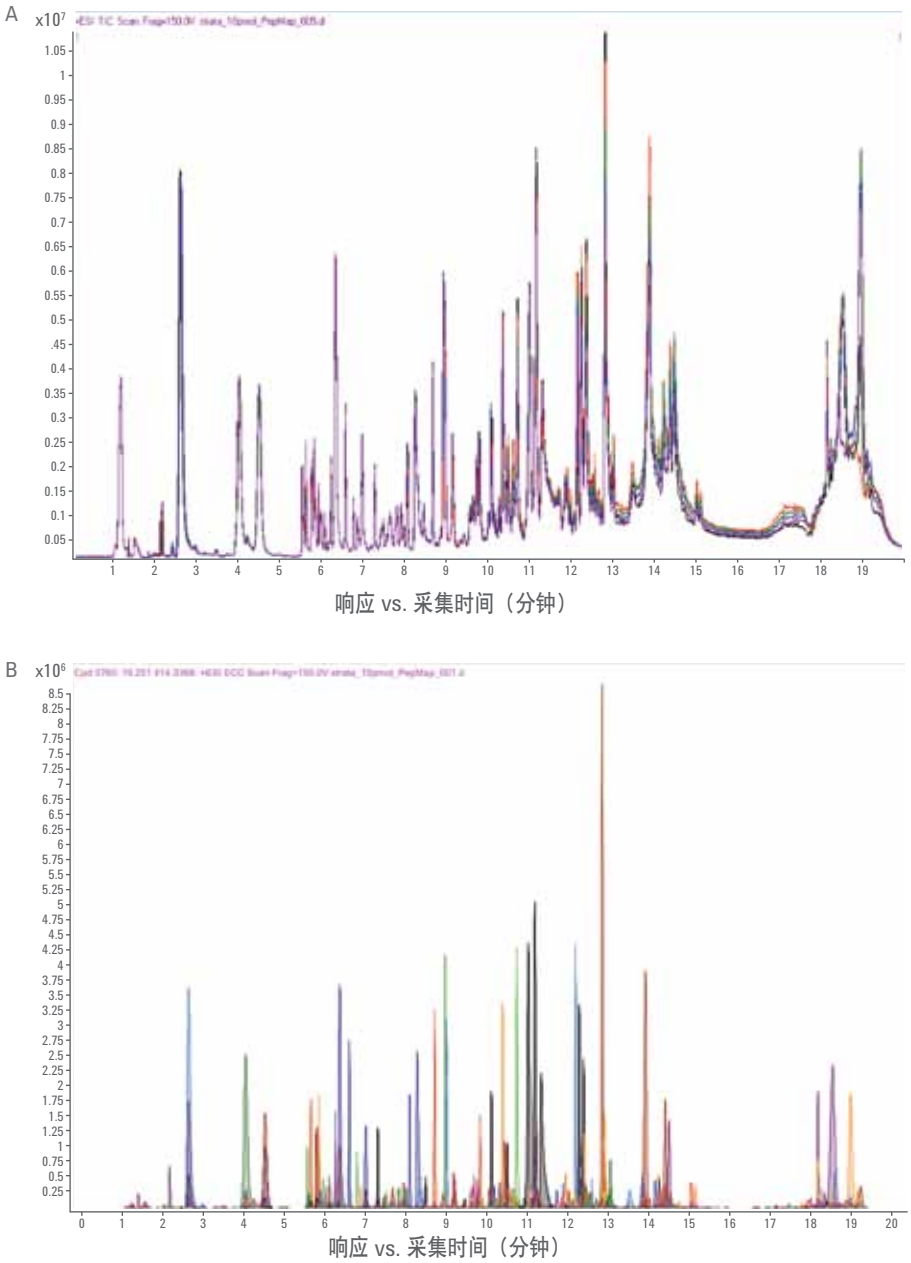


图 1. (A) 单克隆抗体酶解肽段混合物的总离子流图 (TIC)，色谱柱是 Poroshell 120 反相柱。数据采用安捷伦电喷雾 6530 精确质量 Q-TOF LC/MS 得到。(B) 单克隆抗体酶解肽段的提取离子流图，具有 100% 的序列覆盖率

一旦肽图中的肽段得到鉴定，液相色谱 / 紫外检测的色谱图本身就可作为鉴定蛋白质的指纹图 (图 2)。从而使这种快速方法对于过程监测和 QA/QC 非常有用。然而对于紫外检测，最重要的是要能得到足够大的分离度，以分离肽段混合物中的所有组分峰。

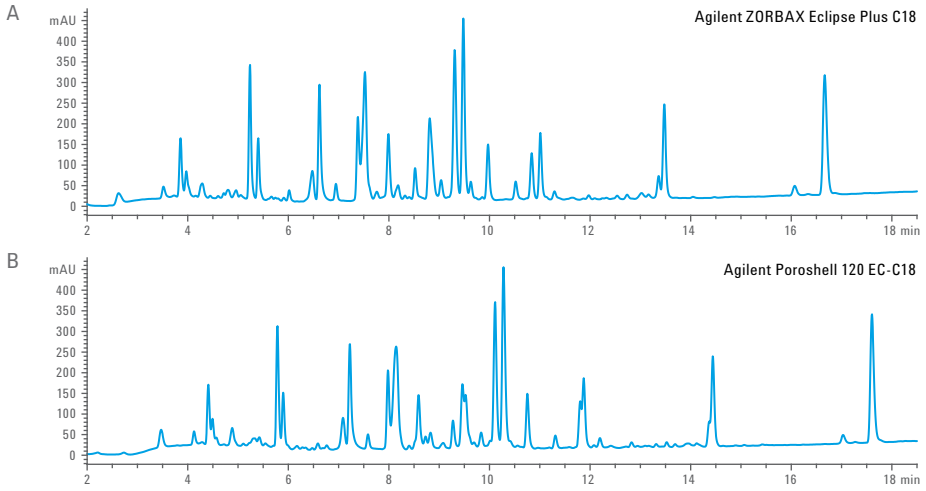


图 2. 一个分子量为 26 kDa 的重组蛋白的酶解物的 HPLC/UV 肽图，采用安捷伦 1260 Bio-inert 液相色谱系统和色谱柱。(A) 安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 3.0 mm × 100 mm, 1.8 µm。(B) Poroshell 120 EC C18 3.0 mm × 150 mm, 2.7 µm，采用 0.6 mL/min 的流速和相应的梯度

最近，毛细管电泳 (CE) 已被用于肽图分析，由于独特的分离机制，它已成为液相色谱技术最好的补充。毛细管区带电泳 (CZE) 是其中最常用的肽图分析方法。毛细管电泳的优点包括分析速度快、样品消耗量小、溶剂消耗少和适用范围广。只要简单地改变缓冲液的组成就可以改变分离选择性和改变分离模式，从而适合于广泛的应用。毛细管电泳肽图分析并不能作为液相色谱 / 紫外和液质肽图分析的替代方法，但它可以作为一个补充方法或者用于数据的确认。

肽图分析技术汇总

技术	技术描述	优势	不足
反相液相色谱/紫外 (RP-LC/UV)	液相色谱系统，采用 C18 色谱柱，通过不断增加的有机相梯度利用疏水性差异达到组分分离，紫外检测（对于较大分子量的蛋白质及其生成的大分子量的肽段，采用较大的填料孔径，如 300 Å）	输出数据通常被称为蛋白质"指纹图"，可以用于 QA/QC 监测	无法提供多肽的质量信息，无法测定序列信息或序列覆盖率
		方法可靠，设备成本低	大多数肽段的分离需要很长的色谱柱和很长的梯度洗脱时间，非常耗时
反相液相色谱/质谱 (RP-LC/MS)	液相色谱系统，采用 C18 色谱柱，通过不断增加的有机相梯度利用疏水性差异达到组分分离，紫外和质谱检测（对于较大分子量的蛋白质及其生成的大分子量的肽段，采用较大的填料孔径，如 300 Å）	可以提供肽的质量信息，能够与蛋白质序列相关联	一般不用于 QA/QC，需要专业人员进行液质操作和数据分析
		可以进行蛋白质序列和结构的验证，以及翻译后修饰如糖基化和去酰氨基化的位点确认	
		质谱检测允许使用更短的色谱柱和梯度时间，以及更短的分离时间	
毛细管区带电泳/二极管阵列检测器 (CE (CZE)/DAD) 或毛细管区带电泳/质谱分析 (CE(CZE)/MS)	毛细管区带电泳（未标记），毛细管，缓冲液；基于肽段的电荷态和大小进行分离，二极管阵列检测 (DAD) 或质谱检测	与液相色谱/紫外或液质技术互补，可以提供不同的选择性和分离谱	分离的重现性问题
		CE/MS 也可以提供肽段的质量信息，以进行序列和覆盖率的确认	毛细管电泳可与质谱连接，但灵敏度可能不如液质

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-4712EN	采用亚 2 µm 色谱柱的快速高分离度肽图分析方法
5990-4587EN	采用微流控 HPLC-Chip 和安捷伦精确质量 Q-TOF LC/MS 进行单克隆抗体的肽图分析
5990-5096CHCN	利用安捷伦 MassHunter BioConfirm 软件更快，更准确地鉴定蛋白质和肽
5990-6313EN	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统改善肽图分析的峰容量
5990-6192EN	采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统通过肽图分析、SEC 和 IEX 进行治疗性蛋白药物的物理化学表征
5990-4031CHCN	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统分析胰蛋白酶酶解产物
5990-7631EN	肽图分析的补充 —— 使用毛细管电泳和四极杆飞行时间质谱仪分析牛血清白蛋白酶解物
5990-8244EN	采用 UHPLC-UV 检测及安捷伦 ZORBAX RRHD 300SB-C18 色谱柱分析单克隆抗体和牛血清白蛋白酶解物

电荷异构体

6

在生产和纯化过程中，蛋白质能表现出多种电荷异质性改变。这些变化不仅影响稳药物的定性，也影响活性，而且还可能导致有害的免疫反应。所以，开发和生产过程中蛋白药物的电荷异构体分析非常关键。电荷变异体的表征通常是用等电聚焦或离子交换色谱进行的。

等电聚焦 (IEF) 通过等电点 (PI) 进行蛋白质的分离，常规用于重组蛋白电荷异构体的指纹图分析。与传统的平板凝胶等电聚焦电泳相比，毛细管等电聚焦电泳 (cIEF) 具有更高的分离度、分析速度，定量能力和自动化性能 (图 1)。

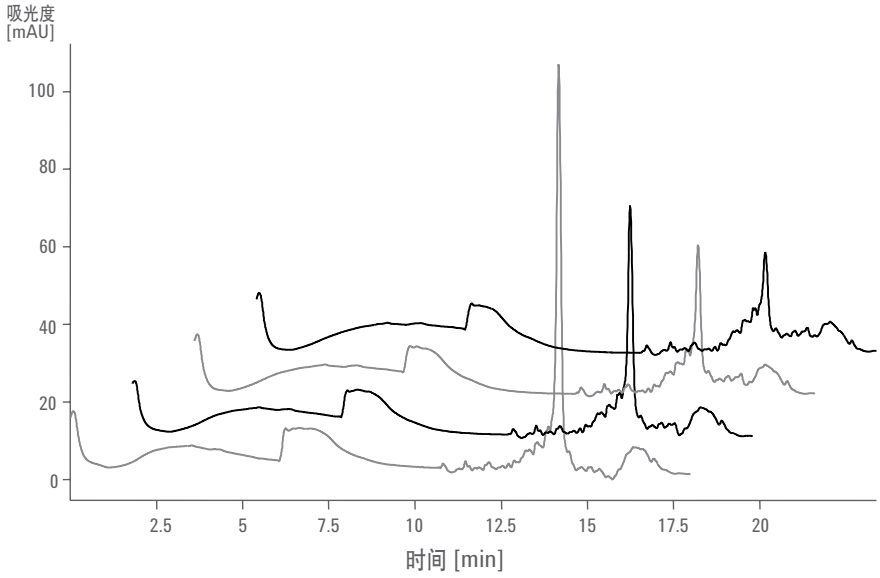


图 1. 采用安捷伦 7100 毛细管电泳系统进行不同浓度碳酸酐酶 IIA 的毛细管等电聚焦分离，浓度分别为 500、250、125 和 62.5 mg/L，结果表明，在整个浓度范围内具有较好的线性

基于游离胶的溶液内等电聚焦技术利用固定化的 pH 梯度实现蛋白质混合物的分级分离。相对于传统的凝胶电泳，溶液中的样品更容易被回收，便于后续应用，如粒度分析或液质分析。安捷伦的 OFFGEL 系统可以进行基于等电点 (PI) 的多肽和变性以及未变性蛋白质的分级分离，分辨率高达 0.1 pH 单位。该技术能使约 80% 的组分进入溶液中，20% 留在胶条上，所以它是一个定性技术，而不是定量技术。

离子交换色谱是蛋白质电荷变异体表征的很有用的工具，它能对等电点相似的蛋白质提供很好的分离，离子交换色谱相比等电聚焦电泳的优势在于，它能够检测蛋白质分子表面电荷分布的差异。分离一般采用水相缓冲液系统和盐梯度，但是也可以使用 pH 梯度，在某些情况下，可以同时使用盐梯度和 pH 梯度，即色谱聚焦技术。

异构体表征在单克隆抗体生产中是非常重要的，弱阳离子交换色谱常被用于测定生产和纯化之后存在的酸性和碱性电荷异构体。通常情况下，需要计算酸性（主峰左侧的区域）和碱性（主峰右侧的区域）异构体所占的百分比（图 2）。这些异构体通常是去酰胺基和糖基化产物。分离出来的每个峰都被收集并且用质谱进行确认。一旦采用标准操作程序 (SOP) 对洗脱峰进行分析，则流出峰的总数量、各自的保留时间，以及酸性和碱性异构体的百分比就可以在整个生产过程中得到监测。单克隆抗体和其它的重组蛋白可能与金属表面发生相互作用。安捷伦开发了生物惰性的液相色谱系统 1260 Infinity Bio-inert LC，它的整个流路都是非金属材料，消除了潜在的蛋白质与金属的相互作用和钝化处理的需要。液相色谱系统采用金属包覆的 PEEK 毛细管（内侧），最大耐压可至 600bar，可使用高盐和高 pH 的缓冲液，而且仍然可以在有机溶剂中运行反相色谱方法。

色谱柱： Agilent Bio MAb, NP10 4.6x250 mm
流动相： A, 10 mM 磷酸盐 , pH 7.5 B,A + 0.1M NaCl
梯度： A) 15 to 75%B in 30 min
B) 15 to 65%B in 30 min
C) 15 to 55%B in 30 min
D) 15 to 47.5%B in 30 min
E) 15 to 40%B in 30 min
流速： 0.8 mL/min
样品： 单克隆抗体
进样体积： 10 µL (1.5 mg/mL)
温度： 25°C
检测： UV 214 nm

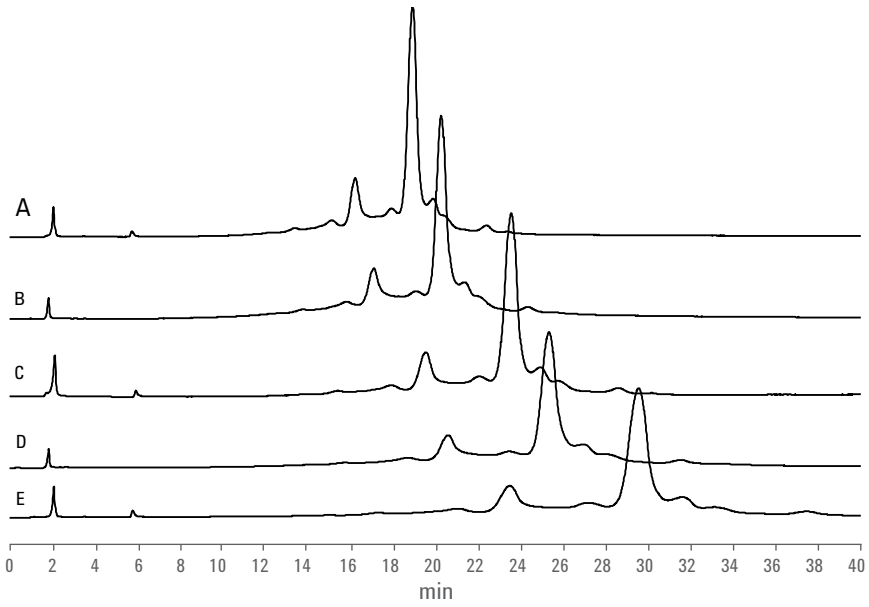


图 2. 单克隆抗体中电荷异构体的弱离子交换色谱总离子图，色谱柱是安捷伦 Bio mAb NP10

电荷异构体分析技术汇总

技术	技术描述	优势	不足
凝胶等电聚焦电泳 (IEF)	pH 梯度的聚丙烯酰胺凝胶基质，试剂、蛋白质根据自身的电荷态在 pH 梯度凝胶上迁移	根据蛋白质的电荷态和等电点进行可视化分离和鉴定	纯化蛋白质电荷异构体的分离度较低，对于蛋白质混合物的分离结果较好
		可以切割条带进行样品的收集，用于后续分析	不能定量分析
毛细管等电聚焦电泳 (cIEF)	毛细管电泳，等电聚焦模式，蛋白质样品与两性电解质混合，混合物上样到毛细管，之后进行电泳分离（带电的蛋白质或异构体迁移至各自的等电点，然后用紫外或激光诱导荧光检测）	重组蛋白电荷异构体的高分辨分离	流分收集有限，因此很难进行下一步的分析
		分析速度比离子交换凝胶色谱快	与质谱不兼容
全柱毛细管等电聚焦电泳 (iCE)	等电聚焦系统，蛋白质样品与两性电解质混合，混合物上样到毛细管，之后进行电泳分离（带电的蛋白质或异构体迁移至各自的等电点），紫外光照射整个柱子，数码相机记录蛋白质的迁移位置，无需将蛋白质迁移至紫外检测器的步骤	分离度与传统的等电聚焦凝胶电泳相当，但是具有全柱分离的优势	与荧光检测不兼容，不能分析荧光标记的蛋白质样品
		自动进样，分析时间短，无需将蛋白质迁移至紫外检测器的步骤	与质谱不兼容
		可以定量	
OFFGEL 游离胶电泳	基于等电聚焦进行流分切割的电泳系统，80% 的蛋白质迁移至溶液中，20% 的蛋白质留在胶中	可用于筛选 pH 缓冲液条件，支持毛细管等电聚焦和离子交换色谱的方法开发	不能对蛋白质和混合物的流分进行定量
		常用于复杂蛋白质混合物（如血浆，细胞裂解液）的分级分离，然后进行质谱分析	无法检测，只用于离线条件下的分级分离
离子交换色谱 / 紫外检测 (IEX-LC/UV)	离子交换液相色谱系统（强和弱阳离子交换柱），蛋白质总的净电荷与柱填料之间相互作用，通过递增的缓冲盐梯度或 pH 梯度或二者合用模式分离蛋白质样品	提供蛋白质电荷异构体的色谱分离，多样化的阳离子和阴离子交换树脂提供了多种分离选择	一般采用长梯度时间，缓冲液的消耗较大
		能分离和收集流分进行下一步分析（除盐和缓冲液置换之后，可以进行质谱分析）	分离度比毛细管等电聚焦低
			与质谱不兼容

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-6192EN	采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相色谱系统通过肽图分析、SEC 和 IEX 进行治疗性蛋白药物的物理化学表征
5989-9852EN	安捷伦毛细管电泳系统进行毛细管等电聚焦分析
5990-6521EN	利用 Agilent 3100 OFFGEL 的等电聚焦分级分离和 Agilent 2100 生物分析仪的高灵敏度蛋白质检测进行抗体电荷异构体监测

7 聚集

蛋白质药物中聚集体的数量、类型和大小对药物的安全性和有效性有很重要的影响。蛋白质聚集体的形成涉及多种机理，包括疏水基团之间的非共价键相互作用以及二硫键的形成等。蛋白质药物中任何一种聚集体的存在都是有害应当避免的，这是因为聚集体可能导致免疫原性反应（小的聚集体）或者可能影响给药（微粒）。不可逆的聚集体对蛋白质药物潜在的影响最大，尤其是在长期储存和运输过程中产生的不可逆聚集体。常用于聚集体分析的方法有高速离心、体积排阻色谱（光散射检测），以及非变性凝胶电泳。

中性 pH 条件下的非变性凝胶电泳可用于研究蛋白质的构像、自结合或聚集体。SDS-PAGE（SDS 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳）也可用于分离聚集体，但该技术非常耗时且不能很好地分离分子量接近的聚集体或潜在杂质。安捷伦 2100 生物分析仪和高灵敏度 Protein 250 Assay 可以快速分离完整蛋白质、聚集体和低分子量的杂质，如非糖基化的完整单克隆抗体和游离的轻链和重链。这个分析方法具有很高的重现性 (%CV <6%)，并很容易用于开发和生产过程中的质量控制（图 1）。

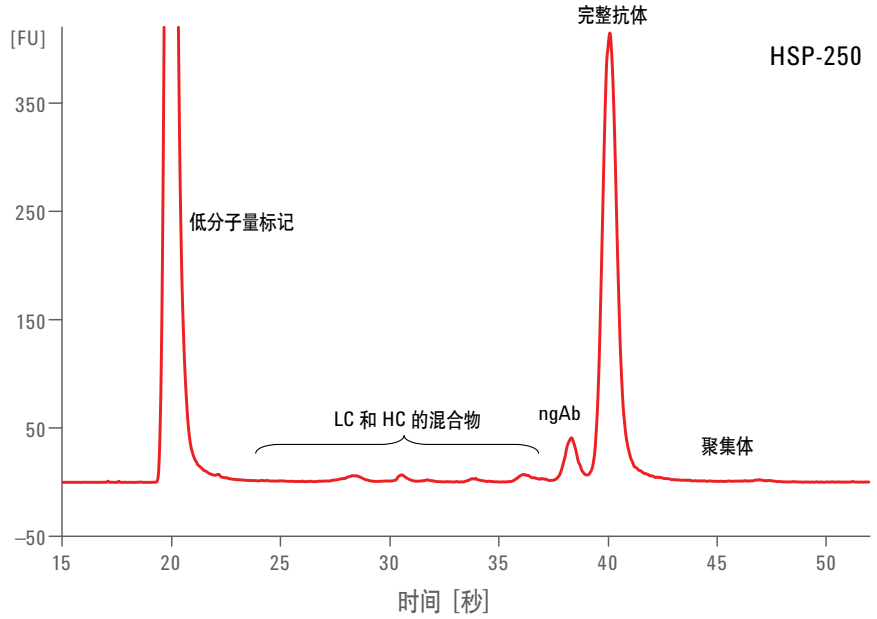
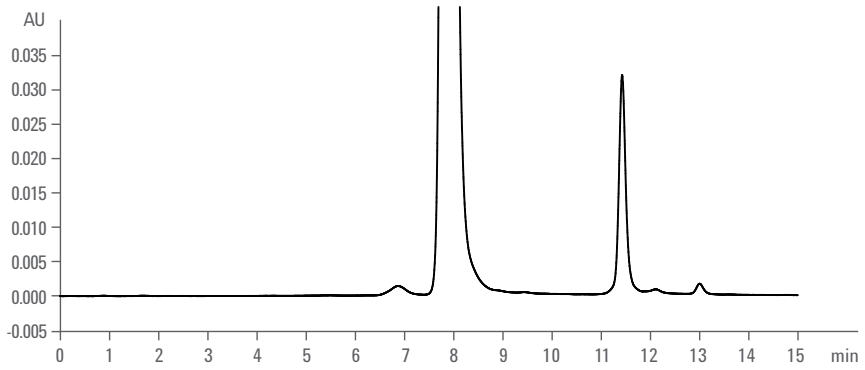


图 1. 在非还原条件下 IgG2 样品的分析；用安捷伦 2100 生物分析仪和高灵敏度 Protein 250 Assay 得到的电泳图。缩写：LC：轻链；HC：重链；ngAb：非糖基化抗体

不对称场流分离 (AF4) 是一种无基质技术，具有很宽的动态分离范围，可用于单克隆抗体聚集体的分离。单体和二聚体峰能完全分离，而且分离速度很快。细胞培养样品可以不经处理直接上样到 FFF 膜，整个分离过程仅仅需要 10 分钟。AF4 的优点是能在很宽的分子量范围内分离可溶性组分和胶体组分。

沉降速度对于测定聚集体和蛋白质构像的均一性和变化，比较不同的蛋白质变异体非常有价值。光散射检测器信号与蛋白质的分子量和其浓度的乘积成正比，所以它经常与体积排阻色谱结合以测定每个峰的分子量。

高效液相色谱 (HPLC) 可以用于生物制品中各组分分子尺寸大小的准确表征，它具有自动化程度高和易操作的优点。体积排阻色谱 (SEC)/ 紫外或光散射检测是蛋白质聚集体检测和定量的主要方式，是通用的质控 (QC/QA) 方法。在体积排阻 (SEC) 分离中，大的蛋白质聚集体先流出，随后依次是蛋白质二聚体、蛋白质单体，以及某些情况出现的称为片段的低分子量组分（更小的降解产物）。这些组分分离的线性范围可达 3 个数量级。为了保证聚集体和降解物的检测，分离度是最重要的。分离通常采用 5 微米粒径的体积排阻色谱柱。更小粒径的色谱柱能提供更高的分离度和更快的分离速度。使用 3 微米粒径的色谱柱，单克隆抗体中活性单体与二聚体的分离度明显改善，从而可以准确地估算污染物的相对含量（图 2）。小粒径柱可以使用比传统的 5 微米粒径柱 (0.5 mL/min) 更高的流速 (1.0 mL/min)，而且基本不影响分离度和柱效。



色谱柱： Bio SEC-3 300 Å, 7.8 x 300 mm
流动相： 150 mM 磷酸盐 , pH7
流速： 1.0 mL/min
柱温： 室温
样品： 单克隆抗体 (10 µL 5 mg/mL)

图 2. 体积排阻色谱分离单克隆抗体样品，单体（第一个峰）、二聚体（第二个峰）和缓冲盐相关的峰（第三个峰）得到了良好的分离，色谱柱采用安捷伦 Bio SEC-3 300-Å，3 µm 粒径

聚集体分析技术汇总

技术	技术描述	优势	不足
SDS-PAGE	电泳槽，丙烯酰胺凝胶，缓冲液和试剂，考马斯亮蓝或银染（蛋白质样品根据各自的大小分离，小蛋白或单体比二聚体和聚集体迁移快）	结果直观，可以观测到蛋白质在胶中的迁移	不能定量
		蛋白质条带可以切下来进行下一步的分析	分辨率低，相似大小的杂质很难分开
			低通量，分析时间很长
基于芯片 (Bioanalyzer) 的蛋白质电泳分析	2100 生物分析仪系统，高灵敏度 Protein 250 试剂盒（包括芯片、荧光标记缓冲液和所有需要的试剂），电泳分离，荧光检测	可以定量分析	目前无法与反应器连接实现实时在线监测
		高分辨分离	无法进行流分收集用于后续分析
		可以区分低分子量杂质、单体、二聚体和大分子的聚集体	
		分析时间比 SDS-PAGE 短	
体积排阻色谱 / 紫外检测 (SEC-LC/UV)	液相色谱系统，体积排阻色谱柱，根据蛋白质分子直径和通过多孔填料的速度进行分离，紫外检测	可以定量	分离窗口限制，不适合同时分离大分子的聚集体和小分子的杂质
		二聚体和聚集体的分离度很高	不能提供质谱信息
		分析时间比 SDS-PAGE 短	
		方法简单，常被用作监测聚集体比例的质控方法	
		可以收集流分，进行下一步的分析	
体积排阻色谱 / 光散射检测 (SEC-LC/Light Scattering)	液相色谱系统，体积排阻色谱柱，根据蛋白质分子直径和通过多孔填料的速度进行分离，紫外和光散射检测联用，光散射检测能得到相对质量信息	可以定量	分离窗口限制，不适合同时分离大分子的聚集体和小分子的杂质
		二聚体和聚集体的分离度很高	
		分析时间比 SDS-PAGE 短	
		方法简单，常被用作监测聚集体比例的质控方法	
		可以收集流分，进行下一步的分析	
		光散射检测可以提供相对质量信息，以及判断是否有色谱柱颗粒脱落	

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-5283EN	采用 Agilent 2100 生物分析仪进行蛋白质分析 —— 蛋白质分析试剂盒概览
5990-6416EN	采用 Agilent 1260 Infinity 生物惰性四元液相系统和 Agilent BioSEC 色谱柱通过体积排阻色谱法进行单克隆抗体表征
SI-02395	采用 ProSEC 300S 色谱柱进行球蛋白的静态光散射分析

氧化

8

已有结果表明酶的氧化修饰会抑制酶的活性。同样，重组蛋白的氧化也可能导致功能丧失。因此在蛋白质药物的开发和生产中，需要对氧化反应进行密切监测，因为它能改变蛋白质药物的生物活性、半衰期和免疫原性。在加工和储存过程中，蛋白质中的氨基酸很容易被氧化，这些氧化必须受到连续监测。蛋白质上某些蛋氨酸残基可能被氧化成蛋氨酸亚砜甚至蛋氨酸砜。蛋氨酸的氧化能导致失活、聚集，以及增加免疫原性。天冬酰胺残基的去酰胺化形成天门冬氨酸和异天门冬氨酸是蛋白质降解的另一个重要原因，尤其在长期储存条件下容易发生。谷氨酰胺残基也能发生去酰胺化，其反应速度比天冬酰胺慢一百倍，很少在重组蛋白中检测到。色氨酸和半胱氨酸也可能发生氧化。

蛋氨酸氧化可以通过质谱或者紫外检测肽段的方式进行测定。包含氧化蛋氨酸的完整蛋白质和未氧化的完整蛋白质可以用离子交换色谱或疏水作用色谱 (HIC) 分离，使用反相盐梯度，即从高到低的盐浓度梯度。天冬酰胺残基很容易去酰胺化，可以用重组蛋白的肽图分析进行鉴定。

一种测定蛋白质药物氧化难易性的方法是强制氧化研究。在这些研究中，将蛋白质暴露在温和的氧化剂中，常见的如过氧化氢或叔丁基过氧化氢 (T-BHP)，以研究可能被氧化的位点和氧化对蛋白质药物活性的影响。在这样的一个研究中，使用安捷伦液相色谱 - 芯片 /QTOF 质谱系统分析了单克隆抗体被过氧化氢氧化的产物；采用 BioConfirm 软件找出了单克隆抗体质量数的变化 (图 1)。随后对胰蛋白酶酶解生成的肽段进行 MS 和 MS/MS 分析，鉴别出了氧化修饰的位点 (图 2 和 3)。更重要的是，还需要测定氧化的程度和速率，液质联用在这方面是很有价值的工具。采用安捷伦 6520 Q-QTOF 液质联用系统得到了出色的分离度和高度精确的肽段质量数，从而能够准确识别氧化肽段峰在单克隆抗体序列中的位置。MS/MS 分析通过精确定位肽段中的氧化修饰位点，提高了肽段序列匹配的可信度。

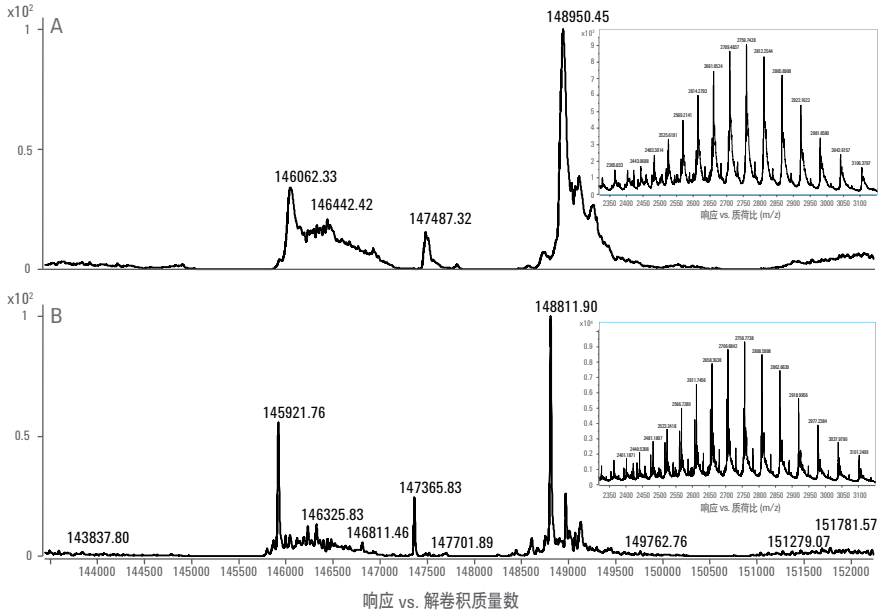


图 1. 完整抗体的解卷积质谱图（插图为完整抗体的质谱图）。(A) 氧化修饰的单克隆抗体；(B) 未修饰的单克隆抗体

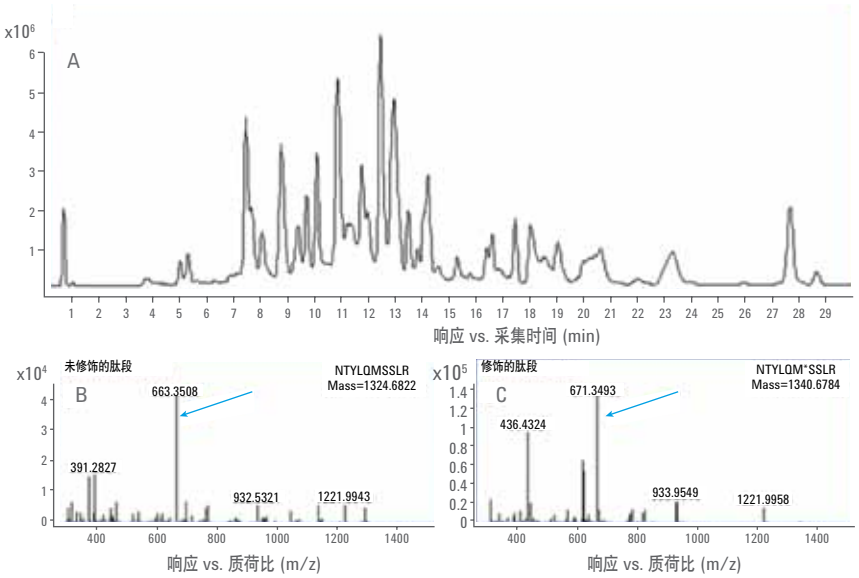


图 2. (A) 过氧化氢氧化处理的单克隆抗体的酶解物的总离子流图 (TIC)，采用 C18 液相色谱芯片。图中箭头指示为 (B) 未修饰的肽段；(C) 修饰的肽段

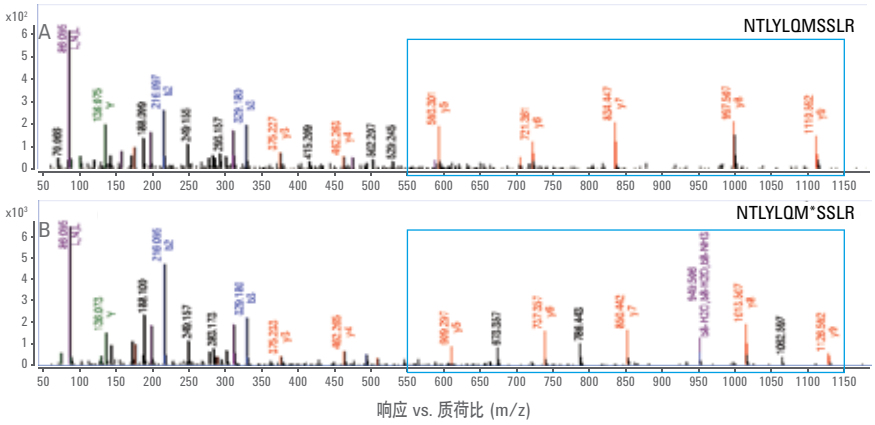


图 3. (A) 未修饰的和 (B) 修饰的肽段的代表性 MS/MS 质谱图；使用 BioConfirm 软件进行序列匹配。蓝框里显示了未修饰和修饰肽段（含有氧化的蛋氨酸）之间的 MS/MS 谱对比（y5 至 y9 离子），差异约 16Da

氧化分析技术汇总

技术	技术描述	优势	不足
疏水反应色谱 / 紫外检测 (HIC-LC/UV)	配置疏水反应色谱柱 (HIC) 的液相色谱系统，采用递减的盐梯度利用疏水性差异进行氧化和非氧化蛋白质的分离，紫外检测	提供氧化与非氧化蛋白的比例信息	无法进行质量验证或者提供氧化位点信息
		快速和简单的 QA/QC 方法用以监控氧化状态	
完整蛋白质的液质分析 (Intact LC/MS)	带反相色谱柱的液相色谱系统，通过不断增加的有机相梯度利用疏水性差异进行氧化和非氧化蛋白质的分离，质谱检测	用精确质量数鉴定氧化蛋白质	不能提供氧化的位点信息
		通常用于 QA/QC 过程中发现的蛋白质氧化问题的确认和验证	由于方法复杂，相比 HIC-LC/UV 不太适用于 QA/QC
酶解+液质分析	酶解，最常用的酶是胰蛋白酶，蛋白质酶解成肽段，用反相色谱柱分离，通过不断增加的有机相梯度利用疏水性差异进行氧化和非氧化蛋白质的分离，质谱检测	与完整蛋白质的液质分析结合，可以鉴别氧化形式和位点，可进行 MS/MS 确认	由于方法复杂和分析时间长，因此一般不用于 QA/QC
		通常用于 QA/QC 过程中发现的蛋白质氧化问题的确认和验证	

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-8768EN	采用 Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS 系统和精确质量 6520 Q-TOF LC/MS 联用进行单克隆抗体氧化位点鉴定
5990-8769EN	采用 Agilent 1260 Infinity HPLC-Chip/MS 系统和精确质量 6520 Q-TOF LC/MS 联用进行单克隆抗体氧化位点定量

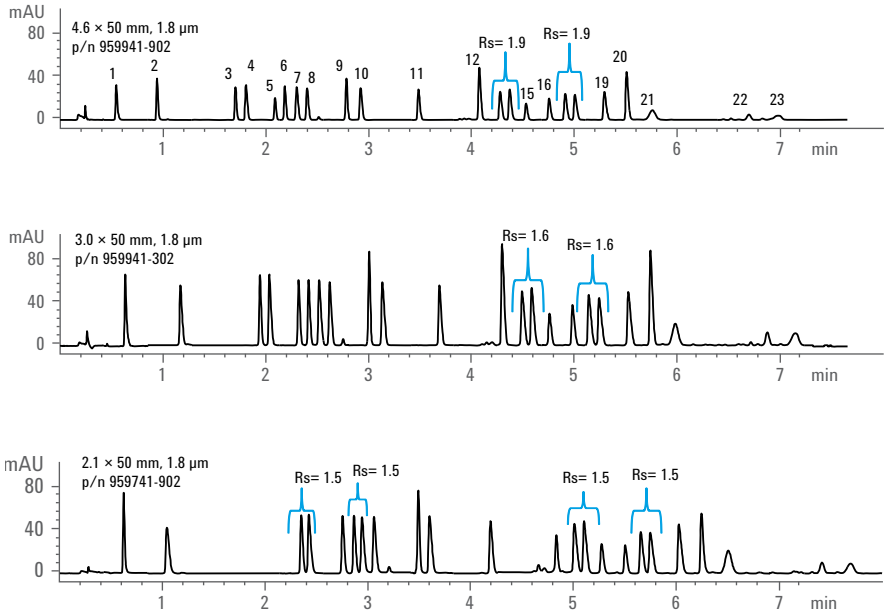
9 氨基酸分析

每个蛋白质或多肽都具有特定的氨基酸序列，即氨基酸组成。因此氨基酸组成分析可作为蛋白质或多肽的鉴定方法。氨基酸分析用于从药物发现到生产的整个过程，以确保批次之间的相似性和一致性。它也经常被用于确定裂解蛋白质所用的蛋白酶的种类。氨基酸分析也是精确测定蛋白质含量的常用工具。

氨基酸分析涉及四个基本步骤，首先是将蛋白质酸解为独立的氨基酸。接着对氨基酸进行标记以使它们适合紫外或荧光检测。然后对衍生化的氨基酸进行色谱分离。最后根据标记物的强度测定每个氨基酸的相对含量。

一个理想的氨基酸定量分析应当具备快速、灵敏的衍生化手段和分析技术。安捷伦 1260 Infinity 或者 1290 Infinity 液相色谱系统和安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 柱可以满足这些要求，采用邻苯二甲醛 (OPA) 衍生化伯氨基酸，9- 芴甲酸 (FMOC) 衍生化仲氨基酸；完成自动的在线衍生化后，进行可靠的液相色谱分析。该系统可以快速、准确、灵敏和高重现地完成氨基酸分析。

邻苯二甲醛 (OPA) 和 9- 芴甲酸 (FMOC) 结合可以进行快速的氨基酸柱前衍生化和色谱分析。首先用 3- 巯基丙酸 (3-MPA) 使得伯氨基酸与邻苯二甲醛 (OPA) 反应。仲氨基酸不与邻苯二甲醛 (OPA) 反应，但随后被 9- 芴甲酸 (FMOC) 衍生化。使用安捷伦自动进样器可以自动、快速地完成衍生化过程。自动化操作能获得很好的重复性。样品分析周期为 14 分钟 (其中 10 分钟是分析时间)，使用安捷伦 50 mm 长的 ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 µm 色谱柱 (图 1)。这个方法对于先流出的两个氨基酸 (天门冬氨酸和谷氨酸) 具有很好的保留，对于几个流出位置很近的氨基酸也有很好的分离度 (取决于色谱柱配置)。



1. 天门冬氨酸
2. 谷氨酸
3. 天冬酰胺
4. 丝氨酸
5. 谷氨酰胺
6. 组氨酸
7. 甘氨酸
8. 苏氨酸
9. 精氨酸
10. 丙氨酸
11. 酪氨酸
12. 半胱氨酸
13. 缬氨酸
14. 蛋氨酸
15. 正缬氨酸
16. 色氨酸
17. 苯丙氨酸
18. 异亮氨酸
19. 亮氨酸
20. 赖氨酸
21. 羟脯氨酸
22. 肌氨酸
23. 脯氨酸

图 1. 50 mm 长的安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18, 1.8 µm 色谱柱分析氨基酸

氨基酸分析技术汇总

技术	技术描述	优势	不足
邻苯二甲醛 (OPA) 衍生化 + 反向液相色谱 / 紫外检测 (RP-LC/UV)	反相液相色谱，用邻苯二甲醛衍生化伯氨基酸，采用递增的有机溶剂梯度进行洗脱	可对伯氨基酸进行分离和定量分析 可以将液相色谱与生物反应器连接，实现实时分析	没有氨基酸质量数信息，根据标准保留时间和浓度进行定性定量分析
9- 芴甲酸 (FMOC) 衍生化 + 反向液相色谱 / 紫外检测 (RP-LC/UV)	反相液相色谱，用 9- 芴甲酸 (FMOC) 衍生化仲氨基酸，采用递增的有机溶剂梯度进行洗脱	可对仲氨基酸进行分离和定量分析 可以将液相色谱与生物反应器联用，实现实时分析	没有氨基酸质量数信息，根据标准保留时间和浓度进行定性定量分析
衍生化 + 反相液相色谱 / 质谱检测 (RP-LC/MS)	反相液相色谱，用邻苯二甲醛 (OPA) 或 9- 芴甲酸 (FMOC) 衍生化伯氨基酸或仲氨基酸，采用递增的有机溶剂梯度进行洗脱，缓冲液置换后可用质谱检测	可对仲氨基酸进行分离和定量分析 质谱检测更有利，可以通过质量数对伯氨基酸和仲胺基酸进行确认	可能需要改变液相的流动相缓冲盐，以适合质谱分析 质谱法不是常用的氨基酸分析的 QA/QC 方法

安捷伦应用文献

出版号	题目
5990-4547EN	安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱用于多种安捷伦液相色谱系统和多种分离目标，实现改善的氨基酸分析方法
5990-5977EN	采用带预柱衍生化的 HPLC 方法实现 2 种含硫氨基酸和其他 17 种氨基酸的分离
5990-3283EN	采用带自动衍生化的 HPLC 方法和吸光度检测快速精确地测定细胞内氨基酸流出速率
5989-6297CHCN	用 1.8 µm 反相 (RP) 色谱柱进行快速氨基酸分析 (AAA)
5980-1193CHCN	快速、准确、灵敏、重复的 HPLC 氨基酸分析方法

更多信息

了解更多信息，请访问：

www.agilent.com/chem/biopharma

在线购买：

www.agilent.com/chem/store:cn

查找当地的安捷伦客户服务中心：

www.agilent.com/chem/contactus:cn

安捷伦客户服务中心：

免费专线：800-820-3278
400-820-3278（手机用户）

联系我们：

customer-cn@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/quote:cn

安捷伦科技大学：

http://www.agilent.com/chem/university

浏览和订阅 Access Agilent 电子期刊：

www.agilent.com/chem/accessagilent:cn

只可用于研究目的。本文中的信息、描述和指标如有变更，恕不另行通知。安捷伦不对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失承担任何责任。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2011
2011 年 8 月 8 日，中国印刷
5990-8561CHCN

Agilent Technologies