

• 综 述 •

全柱成像毛细管等电聚焦电泳技术在重组蛋白疫苗电荷异质性分析中的应用*

陈全姚^{1,2}, 杜加亮²综述, 刘万卉^{1△}, 王 兰²审校

1. 烟台大学药学院, 山东烟台 264005; 2. 中国食品药品检定研究院单克隆抗体产品室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629

摘 要: 重组蛋白分子表征的稳定性是保证疫苗发挥免疫原性及抗原性的关键。重组蛋白疫苗与治疗性蛋白制品一样, 因体外合成和纯化过程的复杂性而表现出异质性。其中, 电荷异质性是重组蛋白质的关键质量属性之一。电荷异质性监测有助于推动生产工艺的优化, 反映产品生产的一致性和稳定性等, 对保证重组蛋白产品的安全和质量至关重要。开发可靠快速、灵敏稳健的电荷异质性分析方法一直是生物制药行业所追求的目标。经典的电荷异质性分析方法主要有离子交换色谱(IEC)、毛细管区带电泳(CZE)以及全柱成像毛细管等电聚焦电泳(WCID-CIEF)等, 其中 WCID-CIEF 提供的等电点(pI)和峰形的生化指纹有助于对疫苗多蛋白成分的分析。基于以上该文将对 WCID-CIEF 的原理和特点及其在重组蛋白疫苗质量控制中的应用进行概述。

关键词: 电荷异质性; 重组蛋白疫苗; 质量控制; 全柱成像毛细管等电聚焦电泳

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2023. 21. 017 **中图法分类号:** R917

文章编号: 1673-4130(2023)21-2643-06 **文献标志码:** A

Application of whole-column imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis in charge heterogeneity analysis of recombinant protein vaccines*

CHEN Quanyao^{1,2}, DU Jialiang², LIU Wanhui^{1△}, WANG Lan²

1. School of Pharmacy, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China; 2. Division of Monoclonal Antibody Products, National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Beijing 102629, China

Abstract: Recombinant protein vaccine is a kind of therapeutic protein, the recombinant protein products usually exhibit heterogeneity due to the complex in vitro synthesis and purification processes. Charge heterogeneity is a critical quality attributes of recombinant proteins. Charge heterogeneity monitoring helps to promote the optimization of the production process and reflect the consistency and stability of product production, which is essential to ensure the safety and quality of recombinant protein products. Developing a reliable, high-specificity, high-sensitivity and robust analysis method for analyzing charge heterogeneity has always been the goal pursued by the biopharmaceutical industry. Classical methods for analyzing charge heterogeneity mainly include ion exchange chromatography (IEC), whole-column imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis (WCID-CIEF) and capillary zone electrophoresis (CZE). WCID-CIEF is a reliable and high-sensitivity analytical method, the isoelectric point (pI) values and peak provided by WCID-CIEF can be used as biochemical finger prints to facilitate the analysis of various protein components in vaccines. Therefore, the principle and characteristics of WCID-CIEF and the application of WCID-CIEF in quality control of existing recombinant protein vaccines will be introduced in this review.

Key words: heterogeneity; recombinant protein vaccines; quality control; whole-column imaging capillary isoelectric focusing electrophoresis

随着气候、生态和社会环境变化带来的影响以及耐药等一系列问题的出现, 全球将持续面临新传染病突发和已有传染病恶化的风险挑战^[1]。在应对传

病方面, 有效的防控策略和疫苗接种仍是阻止传染病持续发展的有力措施。2022 年 7 月 8 日世界卫生组织(WHO)公布全球新型冠状病毒疫苗候选物名单

* 基金项目: 国家科技重大专项课题(2019ZX09732-002); 中国食品药品检定研究院学科带头人课题(2023X2)。

△ 通信作者, E-mail: wanhui@luye.com。

中,重组蛋白疫苗[包括蛋白亚单位和病毒样颗粒(VLP)]在临床阶段的和临床前阶段的疫苗候选物中分别占 36%和 48%。由公布的信息可见重组蛋白疫苗是在研新型冠状病毒疫苗中个数最多的疫苗种类,值得注意的是除了新型冠状病毒疫苗外,2020 年全球 10 大疫苗品种中有 8 个是重组蛋白疫苗,由此可见,重组蛋白疫苗仍是未来疫苗的研发重点。

基于质量源于设计的理念共识,重组蛋白疫苗也应像其他生物制品一样采用先进的分析手段,从物理化学、免疫学、生物学等角度进行全面的分析,并提供尽可能详细的表征信息以反映目标产品内在的天然质量属性^[2]。已有研究显示,电荷异质性和等电点(pI)监测可用于多种不同类别疫苗的鉴别和工艺稳定性研究。在国内外生物制品的电荷异质性研究中,全柱成像毛细管等电聚焦电泳(WCID-CIEF)检测 pI 已广泛应用于单克隆抗体、抗体偶联药物、重组蛋白、疫苗和活病毒等方面,WCID-CIEF 与离子交换色谱(IEC)共同作为生物制药行业研发和质量控制中分析电荷异质性的方法。本文拟对 WCID-CIEF 的原理和特点及其在重组蛋白疫苗的质量控制中的应用进行概述。

1 重组蛋白疫苗

治疗性蛋白质的研发历史大致如下:一是使用血浆及血浆制品来治疗疾病;二是关于重组治疗性蛋白质的研究,例如重组胰岛素、生长因子和单克隆抗体;三是关于重组蛋白疫苗的研究,即利用重组技术生产的蛋白质抗原代替传统的减毒活病毒或者是完全灭活的细菌或病毒作为疫苗的免疫原^[3]。重组蛋白疫苗系指利用基因重组技术将编码病原微生物保护性抗原的基因重组到细菌、酵母或细胞中后,经过培养、增殖、提取、纯化所表达的保护性抗原而制成的疫苗。但由于在体外合成纯化,重组蛋白难以保持天然构象表位,从而诱导的免疫反应较弱,必要时需寻找合适的免疫佐剂或是接种多针以达到免疫效果,此外重组蛋白也有引起抗体免疫增强的风险^[4]。

2 重组蛋白疫苗的质量评价

与一般药品不同,疫苗的用途主要在于预防疾病,接种人群是健康人群。我国将疫苗划分为两类,其中第一类包括所有国家级计划免疫疫苗,由政府进行管理并免费向 14 岁以下儿童提供,尽管及时接种第一类疫苗并非强制性,但其被视为一项与公众健康息息相关的社会责任^[5-6]。正因疫苗的用途特殊性以及受众广泛性,疫苗必须被证明是安全有效和质量可控的,政府和公众对疫苗的安全与质量有着更高的要求^[5-6]。

重组技术生产蛋白质是一个复杂的生物合成过程,蛋白质产物通常会表现出异质性,并且蛋白质大分子自身结构也很复杂。重组蛋白的生产过程中会

引入杂质及污染物,杂质包括宿主细胞相关杂质、过程相关杂质和产品相关杂质;污染物则主要为热原、病毒和微生物等。这些潜在的杂质和污染显著影响甚至决定着重组蛋白制品的安全性、质量以及效力,需要采取合适的方法对杂质加以控制和消除^[7-8]。

3 重组蛋白疫苗的电荷异质性

在重组蛋白生产、运输和储存等各个环节中引发的化学或物理变化会引起异质体的产生,而异质体被定义为产品相关杂质还是产品变体则取决于与目标产品的性质是否一致,例如溶解度、体内外稳定性、药代动力学性质以及免疫原性等性质^[7]。这些物理和化学变化极大地影响着蛋白产物的表面电荷,化学变化为共价变化,包括氨基酸序列变异以及包括糖基化、脱酰胺、氧化和水解等在内的各种翻译后修饰;物理变化则为聚集、沉淀和变性的非共价变化^[7-8]。这些种种变化可综合表现为重组蛋白的电荷异质性,由此产生的不同电荷异构体对重组蛋白制品的生物学活性、稳定性和免疫原性都有不同影响^[9-10]。因此在重组蛋白制品的质量控制中有必要对电荷异质性加以关注。

4 电荷异质性分析的优势以及分析方法

4.1 电荷异质性分析的意义 一方面,电荷异质性分析有助于推动生产工艺的优化,通过改进工艺参数以减少变异体的产生。另一方面,监测重组蛋白的电荷变异体水平能够保持产品的批间一致性、反映生产工艺和生产流程的变化与规范与否,从而保证重组蛋白产品是安全有效和质量可控^[7,9]。在生物制药工业中,监测、定量分析和表征重组蛋白的电荷异质性是生物制药产品开发的重要组成部分,需要开发快速稳健的电荷异质性分析方法以支持的产品释放和稳定性研究以及制剂开发和其他表征研究^[11-12]。

4.2 电荷异质性的分析方法 目前分析生物药物电荷异质性的经典方法主要有 IEC 和等电聚焦法(IEF),可用于监测蛋白质电荷异质性以评估产品的质量和批间一致性以及提供蛋白质的稳定性和纯度信息^[11-12]。基于毛细管电泳的三种技术,毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦电泳(cIEF)以及 WCID-CIEF 也是分析生物制品电荷异质性的方法^[13]。此外,反相高效液相色谱(RP-HPLC)、液相色谱质谱联用(LC-MS)^[10]等也可用作电荷异质性分析的手段。

IEC 根据蛋白分子表面电荷的差异分离蛋白质。分离取决于蛋白质与固定相的相互作用,离子交换色谱法有盐梯度分离和 pH 分离两种分离模式,其分离度良好^[14]。在治疗性蛋白质表征中,离子交换色谱法可对不同氨基酸变体、不同糖型修饰、水解或其他修饰的蛋白质变体进行分离回收,进一步联合质谱细化表征和鉴别^[14-15]。IEC 是蛋白质分离纯化时去除杂

质的首选方法,其分析过程可以维持蛋白药物原有的空间结构,保持药物的生物学活性和功能^[9],是重组蛋白制品质量控制与分析的重要手段。相较于 cIEF 等技术,IEC 方法也存在一些局限性,比如方法开发耗时、分辨率较低、难以保证变异体的高度分离、不稳健且试剂耗材成本高等问题^[14]。

毛细管区带电泳(CZE)根据分析物的净电荷和流体动力学半径进行分离,其优点是简便快速,分辨率也较高。MORITZ 等^[12]对毛细管区带电泳用于分析生物制品电荷异质性进行了评估,结果表明毛细管区带电泳可用于分析 pI 范围为 7.4~9.5 的蛋白质。

IEF 是依据待测物 pI 不同从而在 pH 梯度中得以分离的一种高分辨率的生物化学分离技术^[9,16]。传统的 IEF 平板凝胶技术,由于操作耗时复杂且无法提供准确的定量信息,已逐渐被取代。cIEF 是以毛细管作为分离通道进行的等电聚焦电泳,其运行流程为:将样品与两性电解质混匀充进毛细管,外加电压运行,两性电解质在毛细管内形成 pH 梯度,当样品不同组分迁移至相应等电点位置时,便停止迁移而产生分离聚焦,被分离样品迁移至检测窗口而被检测^[13]。相比于传统凝胶或 IEC, cIEF 具有可定量分析、分析速度快、操作简便、样品试剂消耗少、分辨率更高和环保等优点。但是 cIEF 在聚焦完成后需要一个额外的移动过程,把完成分离聚焦的蛋白推动到检测器进行单点检测,这一过程会造成检测时间延长、蛋白可能发生沉淀、pH 梯度失真以及由于移动速度不均衡而导致分辨率下降的问题^[16],从而影响检测的重现性。

WCID-CIEF 采用的是短毛细管柱,通过对整个毛细管柱进行实时扫描成像,克服了 cIEF 移动检测过程所带来的缺点,使得检测时间显著缩短,方法开发时间也更短。WCID-CIEF 的重现性体现在两个方面:一是相应 pI 值的柱内位置,二是定量的峰高或峰面积。基于实时成像检测的优势和采用 pI 标志物来定位蛋白质峰之间的相对位置,WCID-CIEF 可实现高重现性且相对标准偏差可控制在 0.1% 范围内^[16]。在检测方面,WCID-CIEF 检测采用通用性强的紫外可见光吸收检测器和灵敏度最高的激光诱导荧光成像检测器,高灵敏度的荧光成像模式使得 WCID-CIEF 非常适用于低浓度样品分析和免疫分析^[16]。

WCID-CIEF 的毛细管涂层常采用线性聚丙烯酰胺进行化学涂覆,或是采用氟碳化合物进行物理涂覆,氟碳化合物涂覆更坚硬,可长期使用,毛细管涂层的主要作用是消除电渗流以及减少溶质吸附^[16-17]。但在实际过程运行中,毛细管涂层随使用次数的增加会有磨损导致电渗流增大,而蛋白质等大分子物质因为具有更多的结合位点更易于发生不均匀的管壁吸附,造成迁移速率不均匀和检测峰变化^[18]。

综上所述,各种分析方法在分析蛋白的电荷异质

性方面各有优势,在具体分析时应根据需求选择合适的方法,也可采用不同方法进行相互验证以保证分析结果的准确可靠性。考虑到方法开发快速、操作简便、可自动化以及高分辨率的需求,WCID-CIEF 与 CZE 比 IEC 更具优势,但只有 WCID-CIEF 才能提供准确精密的 pI 值测定^[19]。一般而言,CZE 的电泳迁移率值可应用于生物表征分析以及在纯化过程中监测蛋白纯度,而 WCID-CIEF 提供的蛋白 pI 值和峰形可以用作生化指纹用以证明生物产品的一致性,可用于蛋白鉴别、稳定性监测以及蛋白表征^[15]。以下部分将主要对 WCID-CIEF 在不同重组蛋白质疫苗的质量评价中的应用进行介绍。

5 WCID-CIEF 在重组蛋白疫苗质量评价中的应用

5.1 人乳头瘤病毒(HPV)样颗粒(HPV-VLP)疫苗

HPV 属于 DNA 病毒,其基因组长度约为 7~8 kb,主要可分为编码不同蛋白的早期区、晚期区和非编码区,其中病毒的衣壳结构蛋白 L1 和 L2 主要由晚期区基因所编码。病毒颗粒中 L2 含量少,但对病毒的组装和感染具有重要作用。5 个 L1 即可构成五聚体的基本结构,72 个五聚体进一步组装成二十面体的对称结构,也称之为 VLP,基于 L1 的 VLP 是目前上市的预防性疫苗的主要抗原成分^[20-21]。

ZHOU 等^[22]首次利用了 WCID-CIEF 测定了 10 种类型的重组 HPV-VLP(16L1、18L1、6L1、11L1、58L1、31L1、33L1、45L1、52L1 和 58L1)的 pI 值,并对检测条件进行了优化,最终检测条件为:(1)两性电解质使用 4% Pharmalyte pH 3~10;(2)2 mol/L 尿素作为稳定剂;(3)最佳 HPV-VLP 检测浓度为 0.2 mg/mL;(4)甲基纤维素最佳浓度分别为 0.35% 和 1.00%;(5)最佳盐浓度为 5 mmol/L NaCl;(6)聚焦时间为 1 500 V 1 min 和 3 000 V 3 min。经过方法验证,该方法具有良好的重现性和分辨率。实验结果显示 10 种重组 HPV-VLP 的实测 pI 值与理论 pI 值相差在 0.05~0.95 之间。一般来说结构较简单的蛋白质的理论 pI 与实测 pI 差值一般在 0.5 以内,但 VLP 结构复杂且相对分子质量高达千万级,因此实测 pI 的波动范围也就更大。虽然如此,WCID-CIEF 获得的 pI 值和指纹图谱仍有希望应用于疫苗生产过程的质量控制中的表征、鉴定和放行以及疫苗的稳定性研究等。

ZHOU 等^[22]同时采用 WCID-CIEF 对解聚组装前后的 VLP 进行了 pI 测定,结果显示解聚重组装过程会导致 HPV-VLP 实际 pI 值发生变化。这也为在纯化过程中采用解聚重组装工艺以获得结构均一 VLP 提供了依据^[23]。MACH 等^[24]也发现在酵母系统中表达的 HPV L1 蛋白形成的 VLP 颗粒与基因型相关,HPV 18L1 蛋白倾向于组装形成均匀的直径为 60 nm 的 VLP,其稳定性更好,而 HPV 6、11 和 16L1

蛋白倾向于形成直径为 30~50 nm 的不规则颗粒,研究显示这类 HPV-VLP 具有免疫原性,并且相对于 18 型 VLP 保质期更短,通过调整离子浓度与 pH 的方法,使得这类 HPV-VLP 解聚后自发组装成均匀的 60 nm VLP,改善了免疫原性与稳定性。

5.2 诺如病毒(NoV)样颗粒(NoV-VLP)疫苗

NoV 是具有高度传染性的 RNA 病毒,婴幼儿、老年人与免疫功能低下者易感染,引起严重腹泻或急性肠胃炎,死亡率高。NoV 基因组全长约 7.6 kb,可分为 3 个开放读码框(ORF),其中 ORF2 编码病毒的主要衣壳蛋白 VP1,目前人诺如病毒(HuNoV)的基因分型主要也是依据 ORF2 的序列不同而分,NoV 不同基因组之间常发生重组而产生新的变体,变异性高,因此开发多价疫苗更能有效预防疾病发生^[25-26]。已有研究发现,重组 NoV 的主要衣壳蛋白 VP1 可在某些表达系统中可自组装成为 VLP,基于此研发了 NoV-VLP 疫苗。

GOODRIDGE 等^[27]于 2004 年提出采用灵敏度更高、更快捷的 WCID-CIEF 检测病毒的 pI 值来代替常规电子显微镜以及 PCR 法诊断疾病。该实验采用了高纯度的 VLP 以及试剂,证明了 WCID-CIEF 具有检测 NoV-VLP 的能力。研究结果表明,即使在同一基因组内,不同基因型的 NoV-VLP 的实测 pI 值与理论 pI 值差异的变异范围也很大(0.1~1.7)。在最近的一项研究中,DU 等^[26]也采用 WCID-CIEF 检测了构成候选多价疫苗的四个不同基因组和基因型的 HuNoV-VLP(G I.1、G II.3、G II.4 和 G II.17),使用 8 M 尿素将 VLP 分解为单体 VP1 蛋白以进行电泳指纹图谱分析。结果显示体外表达的 VP1 蛋白经翻译后修饰具有丰富的电荷异质性,不同的基因组和基因型的病毒颗粒具有显著不同的可重现的谱图特征,并且过期 HuNoV VLP 的指纹图谱发生了显著变化。以上研究均支持将 WCID-CIEF 作为一项新的检测手段,用于 NoV 及 VLP 疫苗的检测、鉴别以及稳定性研究,以消除遗传多样性对 NoV 检测的遗传或免疫学方法的阻碍。

5.3 肠病毒 71 型病毒样颗粒(EV71-VLP)疫苗 肠病毒 71 型(EV71)属于小 RNA 病毒,是手足口病的主要致病病原体之一,感染后常并发神经功能障碍,5 岁以下幼儿易感染而引发严重疾病甚至有可能导致死亡^[28]。EV71 直径在 25 nm 左右,形状为 20 面体,拥有约 7 500 个核苷酸的单链 RNA 基因组,由一个单链开放阅读框(ORF)组成,ORF 可被分为 P1、P2 和 P3 区并表达为一个大的多聚蛋白可,其中 P1 区编码四种结构蛋白 VP1~4。水解酶 3D 将多聚蛋白水解成 VP0、VP1、VP3,这 3 种结构蛋白可自发组装形成晶体病毒样颗粒。其中 VP0 在病毒衣壳蛋白与病毒核酸组装形成新病毒颗粒后被诱导加工为 VP2 和

VP4^[28-29]。

王文伟等^[30]建立了一种采用 WCID-CIEF 测定重组人 EV71-VLP 等电点的方法,主要对聚焦时间以及尿素浓度进行了优化,并对方法进行了验证。最终选择不添加尿素以及聚焦时间为 1 500 V 1 min 和 3 000 V 5 min。方法经验证,专属性、准确度、重复性和中间精密度均良好,重组人 EV71-VLP 的实测 pI 值为 6.46,与理论 pI(6.08)相差 0.38,基本一致。表明该方法可作为 EV71-VLP 疫苗质量评价的有效手段。

5.4 乙型肝炎病毒(HBV)疫苗 HBV 是传染性强的 DNA 病毒,持续携带病毒者会有发展为慢性肝病、肝硬化和肝癌的可能。HBV 是直径为 42 nm 的包封球体,表面抗原嵌在磷脂包膜上,遗传物质被核衣壳蛋白包裹在磷脂膜内,其基因组长度为 3.2 kb。1986 年世界上第一种人用重组亚单位 HBV 疫苗被批准使用,重组 HBV 疫苗的主要抗原成分是 HBsAg,一种碱性脂质结合表面蛋白,在酵母表达系统中,约 100 个 HBV 表面抗原(HBsAg)可自组装成一个直径为 22 nm 的 VLP^[15,31]。

RUSTANDI 等^[15]于 2014 年首次使用成像毛细管等电聚焦电泳来表征 HBsAg 产品。HBsAg 的理论 pI 为 8.2,但由于磷脂的存在(约占 20%),实测 pI 值会偏小,预测的实测值会接近 2.6。该研究通过添加酸性阻滞剂磷酸以及改变阻滞剂浓度、调整两性电解质比例和聚焦时间来优化方法,最终确定的条件为:12 mmol/L H₃PO₄ 作为酸性阻滞剂;两性电解质组合为 Servalyt 2-4、Servalyt 4-7 和 Pharmalyte 2.5-5;尿素终浓度为 6 mol/L;pI 标志物分别为 3.59、4.65。后续该方法又被用来表征 HBsAg-VLP 参比标准品在 3 种不同配方缓冲液中经过多次冻融循环后的稳定性,选出了可提供最佳稳定性的配方,并将结果与毛细管区带电泳所得结果对比,结果一致。

5.5 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 型(SARS-CoV-2)蛋白亚单位疫苗 2019 年末全球爆发一种未知冠状病毒感染导致的严重呼吸道传染疾病,后该病毒病原体被命名为 SARS-CoV-2,是第 7 种可感染人类的冠状病毒,为单股正链 RNA 包膜病毒^[32-33]。冠状病毒表面暴露的跨膜结构 S 糖蛋白介导病毒感染细胞。S 蛋白为同源三聚体,包含两个功能亚单位 S1 和 S2。S1 暴露在外并含有受体结合域(RBD),RBD 可结合靶细胞上表达的血管紧张素转换酶 2(ACE2)受体。S2 锚定在病毒内,可促进病毒与细胞的融合^[32,34-35]。SARS-CoV-2 的 S 蛋白大小为 180 × 10³~200 × 10³,总长度在 1 273~1 300 个氨基酸之间^[36]。S 蛋白是治疗病毒感染疾病时药物开发和疫苗设计的重要蛋白。针对 SARS-CoV-2 所开发的疫

苗有病毒载体疫苗、核酸疫苗、灭活疫苗以及以 S 蛋白和 RBD 为抗原的重组亚单位疫苗。如前所述,重组蛋白疫苗占比超过 1/3。

FINJA 等^[37]采用 WCID-CIEF 测定了几种商业化的 SARS-CoV-2 相关蛋白的 pI 值,包括带有 His 和 Fc 标记的 RBD、带有 His 标记的 S1 亚基、带有 His 标记的 S1/S2 亚单位。研究结果显示,虽然由于异构体的存在导致每个蛋白显示出多个峰形,但是其 pI 的实验测定范围都能覆盖理论 pI 值。本实验室最近也利用 WCID-CIEF 技术对一种基于 RBD 三聚体的候选 SARS-CoV-2 疫苗进行了电荷异质性分析^[38]。通过优化实验条件,充分展示了三聚体 RBD 天然形态的电泳指纹图谱,并且通过不同批次、加热稳定性、不同酸碱条件、不同氧化程度的研究,证明 WCID-CIEF 指纹图谱可用于鉴定、批次间一致性评估,以及该候选疫苗的稳定性研究,作为质量控制策略的一部分。除此之外, pI 的应用也可以对 SARS-CoV-2 不同变异株进行定性鉴别^[39]。

6 总 结

管壁吸附和聚焦不稳定影响检测重复性是限制毛细管电泳技术扩大应用范围的主要问题,对疫苗来说尤其如此,因为疫苗的抗原成分更为复杂,不同的疫苗种类所涉及的成分结构和稳定性也各不相同。尽管如此,毛细管电泳技术在微生物和疫苗领域的研究一直在继续,在产品表征、生产过程控制和质量监测方面毛细管电泳技术得到了越来越多的应用^[40-42]。目前重组蛋白疫苗的研发在我国仍处于发展早期,相关研发和质量控制技术仍需积极跟进国际先进水平。一方面,在研发初期,应结合多种方法对蛋白疫苗电荷变异体逐步进行完整的分离鉴定和表征,严格评估变异体与主成分的性质是否一致,以及变化的影响程度以及免疫原性等,以确定变异体是否作为杂质处理控制。另一方面,在质量控制阶段,采取自动化、快速和高分辨率的方法来监测产品的生产一致性和稳定性更加合适。成像毛细管等电聚焦电泳提供的疫苗蛋白 pI 值和峰形的生化指纹有助于对疫苗的多种蛋白成分进行定性分析,荧光检测模式也有助于对低浓度蛋白进行分离分析。此外,成像毛细管等电聚焦电泳所具有的高分辨率和高灵敏度优势是液相色谱所没有的,将其与质谱进行联用来进一步分析蛋白的电荷异质性一直是毛细管电泳研究的热门方向,微芯片技术解决了成像毛细管等电聚焦电泳与质谱相连分辨率变差的问题^[43]。基于成像毛细管等电聚焦电泳的以上优势以及与质谱联用技术的不断发展,WCID-CIEF 在重组蛋白疫苗电荷异质性研究方面具有良好的应用前景。

参考文献

[1] CUNNINGHAM A A, DASZAK P, WOOD J L N. One

- Health, emerging infectious diseases and wildlife: two decades of progress? [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2017, 372(1725): 20160167.
- [2] SAKURAI A, OGAWA T, MATSUMOTO J, et al. Regulatory aspects of quality and safety for live recombinant viral vaccines against infectious diseases in Japan [J]. *Vaccine*, 2019, 37(43): 6573-6579.
- [3] OHTAKE S, ARAKAWA T. Recombinant therapeutic protein vaccines [J]. *Protein Pept Lett*, 2013, 20(12): 1324-1344.
- [4] 耿淑帆, 吴丹, 余文周. 新型冠状病毒重组蛋白疫苗研发进展 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2020, 26(6): 718-724.
- [5] 郭中平. 我国疫苗质量标准的回顾与现状分析 [J]. *中国药事*, 2012, 26(8): 795-800.
- [6] ZHENG Y, RODEWALD L, YANG J, et al. The landscape of vaccines in China: history, classification, supply, and price [J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 502.
- [7] DIPAOLO B, PENNETTI A, NUGENT L, et al. Monitoring impurities in biopharmaceuticals produced by recombinant technology [J]. *Pharm Sci Technol Today*, 1999, 2(2): 70-82.
- [8] ZHAO S S, CHEN D D. Applications of capillary electrophoresis in characterizing recombinant protein therapeutics [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(1): 96-108.
- [9] 刘娴, 茹莉莉, 杨大军, 等. 重组蛋白药物电荷异质性的分析技术研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2018, 25(5): 461-466.
- [10] 张坤明, 潘勇兵, 张爱华. 人用重组单克隆抗体电荷异质性的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2016, 29(2): 206-212.
- [11] SOSIC Z, HOUDE D, BLUM A, et al. Application of imaging capillary IEF for characterization and quantitative analysis of recombinant protein charge heterogeneity [J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(21): 4368-4376.
- [12] MORITZ B, SCHNAIBLE V, KIESSIG S, et al. Evaluation of capillary zone electrophoresis for charge heterogeneity testing of monoclonal antibodies [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2015, 983-984: 101-110.
- [13] 陈泓序, 锋屈. 毛细管电泳技术在单克隆抗体药物分析中的应用 [J]. *色谱*, 2018, 36(3): 195-208.
- [14] FEKETE S, BECK A, VEUTHEY J L, et al. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, 113: 43-55.
- [15] RUSTANDI R R, WANG F, HAMM C, et al. Development of imaged capillary isoelectric focusing method and use of capillary zone electrophoresis in hepatitis B vaccine RECOMBIVAX HB (R) [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(7): 1072-1078.
- [16] MAO Q, PAWLISZYN J. Capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection for analysis of proteins and peptides [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1999,

39(1/2):93-110.

[17] WU J, LI S C, WATSON A. Optimizing separation conditions for proteins and peptides using imaged capillary isoelectric focusing[J]. J Chromatogr A, 1998, 817(1-2): 163-171.

[18] HJERTÉN S. High performance electrophoresis. Elimination of electroendosmosis and solute adsorption[J]. J Chromatogr, 1985, 347:191-198.

[19] KAHLE J, WATZIG H. Determination of protein charge variants with (imaged) capillary isoelectric focusing and capillary zone electrophoresis[J]. Electrophoresis, 2018, 39(20):2492-2511.

[20] 李少伟, 王致萍, 鑫池, 等. 人乳头瘤病毒疫苗的研究进展[J]. 厦门大学学报, 2021, 60(2):290-305.

[21] 刘芸, 乔佳佳, 李芳, 等. HPV 疫苗的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(4):286-289.

[22] ZHOU C M. Characterization of human papillomavirus by capillary isoelectric focusing with whole-column imaging detection[J]. Electrophoresis, 2013, 34(20-21): 3046-3053.

[23] 周朝明, 张高峡. 全柱成像毛细管等电聚焦电泳法测定 4 种生物制品等电点[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(4):718-723.

[24] MACH H, VOLKIN D B, TROUTMAN R D, et al. Disassembly and reassembly of yeast-derived recombinant human papillomavirus virus-like particles (HPV VLPs) [J]. J Pharm Sci, 2006, 95(10):2195-2206.

[25] 杨旭, 姚宇峰, 马雁冰. 诺如病毒疫苗研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2012, 6(24):8282-8284.

[26] DU J, WU G, CUI C, et al. Finger printing human norovirus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection[J]. Virus Research 2022, 311:198700.

[27] GOODRIDGE L, GOODRIDGE C, WU J, et al. Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection[J]. Anal Chem, 2004, 76(1):48-52.

[28] 陶昱岑, 郝霞, 刘新泳, 等. 抗肠病毒 71 型药物化学新进展[J]. 药学报, 2020, 55(4):744-753.

[29] ZHANG D, LU J, LU J. Enterovirus 71 vaccine: close but still far[J]. Int J Infect Dis, 2010, 14(9):e739-e743.

[30] 王文伟, 何成, 王蓓, 等. 重组人肠道病毒 71 型病毒样颗粒等电点全柱成像毛细管等电聚焦电泳测定方法的建立及验证[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(11):1358-1369.

[31] HILLEMANN M R. Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeusis of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications[J]. Vaccine, 2001, 19(15-16):1837-1848.

[32] WALLS A C, PARK Y J, TORTORICI M A, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. Cell, 2020, 181(2):281-292.

[33] 杨柏峰, 张家友, 李启明. SARS-CoV-2 亚单位疫苗研究现状与挑战[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(8):889-897.

[34] PREMKUMAR L, SEGOVIA-CHUMBEZ B, JADI R, et al. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients[J]. Sci Immunol, 2020, 5(48):eabc8413.

[35] MAAS M N, HINTZEN J C J, LOFFLER P M G, et al. Targeting SARS-CoV-2 spike protein by stapled hACE2 peptides[J]. Chem Commun (Camb), 2021, 57(26): 3283-3286.

[36] ALMEHDI A M, KHODER G, ALCHAKEE A S, et al. SARS-CoV-2 spike protein: pathogenesis, vaccines, and potential therapies[J]. Infection, 2021, 49(5):855-876.

[37] KREBS F, SCHELLER C, GROVE-HEIKE K, et al. Isoelectric point determination by imaged CIEF of commercially available SARS-CoV-2 proteins and the hACE2 receptor[J]. Electrophoresis, 2021, 42(6):687-692.

[38] DU J, WU G, CHEN Q, et al. Fingerprinting trimeric SARS-CoV-2 RBD by capillary isoelectric focusing with whole-column imaging detection[J]. Anal Biochem, 2023, 663:115034.

[39] AREO O, JOSHI P U, OBRENOVICH M, et al. Single-particle characterization of SARS-CoV-2 isoelectric point and comparison to variants of interest[J]. Microorganisms, 2021, 9(8):1606.

[40] SALPLACHTA J, KUBESOVÁ A, HORKÁ M. Latest improvements in CIEF: from proteins to microorganisms[J]. Proteomics, 2012, 12(19-20):2927-2936.

[41] KREMSE R L, BILEK G, BLAAS D, et al. Capillary electrophoresis of viruses, subviral particles and virus complexes[J]. J Sep Sci, 2007, 30(11):1704-1713.

[42] GEURINK L, VAN TRICHT E, VAN DER BURG D, et al. Sixteen capillary electrophoresis applications for viral vaccine analysis[J]. Electrophoresis, 2022, 43(9-10): 1068-1090.

[43] WU J, McElroy W, Pawliszyn J, et al. Imaged capillary isoelectric focusing: applications in the pharmaceutical industry and recent innovations of the technology[J]. TrAC, 2022, 150:116567.

(收稿日期:2023-01-19 修回日期:2023-05-26)