

使用RapiZyme™胰蛋白酶在生物制药表征中提供通用的快速酶解方案

Samantha Ippoliti, Nick Zampa, Ying Qing Yu, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

通过一种能够很好地平衡漏切、非特异性裂解和胰蛋白酶自溶的酶，可以实现完全、杂质少的胰蛋白酶酶解。

RapiZyme胰蛋白酶是一种新型均匀甲基化的重组猪胰蛋白酶，具有出色的热稳定性和更高水平的抗自溶性。本应用纪要评估了RapiZyme胰蛋白酶在传统肽图分析方案中的应用，还探讨了它在使用不同酶比例、pH、培养时间和温度的各种替代方案中的适用性。观察发现，RapiZyme胰蛋白酶特有地开辟了高比例酶:蛋白质(E:P) (1:5, w/w)的使用先例，并可在30分钟内快速酶解。这种方式可得到堪当典范的高质量肽图，尽管使用了高浓度的蛋白酶，也几乎没有自溶峰干扰。此外，使用RapiZyme胰蛋白酶可以使传统E:P比例的酶解速度加快（1-3小时，1:20 E:P）。不止于此，对于更热衷于过夜酶解的分析人员，本研究也证明，RapiZyme胰蛋白酶可以在1:100 E:P比例、pH 6.5的缓冲液和室温培养条件下，提供完全、低干扰的酶解。最后，本研究还将应用范围扩展到一锅法反应条件进行考察，在该条件下，RapiZyme胰蛋白酶与少量盐酸胍一起使用，这种方式是其他业内出色的MS级胰蛋白酶不能做到的。

优势

- 更高水平的抗自溶性打开了高比例酶:蛋白质的使用瓶颈，实现快速高效的30分钟酶解方案，并且无需高温培养
 - 由于干净的基线大幅减少了不匹配峰的数量，因此可以在关键数据分析期间快速做出可靠决策
 - 展示出多种特有酶解方案的通用性
-

- 方法长期成功的重现性

简介

肽图分析是生物制药表征和监测的基本分析方法。通过将完整蛋白或单克隆抗体(mAb)酶解至肽水平，可以通过序列覆盖率鉴定蛋白质并研究位点特异性修饰。肽图分析现在作为一种多属性监测(MAM)方法用于生物治疗药物的质量控制和放行测试中，因此必须稳定可靠¹。即使只考虑预期肽的含量，肽图分析的数据分析也相当复杂。当蛋白水解酶产生漏切（酶解不充分）、非特异性裂解（过度酶解）和自溶峰（自身酶解）时，情况会更加复杂。额外的峰会增加数据处理和审查所花的时间。此外，肽图分析往往意味着很长的样品前处理时间。酶解时间长会增加样品周转时间，可能会延误关键决策的制定。

为了解决这些复杂问题，Waters™推出了一款新的溶液内胰蛋白酶。RapiZyme胰蛋白酶是一种均匀甲基化的重组猪胰蛋白酶，具有热稳定性，并经过仔细地衍生化，因此具有非常高的抗自溶性。这一点通过在高温下过夜培养RapiZyme和另一款业内出色的MS级胰蛋白酶得到了证明。如图1所示，RapiZyme胰蛋白酶几乎完好无损，而竞品酶则表现出明显的自溶现象。本应用纪要首先展示了RapiZyme胰蛋白酶在传统酶解中的应用，然后探讨了它在各种其他肽图分析样品前处理方法中的适用性。

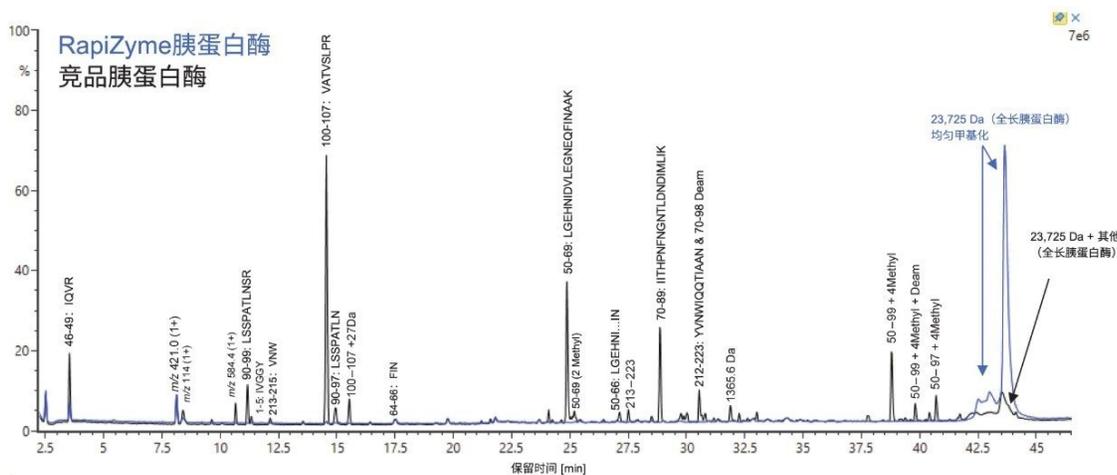


图1.模拟1:5酶:蛋白质比例样品的TIC叠加图，分别使用RapiZyme胰蛋白酶（蓝色迹线）和另一款业内出色的MS级胰蛋白酶（黑色迹线）。这些模拟样品代表酶空白。

实验

传统样品前处理（胰蛋白酶酶解前脱盐）

Remicade™（英夫利昔单抗）样品在室温下用含有3 mM二硫苏糖醇(DTT)的5.2 M盐酸胍溶液变性和还原30分钟。然后添加碘乙酰胺(IAM)至终浓度为7 mM碘乙酰胺(IAM)，并在室温下培养20分钟。通过7K MWCO凝胶过滤装置将样品置换到pH 7.5或pH 6.5的酶解缓冲液中。pH 7.5的缓冲液是Tris CaCl₂缓冲盐(P/N: 186010111)，pH 6.5的酶解缓冲液是50 mM组氨酸、10 mM CaCl₂（内部制备）。按表1所述将RapiZyme胰蛋白酶(P/N: 186010108)添加到各样品中进行培养。在每个时间点用10%乙酸将样品酸化（终浓度0.1%），并用流动相A进一步稀释，以备LC-MS分析。

条件	酶:蛋白质比例	温度	pH	培养时间	缓冲液组成
加速	1:5 (w/w)	37 °C	7.5	30分钟	100 mM Tris、10 mM CaCl ₂ (沃特世P/N 186010111)
传统	1:20 (w/w)	37 °C	7.5	1-3小时	100 mM Tris、10 mM CaCl ₂ (沃特世P/N 186010111)
过夜	1:100 (w/w)	室温	6.5	过夜 (15-18小时)	50 mM组氨酸, 10 mM CaCl ₂
稀释法（不脱盐）	1:5 (w/w)	37 °C	7.5	2小时	100 mM Tris、10 mM CaCl ₂ (沃特世P/N 186010111)

表1.灵活的胰蛋白酶酶解条件

一锅法（无脱盐）样品前处理

为了促进基于稀释的一锅法酶解方案，将样品直接添加到固体盐酸胍中，使变性剂的终浓度为5 M。按上述方法进行还原和烷基化。使用同一种pH 7.5的酶解缓冲液（Tris CaCl₂缓冲盐，P/N: 186010111）将样品稀释至0.6 M盐酸胍，以1:5 (w/w)的比例添加胰蛋白酶进行酶解。在37 °C下培养2小时后，用10%乙酸将样品酸化（终浓度0.1%），并用流动相A进一步稀释，以备LC-MS分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY™ UPLC™ I-Class PLUS

检测（光学）：	ACQUITY TUV
样品瓶：	采用MaxPeak™ HPS的QuanRecovery™样品瓶(P/N: 186009186)
色谱柱：	ACQUITY Premier Peptide CSH™ C ₁₈ , 130 Å, 1.7 µm, 2.1 x 100 mm (P/N: 186009488)
柱温：	60 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	5–10 µL（1–2 µg柱上进样量）
流速：	0.2 mL/min
流动相A：	0.1% (v/v)甲酸的水溶液
流动相B：	0.1% (v/v)甲酸的乙腈溶液
梯度：	初始保持1% B 1分钟，50分钟内1–35% B，6分钟内35–85% B，85% B保持4分钟，6分钟内85–1% B，1% B保持13分钟

质谱条件

质谱系统：	ACQUITY RDa™
电离模式：	ESI+，碎裂模式下的全扫描MS
采集范围：	<i>m/z</i> 50–2000

毛细管电压:	1.2 kV
碰撞能量:	60-120 V (低/高能量阶梯)
锥孔电压:	30 V
脱溶剂气温度:	350 °C
智能数据捕获:	开

数据管理

LC-MS采集和处理:	UNIFI™ v 3.0.0.6, 在waters_connect™ v 2.1.0中运行
-------------	---

结果与讨论

本研究的目的是评估RapiZyme胰蛋白酶的性能及其在各种方案中的应用。还有趣地比较了它和另一款号称具有抗自溶性的业内出色的MS级胰蛋白酶的性能。成功酶解的关键参数包括以下每种成分的低水平：1)漏切和非特异性裂解，2)胰蛋白酶自溶物，3)不匹配/未知峰，以及4)翻译后修饰(PTM)干扰，例如非理想酶解条件下可能导致的脱酰胺或氧化²⁻³。这些参数都会增加数据的复杂性，额外增添分析人员的负担。如果在对模拟酶解进行标准肽搜索后出现不匹配的峰，用户可能需要扩大搜索范围，加入半胰蛋白酶酶解（指定非特异性裂解）等参数、增加漏切数量，以及胰蛋白酶序列本身（连同衍生化序列）以开始匹配自溶峰。每一个额外的参数都会延长软件处理数据以及用户必须花在审查上的时间。

加速传统胰蛋白酶酶解

许多概述mAb胰蛋白酶酶解的参考文献都要求使用变性、还原和烷基化的蛋白质样品，在酶解前进行脱盐步骤¹⁻⁷。完成这些程序后，再以1:20–1:25 (w/w)的酶:蛋白质比例应用胰蛋白酶，并在高温下培养长达4小时。生物制药行业的很多实验室都在他们的肽图分析工作流程中采用这种胰蛋白酶酶解方案，我们的RapiZyme胰蛋白酶评估正

是从这里入手。我们使用Remicade（一种IgG1 kappa mAb）作为案例研究，比较了RapiZyme胰蛋白酶与另一款主要竞品胰蛋白酶的性能，E:P比例为1:20，在37 °C下培养3小时。然后通过LC-MS进行详细分析。应用3小时的培养时，RapiZyme胰蛋白酶和竞品胰蛋白酶的性能相当（如图2的TIC迹线所示）。每种酶都达到>93%的序列覆盖率，并且TIC图中有超过95%的积分峰面积由具有预期胰蛋白酶裂解的Remicade肽组成。比较酶解性能后没有观察到脱酰胺或氧化水平的显著差异。

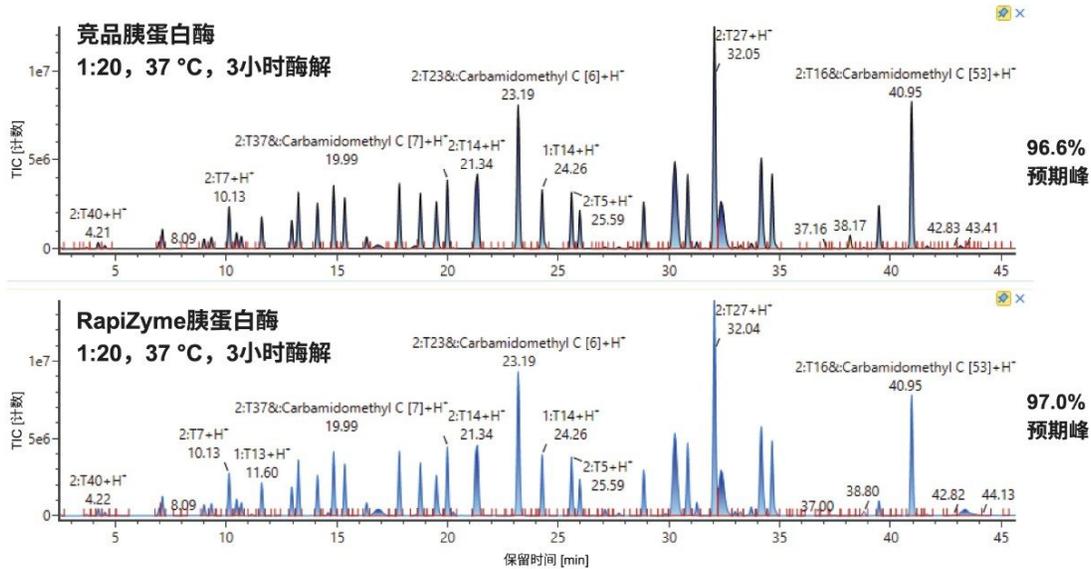


图2.使用另一款业内出色的胰蛋白酶（黑色迹线）和RapiZyme胰蛋白酶（蓝色迹线）对Remicade进行3小时1:20酶:蛋白质比例酶解的TIC色谱图，两者结果相同。

由于1:20 E:P比例的3小时酶解使mAb几乎完全酶解，因此我们决定在相同条件下测试更短的培养时间。图3中的叠加图显示出Remicade的1小时（蓝色迹线）和3小时（黑色迹线）酶解具有优异的可比性，表明使用RapiZyme胰蛋白酶仅需1小时即可获得相同的结果。

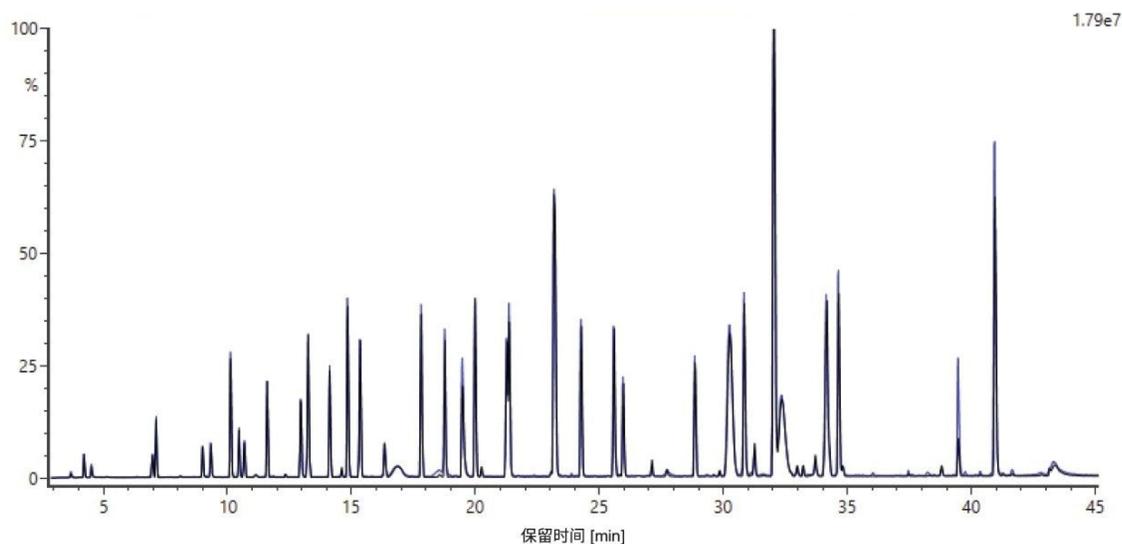


图3.使用RapiZyme胰蛋白酶以1:20的比例酶解Remicade 3小时（黑色迹线）的TIC色谱图，在相同条件下仅需1小时（蓝色迹线）即可达到同等酶解水平。

在肽图分析的样品前处理中，重现性至关重要。我们使用两个不同批次的RapiZyme胰蛋白酶进一步评估了Remicade在1小时RapiZyme胰蛋白酶酶解中的重复性和批次间重现性，每个批次各重复酶解3次。图4显示了这六次进样的TIC叠加图，可以看出预期肽具有出色的重现性、相似水平的酶解完成度和TIC模式。研究的漏切总量为 $0.55\% \pm 0.3\%$ 。总体而言， $97.5\% \pm 0.3\%$ 的TIC峰面积由来自Remicade轻链和重链序列的完全胰蛋白酶解肽组成。

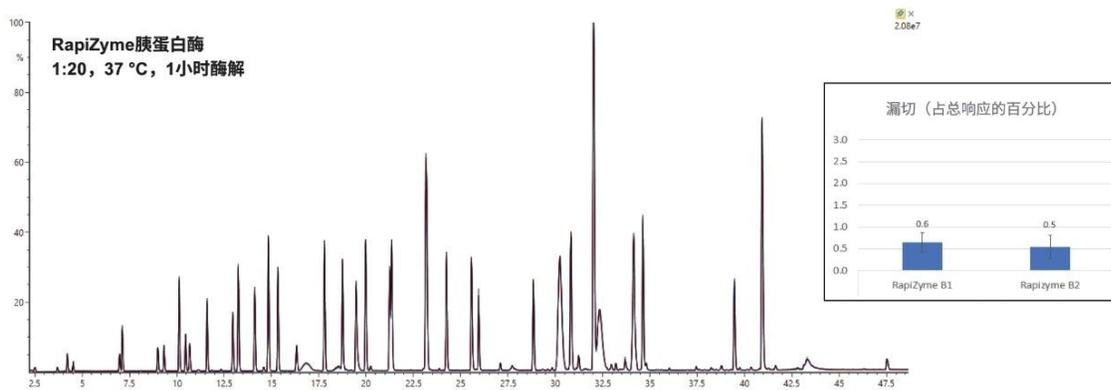


图4.使用两个不同批次的RapiZyme胰蛋白酶各重复酶解3次所得到的TIC叠加图，酶解条件为1:20酶:蛋白质比。插图显示了每批RapiZyme胰蛋白酶（重复样n=3）的漏切百分比的条形图比较。

还能更快吗？

在生物制药开发中，研究人员一直在寻找提高工作流程效率和缩短样品周转时间的方法。与此同时，他们也在努力减少因酶解时间较长而产生的干扰性修饰³⁻⁴。RapiZyme胰蛋白酶的新颖之处在于它的稳定性、抗自溶性和高活性。正是因为这些特性，才能更灵活地使用更高的酶:蛋白质比例，并有机会探索更短的酶解时间以及使用更广泛的温度。对于Remicade，我们选择以1:5的比例在37 °C的标准培养温度下测试30分钟。图5显示了RapiZyme胰蛋白酶与另一款业内出色的胰蛋白酶的标记TIC色谱图。两种酶的酶解质量存在显著差异，这种差异主要来自竞品酶在较高的E:P比例下使用时酶解过程中因胰蛋白酶自溶产生的肽。图5中的放大图突出显示了具有大量自溶物的部分（用红色箭头表示）。RapiZyme胰蛋白酶在同一保留时间窗口以及Remicade肽洗脱的任何其他窗口内均未显示任何明显的干扰峰信号。RapiZyme胰蛋白酶可提供快速、杂质少的酶解，序列覆盖率>93%，漏切<1%，胰蛋白酶自溶<0.1%（漏切和非特异性裂解的相对丰度(%)通过这些物质的MS响应与所有Remicade衍生肽的总MS响应相比计算，这种计算方式与以前发表的研究一致。）²。

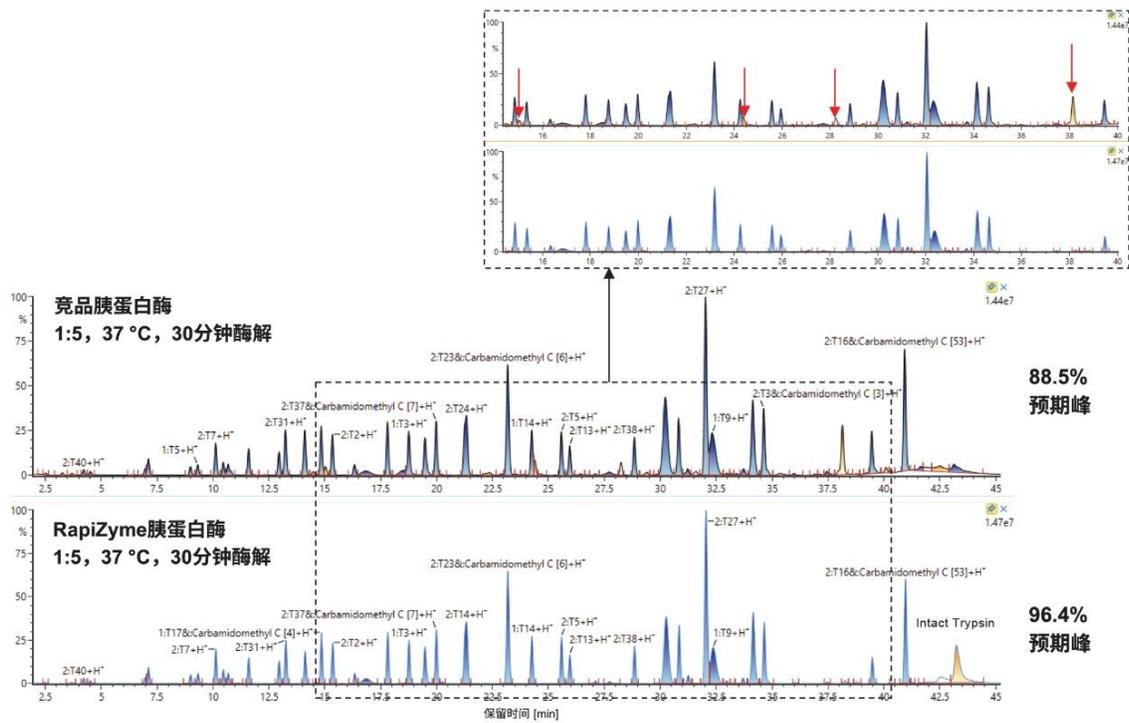


图5.另一款业内出色的竞品（上图）与RapiZyme胰蛋白酶（下图）的1:5酶解物的比较，放大了14–40 min的保留时间窗口。红色箭头突出显示了胰蛋白酶自溶和未知峰。

将上述相同的重复性和批次间重现性试验应用于加速酶解条件。图6显示了两批RapiZyme胰蛋白酶六个样品的TIC叠加图，每批各重复酶解3次。同样观察到出色的酶解重现性和整体完成度。总体而言，96.3% ± 0.6%的TIC峰面积由来自Remicade的完全胰蛋白酶解肽组成。

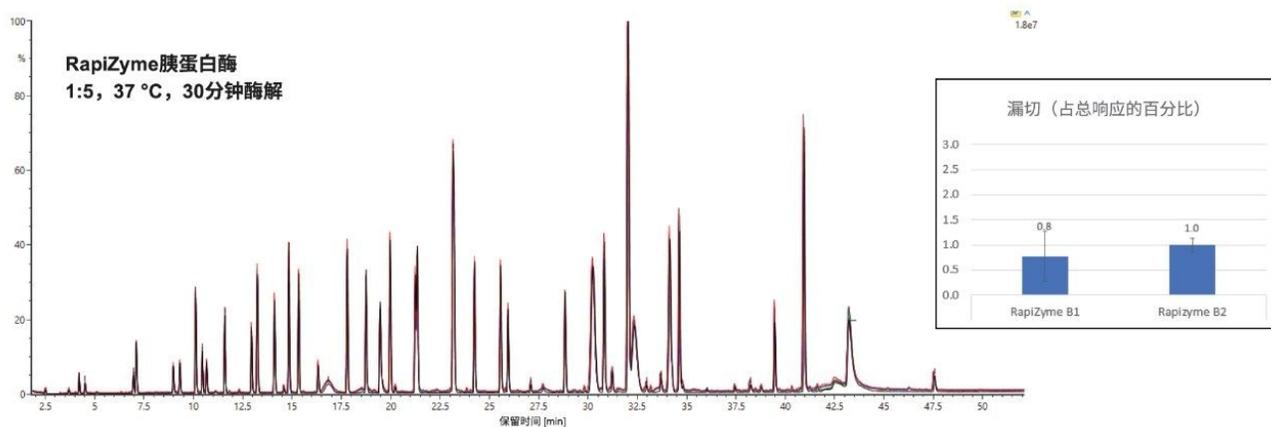


图6.使用两批RapiZyme胰蛋白酶各重复酶解3次所得到的TIC叠加图，酶解条件为1:5酶:蛋白质比。图显示了每批RapiZyme胰蛋白酶（重复样 $n=3$ ）的漏切百分比的条形图比较。

优化过夜酶解的性能如何？

虽然许多科学家都希望加快酶解工作流程，但也有一部分人更偏好设置和恢复过夜酶解的灵活性。对于过夜酶解，有几点注意事项。首先，RapiZyme胰蛋白酶非常活跃，因此应优化E:P比例和温度，以控制可能出现的任何非特异性裂解（过度酶解）。另一个注意事项是PTM，例如由于酶解条件（即中到高pH和高温）而发生的脱酰胺³。不幸的是，大多数胰蛋白酶都是在这种条件下才能保持高活性。为了减少我们在RapiZyme胰蛋白酶的过夜酶解评估中对这方面的顾虑，我们选择了低至1:100的酶比例、室温条件(20–25 °C)和pH 6.5的缓冲液。这些参数实现了杂质少且完全的过夜酶解，如图7A中的TIC所示。我们观察到序列覆盖率>90%，漏切、非特异性裂解和未知峰的总和<1%。整体脱酰胺和氧化水平也非常低。为了证明温度和pH对过夜培养的影响，我们以1:100 E:P比例、过夜时间间隔，但使用pH 7.5的缓冲液和37 °C的培养温度对Remicade进行了额外的酶解。选择具有脱酰胺倾向的肽来比较1)之前所述的30分钟加速酶解，2) pH 6.5室温过夜酶解，3) pH 7.5、37 °C过夜酶解的影响。重链肽T27 (VVSVLTVLHQDWLNGK)的提取离子流色谱图（图7B）显示30分钟和pH 6.5优化过夜酶解的脱酰胺水平相当低。而这种肽在pH 7.5、37 °C的过夜酶解条件下观察到脱酰胺>20%。这一结果证明优化的隔夜方案不会引入脱酰胺干扰。总体而言，以1:100的酶比例搭配pH 6.5的缓冲液和室温进行过夜培养，为使用RapiZyme胰蛋白酶产生无杂质且完全的酶解提供了第三种选择。

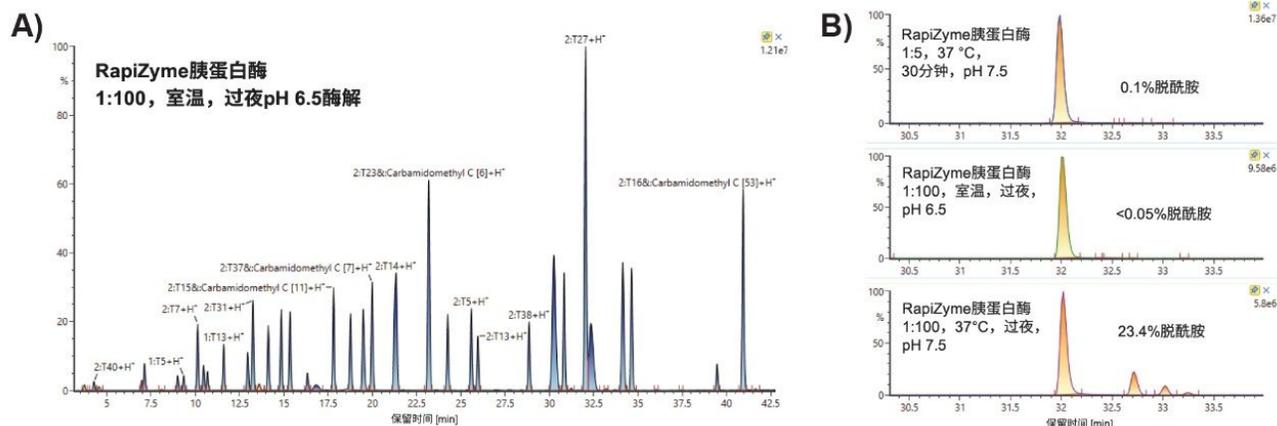


图7.A) Remicade 1:100 pH 6.5过夜酶解的标记TIC。B)具有脱酰胺倾向的肽HC T27 (VVSVLTVLHQDWLNGK)的提取离子流色谱图, m/z 603.6 (3+)和904.4 (2+), 在pH 6.5和7.5的缓冲液中培养30分钟和过夜。

可以跳过脱盐步骤吗?

截止目前讨论的所有方案都采用了脱盐小柱处理样品, 以在进行胰蛋白酶酶解前去除盐酸胍变性剂和还原/烷基化试剂。盐酸胍和尿素等常见的蛋白质变性剂在极大程度上阻碍了大多数胰蛋白酶的性能²。然而, 出于各种原因, 很多分析人员还是希望蛋白质酶解方案不包括脱盐步骤。使用脱盐小柱的一个固有风险是缓冲液置换后蛋白质回收率的变化。大多数市售设备报告的平均回收率为70–90%, 并且受样品的影响很大⁸。省去脱盐步骤可提高样品浓度和酶解条件之间的一致性。此外, 脱盐步骤也是样品前处理工作流程中一个额外的步骤, 需要花费更多时间和精力。鉴于RapiZyme胰蛋白酶已被证明在应用于脱盐样品时具有重现性、抗自溶性和高效率, 因此值得探索它在跳过传统脱盐步骤的一锅法酶解方案中的可能应用。为了促进酶解, 在Remicade样品经还原和烷基化后, 增加一个稀释步骤, 使盐酸胍的终浓度达到0.6 M。然后将RapiZyme胰蛋白酶添加到样品中, 酶比例为1:5, 在37 °C下培养酶解2小时。将研究结果与另一款业内出色的竞品胰蛋白酶相比较, 如图8所示。RapiZyme样品的总TIC峰面积中Remicade完全胰蛋白酶解肽占96%, 而竞品仅82% (图8A)。这种差异主要源于漏切和胰蛋白酶自溶物 (分别为图8B和8C)。竞品胰蛋白酶的总TIC峰面积中有约10%的漏切峰, 约6%的自溶峰。这表明即使使用了高浓度盐酸胍, RapiZyme胰蛋白酶也可以提供几乎完全的酶解。这可能为那些希望避免脱盐的分析人员提供了一个可行的替代方案。

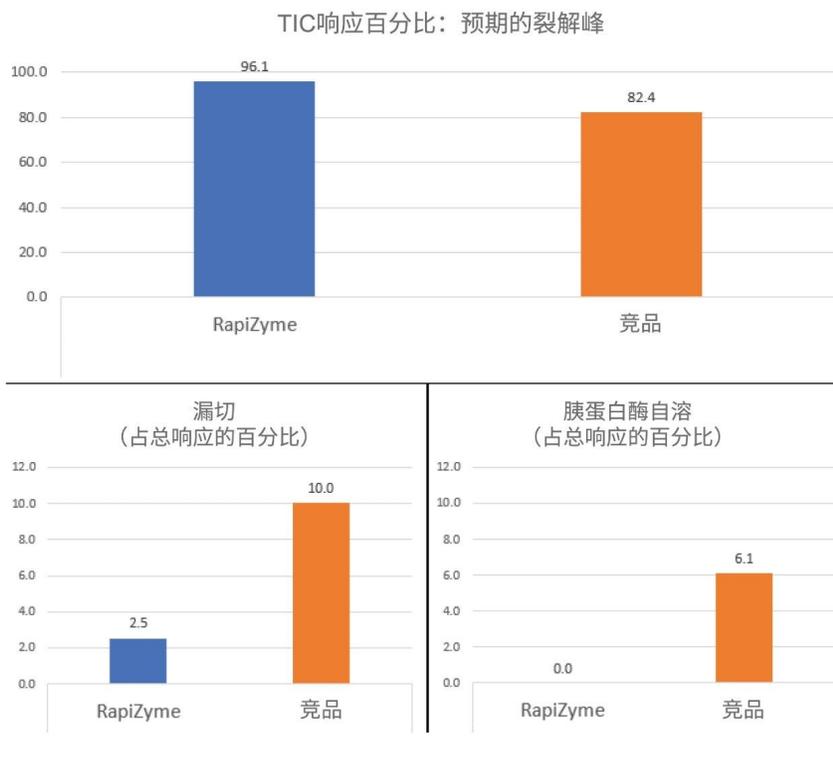


图8.一锅法（未经脱盐）稀释方案结果。图A)显示了TIC响应百分比的比较，该响应由使用RapiZyme胰蛋白酶和另一款业内出色的竞品胰蛋白酶，对Remicade进行一锅法酶解所得到的预期裂解峰组成。“杂质”包括漏切和非特异性裂解、胰蛋白酶自溶和未知峰。最显著的差异源于漏切（图B）和胰蛋白酶自溶（图C）。

结论

肽图分析是（未来也将继续是）一种重要的分析方法，能够提供丰富信息，可用于生物制药表征和监测。因此，这种分析方法的样品前处理必须稳定可靠。也就是说，许多实验室有各种各样的要求和希望遵循的标准方案。本应用纪要中所述的方法开发试验表明，RapiZyme胰蛋白酶特有的抗自溶性和酶解效率，使其可以成为一种更快、更有创意地制备高质量肽图分析样品的方法。RapiZyme胰蛋白酶已被证明可用于传统酶解、快速的30分钟酶解和灵活的过夜酶解，甚至可用于简单的一锅法方案。RapiZyme胰蛋白酶为每个新设想方案的Remicade肽图分析提供了具有高水平相似性和数据质量的肽图（图9）。

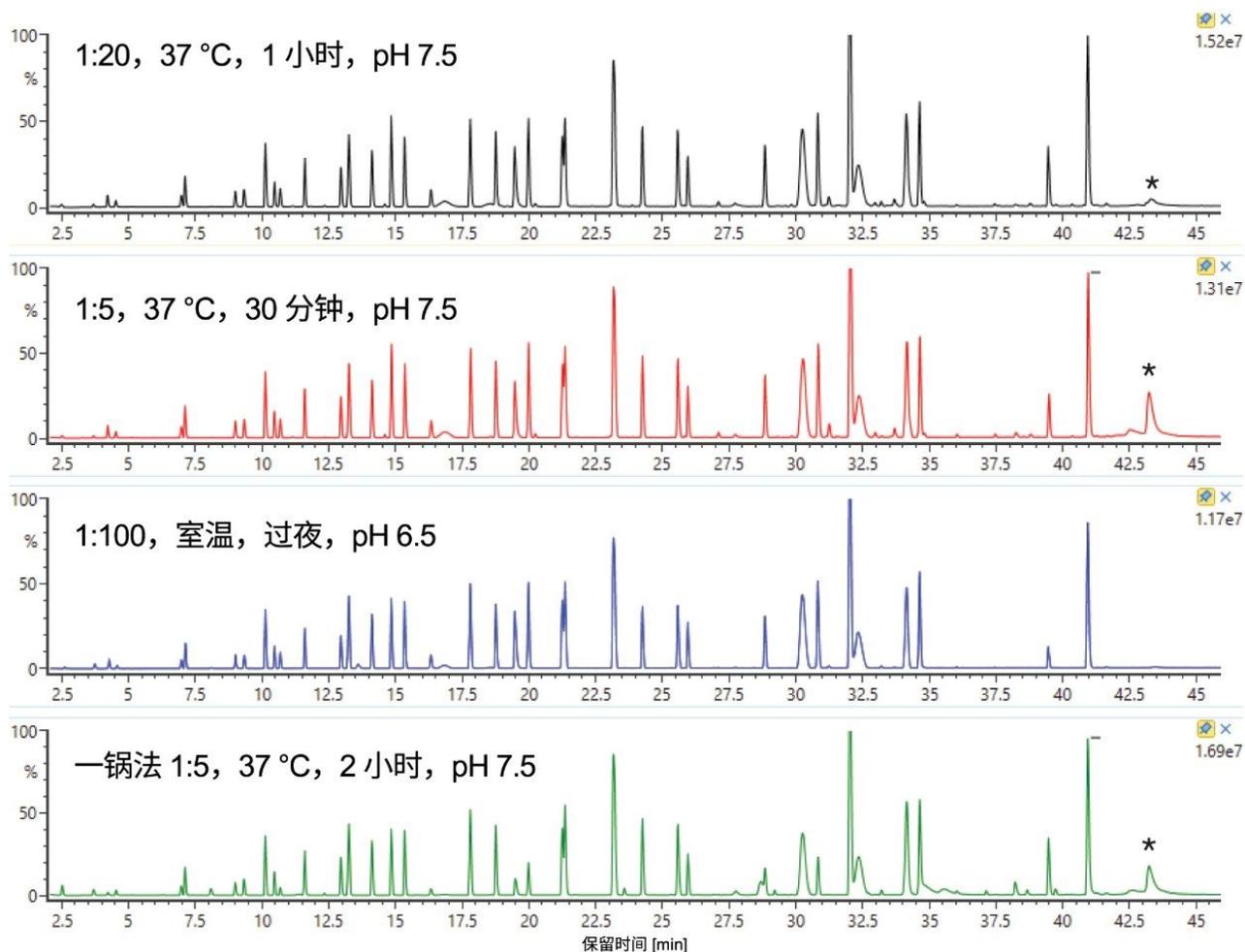


图9.酶解条件总结 — TIC叠加色谱图显示Remicade在所有四种酶解条件之间具有高度相似性 (*表示完整胰蛋白酶峰)。

参考资料

1. Ranbaduge R, Yu YQ.以精简、合规的工作流程执行肽段多属性方法(MAM).沃特世应用纪要, [720007094ZH](#). 2020年12月.
2. Mouchahoir T, Schiel JE. Development of an LC-MS/MS peptide mapping protocol for the NIST mAb.

*Anal and Bioanal Chem.*2018; 410: 2111–2126.

3. Ren D, Pipes GD, Liu D, Shih L, Nichols A, Treuheit MJ, Brems DN, Bondarenko PV. An Improved Trypsin Digestion Method Minimizes Digestion-Induced Modifications on Proteins. *Anal Biochem.*2009; 392: 12-21.
4. Millian-Martin S, Jakes C, Carillo S, Buchanan T, Guender M, Kristensen DB, Sloth TM, Oregaard M, Cook K, Bones J. Inter-laboratory Study of an Optimized Peptide Mapping Workflow Using Automated Trypsin Digestion for Monitoring Monoclonal Antibody Product Quality Attributes. *Anal and Bioanal Chem.*2020; 412: 6833-6848.
5. Evans AR, Hebert AS, Mulholland J, Lewis MJ, Hu P. ID-MAM: A Validated Identity and Multi-Attribute Monitoring Method for Commercial Release and Stability Testing of a Bispecific Antibody. *Anal Chem* .2021; 93 (26): 9166–9173.
6. Song YE, Dubois H, Hoffman M, Eri SD, Fromentin Y, Wiesner J, Pfenninger A, Clavier S, Pieper A, Duhau L, Roth U. Automated Mass Spectrometry Multi-Attribute Method Analyses for Process Development and Characterization of mAbs. *J Chrom B.* 2021; 1166: 122540.
7. Hao z, Moore B, Ren C, Sadek M, Macchi F, Yang L, Harris J, Yee L, Liu E, Tran V, Ninonuevo M, Chen Y, Yu C. Multi-Attribute Method Performance Profile for Quality Control of Monoclonal Antibody Therapeutics. *J Pharm Biomed Analysis.* 2021; 205: 114330.
8. Instruction Manual for PD-10 Desalting Columns. Cytiva #52130800 BD. 2022年12月12日通过 www.cytivalifesciences.com访问.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

ACQUITY RDa检测器 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

UNIFI生物制药平台解决方案 <<https://www.waters.com/waters/10195515>>

720007840ZH, 2023年1月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)